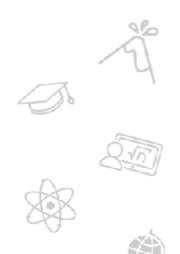
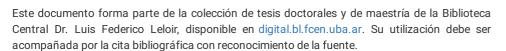
Tesis Doctoral



Rol de alfa-sinucleína en la función y dinámica mitocondrial en modelos experimentales de la Enfermedad de Parkinson

Martínez, Jimena Hebe



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



Martínez, Jimena Hebe. (2016-06-10). Rol de alfa-sinucleína en la función y dinámica mitocondrial en modelos experimentales de la Enfermedad de Parkinson. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Cita tipo APA:

Martínez, Jimena Hebe. "Rol de alfa-sinucleína en la función y dinámica mitocondrial en modelos experimentales de la Enfermedad de Parkinson". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2016-06-10.





Facultad de Ciencias Exactas y Naturales





UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Biológica

Rol de alfa-sinucleína en la función y dinámica mitocondrial en modelos experimentales de la Enfermedad de Parkinson

Tesis doctoral para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de Química Biológica

Lic. Jimena Hebe Martínez

Director de tesis: Dra. Mónica Lidia Kotler

Consejero de Estudios: Dra. Adalí Pecci

Lugar de trabajo: Departamento de Química Biológica – Facultad de Ciencias Exactas y Naturales- Universidad de Buenos Aires (UBA).

IQUIBICEN-CONICET.

Buenos Aires, 2016

Y los días se echaron a caminar.

Y ellos, los días, nos hicieron.

Y así fuimos nacidos nosotros,

los hijos de los días,

los averiguadores,

los buscadores de la vida.

El Génesis, según los mayas Eduardo Galeano, Los hijos de los días, 2011



Resumen

Rol de alfa-sinucleína en la función y dinámica mitocondrial en modelos experimentales de la Enfermedad de Parkinson

La enfermedad de Parkinson es una patología neurodegenerativa que afecta al 1% de la población mayor de 60 años. Se caracteriza por déficits motores, temblor en reposo y una pérdida selectiva de las neuronas dopaminérgicas de la Substantia Nigra Pars Compacta. Otro rasgo típico es la aparición de agregados proteicos conocidos como cuerpos de Lewy cuyo principal componente es una pequeña proteína, α-sinucleína. Esta proteína se une a las membranas lipídicas y en su conformación de α-hélice podría modular la fusión de las vesículas sinápticas con las membranas pre-sinápticas e influiría en la liberación de neurotransmisores. En condiciones patológicas, α-sinucleína sería capaz de unirse a las mitocondrias y se ha propuesto que esta unión provocaría disfunción mitocondrial y estrés oxidativo que colaborarían en el desarrollo de la enfermedad. La hipótesis de este trabajo propone que AS se incorpora a la mitocondria y se distribuye en sus distintos compartimientos. En esas localizaciones, esta proteína generaría disfunción mitocondrial incidiendo negativamente sobre distintos parámetros metabólicos, sobre la dinámica mitocondrial y la autofagia.

En el presente trabajo se estudió la localización específica de α-sinucleína en mitocondrias aisladas de cerebro de rata. Se emplearon técnicas de microscopía fluorescencia. microscopía de electrónica de Transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET), fraccionamientos celulares y mitocondriales, western blots y distintos ensayos bioquímicos. Los resultados obtenidos en mitocondrias aisladas mostraron que AS 1µM se asocia a la mitocondria, mayoritariamente en la membrana externa y AS 10μM y 50 μM se encuentra principalmente internalizada. La microscopía electrónica confirmó la localización de α-sinucleína en el interior de la mitocondria y también en la periferia. Mediante un experimento de FRET se demostró un posible rol para el transportador de membrana externa TOM en la incorporación de AS. El análisis de la funcionalidad mitocondrial reveló que α-sinucleína altera el consumo de O₂, el

potencial de membrana, la producción de ATP y aumenta la generación de especies reactivas de oxígeno.

Por otra parte, se utilizaron células SH-SY5Y transfectadas con α -sinucleína para estudiar el efecto sobre la viabilidad celular, la producción de ATP, la generación de especies reactivas de oxígeno, la dinámica mitocondrial y la autofagia. Los resultados revelaron una disminución significativa de la viabilidad, en paralelo a una disminución en la producción de ATP y generación aumentada de especies reactivas. Además, α -sinucleína indujo disipación del potencial de membrana mitocondrial, desbalance de los procesos de fisión-fusión y desencadenamiento de la autofagia y mitofagia. Estos últimos procesos actuarían como un mecanismo de rescate celular disminuyendo la muerte y eliminando la mitocondrias dañadas.

Este trabajo agrega evidencia novedosa al conocimiento de la localización de α -sinucleína en los distintos compartimientos mitocondriales, sus efectos sobre la funcionalidad mitocondrial y la relevancia de la disfunción de la organela en el destino celular. De este modo representan una contribución a la comprensión de los procesos que llevan a la patogénesis de la Enfermedad de Parkinson.

PALABRAS CLAVE: α-SINUCLEÍNA, ENFERMEDAD DE PARKINSON, MITOCONDRIA, DINÁMICA MITOCONDRIAL, AUTOFAGIA.

Abstract

Role of alpha-synuclein in function and mitochondrial dynamics in experimental models of Parkinson's Disease

Parkinson disease is a neurodegenerative pathology of the central nervous system affecting 1% of the population over 60 years old. This disease is characterized by motor deficiency, rest tremor, and the selective loss of dopaminergic neurons of the Substantia Nigra Pars Compacta. Another typical feature is the occurrence of protein aggregates known as Lewy's bodies. The main component of Lewy's bodies is a small protein named α-synuclein. This protein binds to lipidic membranes. The α -helix conformation could regulate the fusion between synaptic vesicles and pre-synaptic membranes modulating the neurotransmitter release. In pathological conditions, α-synuclein is associated to mitochondria. This interaction would trigger mitochondrial impairment and reactive oxygen species generation both events involved in the development of Parkinson's disease. This study hypothesizes that α-synuclein could be incorporated into the mitochondria and distribute in their different compartments. In these locations, this protein would be able to impair the mitochondrial function implying processes such as metabolic imbalance, mitochondrial dynamics and autophagy.

The present work studies the specific location of α -synuclein in isolated rat brain- mitochondria. Techniques of fluorescence microscopy, transmission electron microscopy, Förster Resonance Energy Transfer (FRET), cellular and mitochondrial fractionation, western blots and several biochemical assays were used. Results showed that α -synuclein 1 μ M was associated to mitochondria mainly on the outer membrane while α -synuclein 10 μ M and 50 μ M were internalized. Electron microscopy supported α -synuclein location inside the mitochondrion and also in the periphery. A possible role for the transporter outer membrane (TOM) in the incorporation of α -synuclein to mitochondria was suggested by FRET assay. The analysis of mitochondrial functionality revealed that α -synuclein alters O_2

consumption, mitochondrial membrane potential and ATP production. In addition, an increase in the reactive oxygen species generation was observed.

On the other hand, employing a cellular experimental model (SH-SY5Y cells transfected with α -synuclein) we demonstrated that this protein diminished cell viability and reduced ATP production with a concomitant increase in reactive oxygen species generation. In addition, α -synuclein was able to trigger mitochondrial membrane dissipation, imbalance in fission-fusion processes, autophagy and mitophagy. Both autophagy and mitophagy could act as rescue cellular mechanisms by decreasing cell death and damaged mitochondria. Taken together, these results add new evidence to the knowledge of mitochondrial specific α -synuclein location, the effects of this protein on the mitochondrial functionality and the relevance of this organelle dysfunction on cell viability. Thereby, these studies represent a contribution to understand the processes leading to development of Parkinson Disease.

KEY WORDS: α-SYNUCLEIN, PARKINSON DISEASE, MITOCHONDRIA, MITOCHONDRIAL DYNAMICS, AUTOPHAGY.

10

Agradecimientos

En la realización de la presente tesis, he recibido apoyo por parte de los siguientes organismos estatales a los cuales debo mi agradecimiento: al CONICET y UBA por otorgarme el soporte financiero necesario durante los años del doctorado.

En lo que respecta a las personas, en primer lugar quiero agradecer a la Dra. Mónica Kotler por su guía fundamental y ayuda. Ella tomó este trabajo de tesis en una etapa crítica de mi doctorado y gracias a su experiencia y enorme paciencia logré culminar un proyecto que muchas veces se tornó arduo. Sin ella no lo hubiese logrado. Gracias.

Quiero agradecer especialmente al Dr. Federico Coluccio Leskow quien estuvo a mi lado desde que empecé el doctorado. Con los años aprendimos a conocernos y estimarnos. Federico siempre se preocupó activamente para que saliera adelante en mi vida académica, aportando materiales, reactivos y consejos. Por todo eso le estoy infinitamente agradecida. Quiero agradecer también al Dr. Oscar Pérez que colaboró con reactivos y materiales para que pudiera concluir esta última etapa.

Otro agradecimiento especial es para el Dr. Federico Fuentes, mi querido amigo, quien no sólo fue parte de esta tesis en la primera etapa, sino que continuó su guía luego de dejar el laboratorio. Sus conocimientos de microscopía confocal y análisis de imágenes se reflejan en esta tesis.

A la Dra. Agustina Alaimo quien en esta última etapa no sólo aportó su experiencia sobre dinámica mitocondrial sino que se convirtió en mi amiga dándome consejos, mates y ánimo para continuar. A la Dra. Roxana Gorojod que me ayudó muchísimo para encarar el tema de autofagia y siempre se mostró dispuesta a darme una mano cuando lo necesité. A la Lic. Soledad Porte Alcon por su buena onda, comentarios y por sufrir conmigo la rebeldía del modelo celular SH-SY5Y.

También quiero agradecer a la Dra. Carla Spagnuolo que siempre me abrió las puertas de su laboratorio con total confianza y al Dr. Guillermo Menéndez, un gran amigo y compañero de trabajo, por enseñarme a marcar proteínas con fluoróforos.

Quiero agradecer especialmente a la Dra. Virgina Vanasco y a la Dra. Silvia Álvarez de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, por permitirme trabajar en su laboratorio. Su experiencia enriqueció mi trabajo y mi formación.

Quiero agradecer a los siguientes investigadores por haberme cedido reactivos y enseñado técnicas que han sido muy útiles en mi tesis: Dra. Cecilia Poderoso, Dr. Rafale Radi, Dra. Adriana Cassina, Dra. Valeria Antico-Arciuch, Dr. Thomas Jovin, Dra. Lia Pietrasanta y muchos más.

A mis amigos del alma: Amparo por ser una gran compañera de trabajo y una excelente persona, a Lucía por ser mi colega, cómplice y compañera de viajes, a Pako, por sus opiniones acertadas y por hacerme escuchar flamenco y sevillanas, a Martín por ayudarme siempre que pudo y por hacerme reír, a Jesica, mi compañera desde el principio del doctorado, a Yanina, siempre dispuesta a dar una mano y a Cecilia por llenar de posticks todos los objetos del laboratorio. Trabajar con ellos todos los días fue y seguirá siendo un placer. Me han ayudado mucho con consejos, sugerencias y me bancaron con sincero cariño estos últimos meses.

A todos los chicos del CM1, especialmente a Marquitos, Vicky, Johana, Daiana, Diego y Virginia, a Micaela del CMA... y a mis nuevos compañeros Facundo, Paula, Florencia.

A los profes de la UnLaM que me bancaron en este primer cuatrimestre en el que mi cabeza sólo estuvo enfocada en la tesis.

A mis padres por haberme enseñado el valor del esfuerzo y el trabajo. Por estar siempre, amarme y respetar todas mis decisiones. A mis hermanos por ser parte de este camino. Un agradecimiento especial a mi hermana Gisela que me ayudó a dar el formato final a este trabajo, te adoro Gi.

Por último, a la FCEN/UBA, por ser un ejemplo de educación de excelencia y gratuita por la que debemos luchar siempre. La cultura nos hace grandes, nos une y nos da identidad.

Índíce

RESUMEN		6
ABSTRACT		
AGRADECIMIENTOS		
ABRE\	/IATURAS	19
INTRO	DUCCIÓN	
1.	Enfermedades neurodegenerativas	23
	1.1 Enfermedad de Parkinson	23
	1.2 α-sinucleína	28
	1.3 La relación de α-sinucleína con la Enfermedad de Parkinson	33
2.	La Mitocondria	34
	2.1 Generalidades	34
	2.2 Estructura	35
	2.3 La cadena de transporte de electrones	37
3.		40
4.		43
	4.1 Dinámica mitocondrial y Enfermedad de Parkinson	46
	4.2 α-sinucleína y dinámica mitocondrial	48
5.	Autofagia	48
	5.1 Activación de la macroautofagia	50
	5.1.1 Conjugación de Atg5-Atg12	50
	5.1.2 Procesamiento de LC3	50
	5.2 Mitofagia y Enfermedad de Parkinson	51
Refere	encias bibliográficas	53
	ESIS Y OBJETIVOS	
	Hipótesis de estudio	58
	Objetivo general	59
	2.1 Objetivos específicos	60
MATE	RIALES Y MÉTODOS	00
	Materiales	61
	1.1 Reactivos para cultivos de células eucariotas	61
	1.2 Reactivos y soluciones generales	61
	1.3 Anticuerpos	62
	1.4 Cepas de bacterias	63
	1.5 Líneas celulares	63
	1.6 Animales de laboratorio	64
	1.7 Plásmidos	64
2.	Métodos	65
	2.1 Preparación de bacterias competentes	65
	2.2 Transformación de bacterias competentes	65
	2.3 Extracción de ADN plasmídico: lisis alcalina	66
	2.4 Determinación de la concentración del ADN plasmídico	66
	2.5 Evaluación del ADN plasmídico por separación en gel de agarosa	67
	2.6 Determinación de la concentración de proteínas	67
	2.7 Obtención de mitocondrias aisladas	68
	2.7.1 Aislamiento de mitocondrias de cerebro de rata	68

2.7.2 Aislamiento de mitocondrias a partir de células SH-SY5Y	68
2.8 Expresión, purificación y marcación de AS	69
2.8.1 Geles SDS-PAGE-Coomasie Blue	71
2.8.2 Marcación de AS con fluoróforos	71
2.9 Determinación de la respiración mitocondrial y acoplamiento de la cadena	
respiratoria	72
2.9.1 Oxígrafo de Clark	72
2.9.2 Oxígrafo de alta resolución	74
2.10 Velocidad de producción de ATP en mitocondrias aisladas	75
2.11 Producción de O ₂ * en mitocondrias aisladas	76
2.12 Microscopía electrónica de transmisión	77
2.13 Transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET)	78
2.14 Fraccionamiento submitocondrial	80
2.15 Cultivo celular	80
2.16 Transfección con ADN plasmídico	81
2.17 Inmunocitoquímica	81
2.18 Determinación de la viabilidad celular	82
2.18.1 Ensayo de reducción de MTT	82
2.18.2 Determinación de los niveles de ATP	83
2.18.3 Liberación de LDH	83
2.19 Generación de ROS	84
2.20 Determinación de anión superóxido	84
2.20.1 Espectrofluorometría	84
2.20.2 Microscopía de fluorescencia	85
2.21 SDS-PAGE y Western blot	86
2.22 Análisis de colocalización	87
2.23 Análisis estadístico	87
Referencias Bibliográficas	89
RESULTADOS	
Capítulo 1. ASOCIACIÓN DE AS A LA MITOCONDRIA	90
1.1 Expresión, purificación y marcación fluorescente de AS	90
1.1.1 Expresión y purificación de AS	90
1.1.2 Marcaje de AS con fluoróforos	91
1.2 Integridad de las mitocondrias aisladas de cerebro de rata	93
1.3 Localización submitocondrial de AS	94
1.3.1 Análisis por microscopía de fluorescencia	95
1.3.2 Reconstrucción tridimensional de la señal de AS en la mitocondria	96
1.3.3 Análisis por microscopía electrónica de transmisión	99
1.3.4 Fraccionamiento submitocondrial y análisis western blot	100
1.4 Cinética de la asociación de AS a mitocondrias aisladas	103
1.5 Interacción entre AS y TOM20	107
1.6 Efecto de AS sobre el potencial de membrana mitocondrial	110
Referencias Bibliográficas	113
Capítulo 2. EFECTO DE AS SOBRE EL METABOLISMO MITOCONDRIAL	114
2.1 AS disminuye la capacidad respiratoria de las mitocondrias	114
2.1.2 Análisis del consumo de O ₂ con un oxígrafo de alta resolución	116
2.2. Velocidad, de producción de ATP mitocondrial	118

2.3 AS induce la generación de O ₂ •-	119
Referencias Bibliográficas	
Capítulo 3. ROL DE AS EN LOS PROCESOS DE FUSIÓN-FISIÓN MITOCONDRIAL	
3.1 Sobreexpresión de AS en células SH-SY5Y	122
3.2 Efecto de AS sobre la viabilidad celular	124
3.3 Efecto de AS sobre la morfología nuclear	125
3.4 La sobreexpresión de AS disminuye la producción de ATP	127
3.5 Efecto de la sobreexpresión de AS sobre la generación de ROS	128
3.5.1 Generación de peróxidos reactivos	128
3.5.2 Generación de anión superóxido	129
3.6 AS y Dinámica Mitocondrial	130
3.6.1 Análisis de la morfología mitocondrial	131
3.6.2 Análisis de los niveles de expresión de las proteínas de fusión y fisión	
mitocondrial	135
3.6.3 Efecto de AS sobre la permeabilización de la membrana mitocondrial	139
3.6.4 Efecto de Drp-1 en presencia de AS	140
3.7 Análisis de la morfología mitocondrial en células que presentan aumento en	
la generación de anión superóxido	142
Referencias Bibliográficas	
Capítulo 4. EFECTO DE AS EN EL PROCESO DE AUTOFAGIA	
4.1 Efecto de AS sobre la autofagia	147
4.2 La sobreexpresión Atg5 disminuye la citotoxicidad inducida por AS	149
4.3 Rol de AS en la inducción de la mitofagia	150
4.3.1 Análisis de la colocalización	153
Referencias Bibliográficas	155
DISCUSIÓN	
Capítulo 1. ASOCIACIÓN DE AS A LA MITOCONDRIA	157
Capítulo 2. EFECTO DE AS SOBRE EL METABOLISMO MITOCONDRIAL	161
Capítulo 3. ROL DE AS EN LOS PROCESOS DE FUSIÓN-FISIÓN MITOCONDRIAL	
Capítulo 4. EFECTO DE AS EN EL PROCESO DE AUTOFAGIA	167 168
Referencias Bibliográficas	
CONCLUSIONES	

Abreviaturas

Δφ**m** Potencial de membrana mitocondrial.

AA Antimicina A

ADP adenosín 5'-difosfato

AFEa (apparent energy transfer efficiency) Eficiencia de FRET

aparente

ANT Adenine nucleotide translocator (translocador de nucleótido

de adenina)

AS Alfa –sinucleína

Atg5 autophagy-regulating proteins (proteínas regladoras de la

autofagia)

ATP Adenosina trifosfato

Baf A1 Bafilomicina A1

CCCP Carbonllcyanida 3-clorofenilhidrazona

CI NADH deshidrogenasa (Complejo I)

CII Succinato deshidrogenana (Complejo II)

Citocromo c reductasa (Complejo III)

CIV Citocromo Oxidasa, COX, (Complejo IV)

CLs Cuerpos de Lewy

CMA chaperone-mediated autophagy (Autofagia mediada por

chaperonas)

CR Control respiratorio

CV ATPsintasa mitocondrial (Complejo V)

DAPI 4',6-Diamidino-2-fenilnilindole dihidrocloride

DCFH-DA 2´,7´-diclorodihidrofluoresceina diacetato

DCLs Demencia de Cuerpos de Lewy

DHE Dihidroetidio

DMEM/F12 Dulbecco's Modified Eagle's Medium-F12 (Medio de cultivo

DMEM/F12)

DMSO Dimetil sulfóxido

Drp-1 Dynamin related protein-1(Proteina relacionada a

dinaminas-1)

Estado 3 respiratorio

E4 Estado 4 respiratorio

EA Enfermedad de Alzheimer

EDTA Ácido etilendiaminotetracético

EGTA Ácido etilenglicol-bis (2-aminoetileter)-N,N,N´,N´-tetracético

EH Enfermedad de Huntington

El Espacio intermembrana

ELA Esclerosis Lateral Amiotrófica

EP Enfermedad de Parkinson

FCCCP Carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone

FRET (Förster resonance energy transfer)Transferencia de

energía de resonancia de Förster

HRP Horseradish peroxidase (Peroxidasa de rabanito)

IgG Inmunoglobulina G

IPTG isopropil-β-D-tiogalactopiranosido

KCN Cianuro de potasio

LC3 I/II Microtubule-associated protein light chain 3

Cadena liviana 3 de la proteína asociada a microtúbulos

LDH Lactato Deshidrogenasa

MA Matriz mitocondrial

Mdivi-1 Mitochondrial division inhibitor-1

Mfn1/2 Mitofusina ½

M-G Malato- Glutamato

MME Matriz mitocondrial externa

MMI Matriz mitocondrial interna

MnSOD Superóxido dismutase dependiente de manganeso

mTOR Mammalian Target of Rapamycin Complex

Complejo blanco de la rapamicina en mamíferos

MTT Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolio

NADH β-niconitamida adenina dinucleótido como sal dipotásica

NLs Neuritas de Lewy

Oligo Oligomicina

ON Over night (Durante la noche)

Opa-1 Optic atrophy protein-1 (Proteína de atrofia óptica-1)

ROS Reactive oxygen species (Especies reactivas del oxígeno)

Rot Rotenona

Rpm Revoluciones por minuto

SD Desvío estándar

SDS Sodium dodecyl sulfate (dodecil sulfato de sodio)

SEM Error estándar

SFB Suero fetal bovino

SN Substantia Nigra

SNC Sistema nervioso central

SNPC Substantia Nigra Pars Compacta

Succ Succinato

TA Temperatura ambiente

TCEP Tris (2-carboxietil) fosfina hidroclorido

TEMED N,N,N',N'-tetrametil-etano-1,2-diamina

TOM20 Transporter Outer Membrane (subunidad 20 del

transportador de membrana externa mitocondrial)

VDAC Voltage-dependent anion cannel (canal aniónico

dependiente de voltaje)

Introducción

1. Enfermedades neurodegenerativas

Las enfermedades neurodegenerativas constituyen un grupo de desórdenes del sistema nervioso. multifactoriales y debilitantes aproximadamente 30 millones de individuos en el mundo. Entre ellas, la Enfermedad de Alzheimer (EA), la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA), la Enfermedad de Huntington (EH) y la Enfermedad de Parkinson (EP), son la consecuencia del mal plegamiento y tráfico incorrecto de Adicionalmente, la disfunción mitocondrial, el estrés oxidativo y/o los factores asociados a la edad han sido implicados en la neurodegeneración (Sheikh et al.. 2012 & Brettschneider et al., 2015). Luego de años de intensos estudios se ha logrado reunir considerable evidencia que demuestra un rol importante de estos factores en la etiología de estas enfermedades. A pesar del considerable esfuerzo enfocado en definir los mecanismos moleculares intervinientes en la neurodegeneración, muchos aspectos aún no se han esclarecido. Los neurocientíficos están ahora explotando los datos obtenidos de los estudios de estos mecanismos básicos que se encuentran fuera de control. Descifrar estas novedosas evidencias representa un desafío para la identificación de fármacos y biomarcadores para el diagnóstico temprano y tratamiento de estas enfermedades.

1.1 Enfermedad de Parkinson

La EP fue descripta y documentada por primera vez en 1817 por el neuropsiquiatra británico Dr. James Parkinson (1755-1824) en su ensayo denominado: *An Essay on the Shaking Palsy*. El trabajo describe la historia médica de seis individuos que sufrían los síntomas de la enfermedad que hoy lleva su nombre. Los casos observados correspondieron a pacientes entre 50 y 72 años, con profesiones diversas, que presentaban diferentes grados de avance de la enfermedad. Esto permitió entender el progreso de la misma a lo largo del tiempo de seguimiento. La descripción incluyó un registro que llevaban los

pacientes acerca de sus actividades diarias y de los síntomas que habían percibido desde el comienzo de la manifestación de la enfermedad. En todos los casos observó patrones del movimiento que comenzaban con temblores en las manos, brazos y movimientos involuntarios de la cabeza. Durante el curso de la enfermedad se dificultaba el habla y se afectaba la postura, provocando lentitud en el andar, inclinación del tronco hacia adelante y una gran debilidad general.

El Dr. Parkinson concluye que es una enfermedad de larga duración, progresiva, con síntomas característicos que marcan su comienzo y que derivan en los estadios avanzados de esta enfermedad como la demencia, la fragilidad y la pérdida de independencia debida a los movimientos involuntarios severos. Establece que, para el diagnóstico correcto, se requiere un seguimiento continuo del mismo caso y una correcta historia de los síntomas.

Con respecto a la etiología de la enfermedad, el trabajo describe que se produce por "...defectos en la médula espinal, contenida en el canal formado por la vértebra cervical superior y extendiéndose, en función del progreso de la enfermedad a la médula oblonga. Sin embargo, los estadios correspondientes al progreso de la enfermedad y su origen en la propia médula están sujetos a dudas y conjeturas..." A pesar de no poder aseverar la naturaleza de la enfermedad, concluye que esto no significa no poder encontrar la cura o al menos descubrir fármacos que detengan su progreso. Propuso entonces dividir la enfermedad en diferentes estadios, donde la aparición de temblores en reposo de las extremidades superiores, sería la etapa inicial en la que un fármaco tendría más éxito. En los casos avanzados, esperaba que al menos, pudiese detener el avance hacia la imposibilidad física y mental completa del paciente (Parkinson, 2002).

Actualmente sabemos que se trata de una patología neurodegenerativa común que afecta aproximadamente al 1% de la población mayor de 60 años (su prevalencia es de 120 en 100.000 individuos en los países industrializados). Es un desorden del movimiento provocado por un desequilibrio en la liberación de los neurotransmisores en los ganglios basales. Se caracteriza por déficits motores y temblor en reposo, manifestándose de la misma forma en los casos esporádicos y familiares (Defebvre, 2010). Uno de los desafíos en el diagnóstico de la EP

continúa siendo la capacidad de reconocer los síntomas que manifiestan los pacientes y que suelen ser insidiosos en las etapas tempranas. En 2006 se propuso una regla nemotécnica que engloba rasgos comunes asociados a la EP y que ayuda al diagnóstico (Frank et al., 2006). La regla *TRAP*, por sus siglas en inglés, incluye: *T* (*tremor*), los rasgos asociados al temblor en reposo, mayormente distal y asimétrico. Este síntoma está presente entre el 70% y 100% de los casos de EP. *R* (*rigidity*), la rigidez se observa en > 90% de los pacientes y se evidencia en la lentitud de los movimientos asociada a la presencia de temblores y a un aumento del tono general del cuerpo. *A* (*akinesia*) o ausencia de movimiento, esta señal ocurre en > 80% de los pacientes con EP y suele estar asociada a fragilidad que se diagnostica en base a cinco características físicas que incluyen: la pérdida de la fuerza de prensión, una disminución de la velocidad al caminar, cansancio, cambios en el gasto calórico semanal y pérdida de peso (Ahmed et al., 2008). *P* (*postural instability*), la inestabilidad de la postura no es una rasgo común de las etapas tempranas de la enfermedad y se utiliza como diagnóstico específico.

La *Substantia Nigra* (SN) es un núcleo bilateral ubicado en el mesencéfalo. Recibe su nombre por el gran contenido de neuromelanina de las neuronas que allí radican. Este núcleo comprende dos zonas: una dorsal de células grandes y medianas, ricas en dopamina (*pars compacta*) y otra ventral con sus neuronas más separadas y abundantes (*pars reticulata*). En la EP se produce una pérdida selectiva de las neuronas dopaminérgicas de la *Substantia Nigra Pars Compacta* (SNPC). En esta zona se origina la vía dopaminérgica que va a inervar el cuerpo estriado. La *pars reticulata* origina vías eferentes gabaérgicas que inervan el tálamo, el globo pálido y estructuras del tallo cerebral (**Figura 1**).

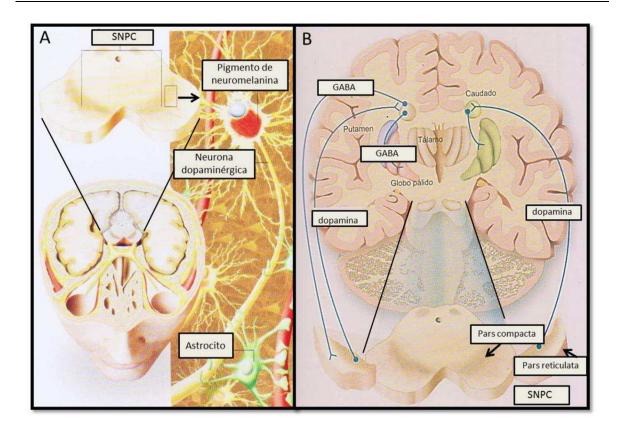


Figura 1: Esquema de la localización de la SNPC en el mesencéfalo y las vías neuronales relacionadas. A. Sección del cerebro donde las líneas negras señalan la zona del mesencéfalo donde se localiza la SNPC. Se muestra también una ampliación de esta estructura. Las neuronas dopaminérgicas se concentran principalmente en la zona pigmentada de la SNPC (recuadro). La flecha señala un esquema que representa las neuronas dopaminérgicas. B. Vías neuronales gabaérgicas y dopaminérgicas relacionadas con la zona reticulada y compacta de la Susbstantia Nigra. Las flechas señalan la pars reticulata y la pars compacta. Adaptado de Lépori, 2005.

En las neuronas dopaminérgicas de cerebros afectados por EP se observa la aparición de ensamblados filamentosos de proteínas de diferente naturaleza conocidos como cuerpos de Lewy (CLs) y neuritas de Lewy (NLs). Ambas inclusiones son relevantes en el desarrollo de la EP y la Demencia de Cuerpos de Lewy (DCL). Se ha identificado un número importante de proteínas que conforman los CLs y las NLs que incluyen neurofilamentos y ubiquitina (Spillantini et al., 1998).

Los CLs pueden apreciarse como inclusiones citoplasmáticas eosinófilas en preparados coloreados con hematoxilina-eosina de muestras de la SNPC de pacientes post-mortem con EP (**Figura 2**) (Schulz-Schaeffer, 2010).

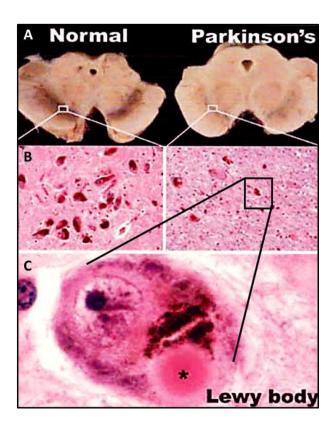


Figura 2: SNPC y EP. A. Apariencia de la SNPC en un corte fresco de mesencéfalo control y con EP. En el cerebro normal, la SNPC está pigmentada. En EP idiopática se observa una clara despigmentación debido a la degeneración y pérdida de neuronas dopaminérgicas. B. Preparado histológico de una sección de un cerebro sano (izquierda) y de un cerebro con EP (derecha). Se puede ver claramente la disminución del número de los cuerpos neuronales en el cerebro patológico comparado con el sano. El recuadro señala un cuerpo neuronal. C. Ampliación del soma de la neurona dopaminérgica señalada en B. Los cuerpos celulares de estas neuronas sobrevivientes contienen inclusiones citoplasmáticas correspondientes a los CLs (asterisco). Son marcadamente eosinófilos debido al alto contenido proteico característico de estos cuerpos (Adaptado de Frank et al., 2006).

El principal componente de los CLs es una pequeña proteína, α-sinucleína (AS), cuyo rol en el desarrollo de la EP ha sido extensamente estudiado en los

últimos años. Su presencia se puede observar en cortes histológicos de cerebros de pacientes con EP y DCL (Figura 3) (Auluck et al., 2010).

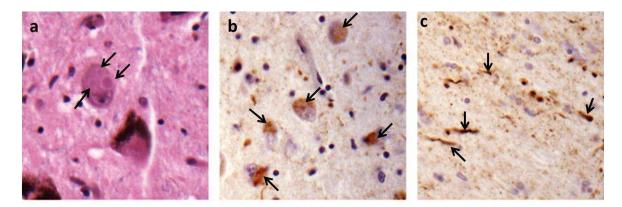


Figura 3: AS es el principal componente de los CLs y NLs encontrados en cerebros de pacientes que padecen EP y DCL. (a) Tinción con hematoxilina-eosina-luxol fast blue de una sección de SNPC de un paciente con EP. Las tres flechas negras indican la presencia en el citoplasma de CLs en una neurona dopaminérgica (cuerpos circulares intracelulares eosinófilos). (b,c) Histoquímica para AS sobre una sección de amígdala de un paciente con DCL. Se observan numerosos CLs corticales (b, flechas) y NLs (c, flechas) (Adaptado de Auluck et al., 2010).

1.2 α-sinucleína

En 1988, Maroteaux et al., clonaron AS por primera vez utilizando tejido neuronal de la raya eléctrica del Pacífico (*Torpedo californica*). Su nombre deriva de su localización en las terminales pre-sinápticas y membranas nucleares (SYNapse + NUCLEus, *synuclein*, en inglés) (Maroteaux et al., 1988). Está codificada por el gen SNCA localizado en el brazo largo del cromosoma 4 en humanos (4q21.3-q22).

AS pertenece a una familia de proteínas integrada por AS, β-sinucleína o fosfoneuroproteína, Y-sinucleína o persina y sinoretnina. Esa última posee la secuencia más divergente con respecto a AS (Auluck et al., 2010). Solamente AS y β-sinucleína se expresan en cerebros de mamíferos. Estas proteínas son pequeñas, solubles, están altamente expresadas en los tejidos nerviosos y no poseen una estructura secundaria y/o terciaria definida en condiciones fisiológicas.

En particular, AS es una proteína de 140 aminoácidos con un peso molecular de 14.460 Da y un punto isoeléctrico teórico de 4,67 que resulta en una carga neta negativa a pH neutro (Uversky et al., 2002). Su secuencia de aminoácidos está dividida en 3 regiones (Figura 4):

- 1.- El dominio N-terminal: comprende los residuos aminoacídicos de 1 a 60. Las tres mutaciones encontradas en la EP familiar están localizadas en esta región, en las posiciones A30P, E46K y A53T. Este dominio se caracteriza por presentar aproximadamente 7 repeticiones imperfectas de 11 aminoácidos con un motivo hexamérico altamente conservado que consiste en la secuencia KTKEGV. En su interacción con lípidos, este dominio adopta una estructura anfipática de α -hélice.
- 2.- El dominio central: es altamente hidrofóbico y se cree que es la región que explica la propensión de AS a formar agregados. Incluye el componente no amiloide (non-Aβ) de la enfermedad de Alzheimer conocido como NAC (non amyloid component), y abarca los residuos 61 a 95. Este dominio contiene dos motivos KTKEGV adicionales.
- 3.- **El dominio C-terminal**: contiene una gran proporción de residuos ácidos, prolina y tres residuos conservados de tirosina, que son característicos de α y β-sinucleína. La presencia de aminoácidos cargados negativamente y de prolinas, sugiere que esta región tiene tendencia a mantener una conformación desordenada y es la zona de la proteína más susceptible de sufrir cambios post-traduccionales (Uversky et al., 2002).

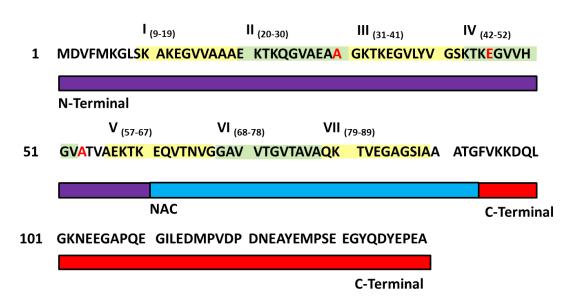


Figura 4: Detalle de las regiones de la secuencia de aminoácidos de la AS humana. Se indican en números romanos 7 repeticiones imperfectas de 11 aminoácidos que presentan la secuencia consenso KTKEGV resaltada en amarillo y verde. El componente no amiloide (NAC) se muestra en celeste y comprende los residuos de E61 hasta V95. Las tres mutaciones puntuales relacionadas con el desarrollo temprano de EP familiar se marcan con letras rojas (Adapatado de Uversky et al.,2012).

AS es fundamentalmente una proteína neuronal y se expresa en varias áreas del cerebro, principalmente en la SNPC, donde se la encuentra en las regiones presinápticas, unida a vesículas, en el citosol y en el núcleo. En base a su localización *in vivo* se le han atribuido diferentes roles.

Evidencia sustancial sugiere que AS interactúa directamente con lípidos de membrana tanto en condiciones fisiológicas como patológicas. En presencia de vesículas compuestas por fosfolípidos ácidos, esta proteína adopta una estructura secundaria de α-hélice. En la interacción con las membranas los aminoácidos del extremo N-terminal se disponen de tal manera de exhibir una distribución diferencial de aminoácidos polares y no polares formando una cara hidrofílica y una cara hidrofóbica de forma similar a las apolipoproteínas y otras proteínas unidas a lípidos (**Figura 5**). Sólo 102 residuos del N-terminal participarían en la unión con lípidos. Los residuos negativos del C-terminal permanecerían

desordenados y actuarían como andamiaje para el reclutamiento de más AS a membranas (Auluck et al., 2010).

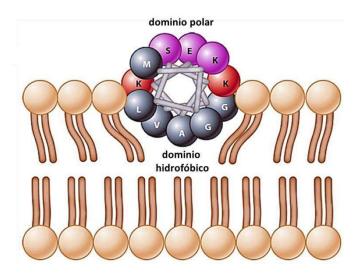


Figura 5: **Modelo de unión de AS a membranas.** Vista axial de los aminoácidos de AS cuando se disponen en α-hélice e interactúan con lípidos. Los residuos polares (S, E y K) se ubican hacia el entorno hidrofílico del citosol, mientras que los residuos hidrofóbicos se insertan entre las cadenas acilo de los fosfolípidos. Los aminoácidos cargados positivamente (lisina, K) separan los dominios polares e hidrofóbicos e interactúan directamente con la superficie aniónica de la bicapa de fosfolípidos (Adaptado de Auluck et al., 2010).

Si bien AS es también una proteína citosólica su función en solución no sería altamente relevante. Con respecto a su función en la presinapsis, AS actuaría regulando la liberación de neurotransmisores (Beyer et al., 2006). Por otra parte, las interacciones transitorias entre dímeros de AS sobre las superficies de membranas o entre moléculas de AS en el *pool* distal, contribuyen a la regulación del número de vesículas sinápticas (**Figura 6**). Su función estaría implicada en el mantenimiento de la curvatura de las membranas y en la regulación de la formación de microdominios importantes para el reclutamiento de proteínas Rab, un grupo de GTPasas consideradas como reguladores fundamentales del tráfico de membranas en todas las células. Cualquier alteración en la localización de las proteínas Rab podría afectar la interacción entre vesículas.

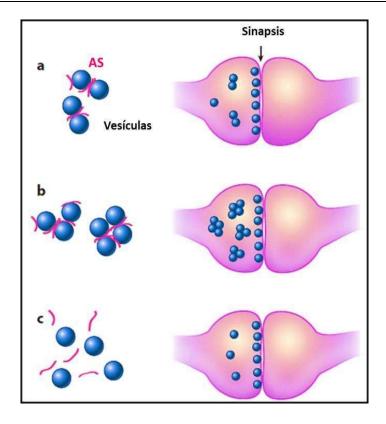


Figura 6: AS modula el *pool* de vesículas en la sinapsis. (a) En las neuronas normales, AS se localiza en las vesículas sinápticas que a través de efectos directos e interacciones con moléculas de AS vecinas ayudan a mantener estas vesículas en un pool de reserva distal. (b) La sobre expresión de AS wt, A53T o E46K aumenta las interacciones con lípidos y altera las propiedades físicas de las vesículas (por ej: reduciendo la curvatura), lo cual conduce a un "clustering" incrementado de vesículas en el pool de reserva. (c) la mutante de AS, A30P, es incapaz de unirse a los lípidos de membranas y de retener a las vesículas en el pool de reserva distal. (Adaptado de Auluck et al, 2010).

En el núcleo, la asociación física de AS con la ADN-metiltransferasa-1 (Dnmt1) disminuiría la metilación del ADN, reteniendo a esta enzima en el citosol y aumentando los niveles de expresión de AS (Desplats et al., 2011). Por otra parte, también ha sido reportado que su localización en el núcleo estaría implicada en la neurotoxicidad por inhibición de la acetilación de histonas y promoviendo también la sobreexpresión de AS (Kontopoulos et al., 2006).

1.3 La relación de α-sinucleína con la Enfermedad de Parkinson

Durante mucho tiempo se pensó que la EP se manifestaba únicamente de forma esporádica y que no existían componentes genéticos involucrados. Actualmente se sabe que aproximadamente el 20% de los pacientes con EP tienen una historia familiar relacionada con esta patología. Polymeropoulos et al. (1997) reportaron por primera vez que el gen de AS (SNCA) estaba ligado al desarrollo de EP. Este descubrimiento se realizó a partir de un análisis multigeneracional de una familia italiana que exhibía un patrón de herencia dominante. Esta mutación fue identificada autosómico como Posteriormente, se identificaron dos mutantes más, A30P y E46K, realizando el mismo estudio multigeneracional en una familia alemana y una española respectivamente (Polymeropoulos et al., 1997 & Zarranz et al., 2004). Aunque menos frecuentes, las duplicaciones y triplicaciones de SNCA también causan EP. Este hecho es de gran relevancia debido a que prueba que, no sólo las mutantes, sino AS salvaje es patogénica si se sobreexpresa (Chartier et al., 2004 & Singleton et al., 2003).

Los pacientes que llevan la mutación A53T desarrollan la enfermedad a edad temprana y padecen un severo parkinsonismo que frecuentemente deriva en demencia. En cambio, los pacientes con la mutación A30P muestran un desarrollo tardío de la patología y leve demencia. Aquellas personas que poseen la mutación E46K padecen síntomas similares a los provocados por la mutación A53T. Las duplicaciones y triplicaciones también presentan diferencias. La duplicación del gen causa parkinsonismo a edad avanzada, mientras que la triplicación provoca la aparición temprana de los síntomas, rápida progresión y el desencadenamiento de una demencia severa (Ozansoy & Başak, 2013).

2. La Mitocondria

2.1 Generalidades

El término mitocondria proviene de la composición de las palabras griegas *mitos* (filamentos) más *chondrion* (gránulos) y fue acuñado en 1898 por el doctor alemán Karl Benda para describir los orgánulos de morfología filamentosa que observaba en el citoplasma de diferentes células eucariotas. Estas organelas ya habían sido reportadas en 1850 por el fisiólogo suizo Albert Von Kölliker. Entre 1850 y 1880, distintos científicos describieron, independientemente, la presencia de estos filamentos en diferentes tipos celulares, notando que variaba en número, tamaño y localización subcelular (Von Stockum et al., 2015).

Las mitocondrias son organelas suficientemente grandes como para ser vistas al microscopio óptico; sin embargo el entendimiento de su funcionalidad se desarrolló recién en 1948 cuando se lograron aislar mitocondrias intactas. Por razones técnicas inherentes a la época, los estudios bioquímicos comenzaron a realizarse con mitocondrias purificadas de hígado debido a que las células hepáticas pueden llegar a contener entre 1.000 y 2.000 mitocondrias por célula, ocupando aproximadamente un quinto del volumen total de la misma (Alberts, 2008). El número de mitocondrias en cada célula es variable en función del requerimiento energético de cada tejido, por lo que algunas células carecen de ellas (por ejemplo, los eritrocitos) o poseen unas pocas, mientras que otras pueden contener varios miles (por ejemplos, las células hepáticas, cerebrales y musculares) (Kuznetsov et al., 2009). En cuanto a sus dimensiones, el diámetro es de ~0,5µm aunque su longitud puede variar entre 0,5-10µm (Detmer & Chan, 2007).

La **Teoría Endosimbiótica** propuesta por Lynn Margulis (Sagan, 1967) indica que las mitocondrias derivan de α-proteobacterias aeróbicas que han sido endocitadas por células pre-eucarióticas hace más de 1.500 a 1.800 millones de años. A partir de entonces, han evolucionado hasta llegar a ser organelas citoplasmáticas especializadas, que participan en numerosas funciones celulares,

siendo la principal, la producción de energía bajo la forma de ATP, requerida para la vida de la célula. En las mitocondrias, el metabolismo de la glucosa se completa cuando el piruvato es importado a la organela y oxidado por el O₂ a CO₂ y H₂O. A su vez, son reservorios de calcio, participan en rutas de biosíntesis, en la diferenciación y crecimiento celular, muerte programada y control del ciclo celular. Por lo tanto, dada su multitud defunciones, no resulta sorprendente que la disfunción mitocondrial tenga graves consecuencias a nivel de la viabilidad y funcionalidad celular y esté asociada a diversos desórdenes, entre ellos, trastornos neurodegenerativos y envejecimiento en humanos (Tasuta & Langer, 2008).

2.2 Estructura

La estructura de las mitocondrias consiste en una doble bicapa lipídica, que forma la membrana mitocondrial externa (MME) y la membrana mitocondrial interna (MMI). Estas membranas delimitan un estrecho espacio, el espacio intermembrana (EI) y una gran matriz interna (MA). Existen puntos de contacto entre la MME y la MMI donde se ubican proteínas tales como el canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC por sus siglas en inglés, *Voltage-dependent anion channels*) y el translocador de nucleótido de adenina (ANT, por sus siglas en inglés, *Adenine nucleotide translocator*), que son propuestos como sitios de fisión y/o fusión mitocondrial (Kuznetsov et al., 2009) que se detallarán más adelante.

La MME contiene canales que normalmente son permeables a ciertos iones, metabolitos y polipéptidos. Además, posee moléculas de porina que forman grandes canales permeables al H₂O, a través de la bicapa lipídica. Esta membrana se asemeja a un tamiz que permite el paso a todas las moléculas cuyo peso es de 5.000 Da o menos, incluyendo pequeñas proteínas. Estas moléculas pueden importarse al EI, pero la mayoría no puede atravesar la MMI. De esta manera,

El El es químicamente equivalente al citosol con respecto a las pequeñas moléculas que contiene mientras que la MA está ocupada por un selecto grupo de moléculas.

El El contiene una alta concentración de protones (H⁺) como resultado del bombeo de los mismos por los complejos enzimáticos de la cadena respiratoria. En él se localizan diversas enzimas que intervienen en la transferencia del enlace de alta energía del ATP, como la adenilato quinasa. También se localiza la carnitina, una molécula implicada en el transporte de ácidos grasos desde el citosol hasta la matriz mitocondrial, donde serán oxidados (beta-oxidación) (Von Stockum et al., 2015).

La MMI forma invaginaciones o pliegues llamadas crestas mitocondriales que se proyectan hacia la MA. Estas circunvoluciones aumentan la superficie de anclaje de enzimas y es donde se encuentra la cadena transportadora de electrones y ocurre la fosforilación oxidativa. Esta membrana contiene una alta proporción del fosfolípido cardiolipina que la vuelve especialmente impermeable a iones. Por otra parte, contiene una variedad de proteínas transportadoras que permiten el paso de pequeñas moléculas que han sido metabolizadas o requeridas por las enzimas mitocondriales concentradas en la MA.

La MA es un gran espacio interno que contiene una mezcla de cientos de enzimas, incluyendo las requeridas para la oxidación del piruvato y los ácidos grasos, y todas las necesarias para el ciclo del ácido cítrico. Los principales productos de esta oxidación son el CO₂, que es liberado fuera de la célula y el NADH que es la fuente principal de electrones de la cadena respiratoria. En la MA también está contenido el ADN mitocondrial, que consiste en varias copias idénticas, ribosomas mitocondriales, ARN de transferencia y enzimas necesarias para la expresión de genes mitocondriales (Alberts, 2008).

2.3 La cadena de transporte de electrones

La cadena respiratoria o de transporte de electrones se compone de tres grandes complejos enzimáticos incluidos en la MMI que se encargan del transporte de electrones desde el NADH hasta el último aceptor, el O2, y un cuarto complejo localizado en la MA que dona electrones a partir del FADH2. Los electrones fluyen espontáneamente desde los transportadores con potencial de reducción estándar (Eº) más bajo hacia los transportadores con Eº más elevado. El complejo I (NADH deshidrogenasa, CI) acepta electrones del NADH y los transfiere a una flavina y a centros hierro-sulfuro hasta la ubiguinona. El complejo II (succinato deshidrogenasa, CII) también reduce a la ubiquinona a partir de la transferencia de electrones desde el FADH2. Los electrones se transfieren desde la ubiquinona reducida al complejo III (citocromo c reductasa, CIII), al citocromo c y al complejo IV (citocromo oxidasa, COX, CIV). Este último incluye en su estructura dos citocromos a y a₃ más dos centros que poseen átomos de cobre (llamados CuA y CuB). El citocromo c reducido se une al CIV en un lugar cercano al centro citocromo-cobre. Al acercarse, cede un electrón y regresa a su estado de citocromo c3+. El centro CuA, que acepta ese electrón, lo cede a su vez al citocromo a, y éste al centro citocromo a₃-CuB. Los citocromos c sólo pueden llevar un electrón a la vez. Por lo tanto, el complejo citocromo-cobre acepta un electrón cada vez y se reduce secuencialmente hasta completar su estado de reducción. Posteriormente, cede los electrones simultáneamente hacia el último aceptor, el O₂.Cada molécula de O₂ recibe cuatro electrones para formar H₂O. Debido a que el O2 tiene una gran afinidad por los electrones, se libera una enorme cantidad de energía cuando es reducido a H₂O. En resumen, la acción combinada de los complejos I, III y IV da lugar a la transferencia de electrones desde el NADH al O2. Los complejos II, III y IV actúan conjuntamente para catalizar la transferencia de electrones desde el succinato al O₂ (Alberts, 2008; Navarro & Boveris, 2007) (Figura 7).

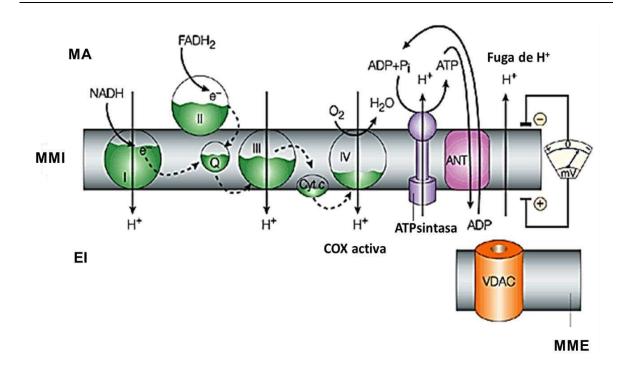


Figura 7: Esquema de la cadena de transporte de electrones. La caída del potencial redox de los complejos I, III y IV libera energía que es utilizada para la translocación de H⁺ desde la MA al EI. Se genera un potencial electroquímico utilizado para la generación de ATP por la ATPsintasa que devuelve, a su vez, un H⁺ a la MA. El esquema también muestra la fuga de H⁺ a través del translocador ANT, inserto en la MMI responsable del intercambio de ADP por ATP y el canal VDAC de la MME por el que pueden difundir diferentes solutos de bajo peso molecular. El estado redox de los componentes dela cadena respiratoria se muestra en verde (un nivel mayor representa un estado más reducido y más bajo un estado oxidado). Cyt c, citocromo c; FADH2, flavina-adenina dinucleótido (reducido); NADH, nicotinamida-adenina dinucleótido (reducido); Q, ubiquinona; I, II, III and IV se refiere a los complejos de la cadena respiratoria. (Adaptado de Moncada et al., 2002).

La transferencia de electrones está acoplada a un constante bombeo de protones (H⁺) al El a través de la MMI provenientes de la MA. Este bombeo de H⁺ se produce de forma energéticamente favorable debido al flujo de electrones. Este proceso conlleva dos grandes consecuencias:

1) Se genera un gradiente de pH a través de la MMI, desde la MA al EI, aumentando la concentración de H⁺ en este compartimento, generando entonces una carga positiva (lado P) de la MMI (pH=7). En contraposición se genera una cara negativa (lado N) de la MMI en contacto con la MA (pH=7.8).

2) Se genera un gradiente de voltaje (potencial de membrana) a través de la MMI con un interior negativo y un exterior positivo.

El gradiente de pH (Δ pH) dirige a los H⁺ nuevamente a la MA reforzando el efecto del potencial de membrana (Δ ϕ m) que actúa atrayendo cualquier ion positivo hacia la MA y empujando cualquier ion negativo hacia el El. Juntos, el Δ pH y el potencial de membrana (Δ ϕ m) constituyen el llamado gradiente electroquímico de H⁺. Este último constituye la fuerza protón motriz (Δ p), cuya expresión es Δ p = Δ pH + Δ ϕ m, dos componentes aditivos que dan cuenta de la diferencia de concentración de H⁺ y del potencial de membrana (Alberts, 2008; Lehninger, 2005).

La generación de ATP es posible debido a la existencia de una proteína integral de membrana, la enzima ATPsintasa (complejo V, CV). Esta enzima genera un paso hidrofílico a través de la MMI que permite que los H⁺ fluyan a favor de su gradiente de concentración. Como estos iones pasan a través de la enzima, son utilizados para llevar a cabo la reacción entre el ADP y el Pi para generar ATP.

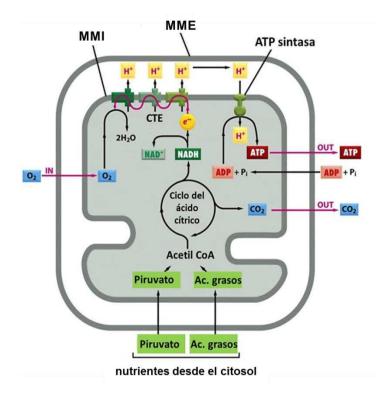


Figura 8: Metabolismo energético de la mitocondria. Las moléculas de piruvato y los ácidos grasos entran a la mitocondria y son transformados en Acetil CoA. Esta molécula es metabolizada en el ciclo de Krebs, donde se reduce el NAD^+ a NADH. En este proceso, los electrones de alta energía son transportados a través de la cadena respiratoria de la MMI hacia el O_2 . Este transporte de electrones genera un gradiente de H^+ a través de la MMI que dirige la formación de ATP por el CV. CTE: cadena de transporte de electrones. (Adaptado de Alberts, 2008).

3. Rol de las especies reactivas del oxígeno en la Enfermedad de Parkinson

Las especies reactivas del oxígeno, **ROS** (por sus siglas en inglés, *Reactive Oxygen Species*) se definen como un grupo de moléculas derivadas del O_2 que generalmente tienen una vida muy corta y son altamente reactivas debido a que poseen electrones de valencia desapareados (**Figura 9**) (Kim et al., 2015). Las ROS incluyen especies radicales como el anión superóxido (O_2^{\bullet}) y el radical hidroxilo (O_2^{\bullet}) y también especies no radicales como el peróxido de hidrógeno (O_2^{\bullet}). El O_2^{\bullet} interviene en distintos pasos en el proceso de generación de ROS. Puede ser transformado a la especie más estable O_2^{\bullet} 0 por la acción de la enzima

superóxido dismutasa (SOD) o formar aniones hidroxilos (•OH) altamente tóxicos. Además, por acción de las enzimas catalasa, glutatión peroxidasa y otras peroxidasas produce H₂O y O₂. El •OH es conocido por ser una de las ROS más reactivas y uno de los principales responsables de los efectos citotóxicos. Esta especie puede ser generada a partir de H₂O₂ mediante la reacción de Fenton, en presencia de Fe²⁺ (Bolisetty, & Jaimes, 2013; Ghandi & Abramov, 2012; Kim et al., 2015).

La producción de ROS es contrarrestada por un intricado sistema de defensa antioxidante que incluye a las enzimas SOD, catalasa y glutatión peroxidasa y diversos *scavengers* de especies reactivas como el GSH. El desbalance entre la producción de ROS y la acción de las defensas antioxidantes genera estrés oxidativo que daña a las macromoléculas biológicas conduciendo al envejecimiento y a la muerte (Indo et al., 2015).

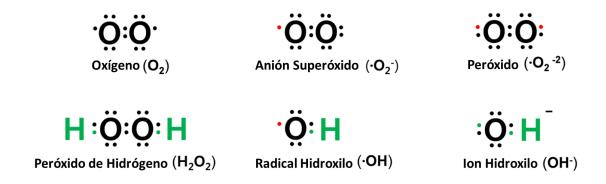


Figura 9: Especies reactivas del oxígeno. Se muestra la reducción consecutiva del oxígeno molecular que genera la formación de ROS. Los puntos rojos representan los electrones desapareados. (Adaptado de Kim et al., 2015).

Las ROS celulares se producen a partir de fuentes exógenas y endógenas. Las fuentes exógenas incluyen radiación UV, radiación ionizante, toxinas ambientales y químicos capaces de generar ROS como producto de su metabolismo (Mani, 2015). Una de las principales fuentes de producción de ROS es la cadena respiratoria mitocondrial. Bajo condiciones fisiológicas normales, más del 2% del consumo de O₂ celular mitocondrial se relaciona con la generación de

ROS, incluyendo O₂•. Los complejos CI y CIII son los principales responsables de la producción de O₂•. La capacidad de estas enzimas de generar ROS puede variar entre órganos y durante el progreso de ciertas patologías. Por ejemplo, el Cl es el principal responsable de la generación de O₂• en el cerebro mientras que el CIII es considerado la principal fuente de O2. en los pulmones y el corazón (Turrens, 2003). Por otra parte, la generación de ROS por parte del CI es la mitad de la correspondiente al CIII en condiciones fisiológicas, mientras que el CI ejerce el rol primario en la generación de ROS en condiciones patológicas, entre ellas, el envejecimiento y las enfermedades neurodegenerativas. En particular, en la EP, el estrés oxidativo ha sido considerado como uno de los principales mecanismos responsables de la muerte de las neuronas dopaminérgicas. Reportes previos indican que la actividad reducida del CI en el sistema nervioso central de pacientes con EP podría contribuir a la generación excesiva de ROS e inducir apoptosis (Blesa et al., 2015; Franco-Iborra et al., 2015; Shapira et al., 2008). Además, compuestos inhibidores del CI tales como 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,4tetrahydropyridine (MPTP) y su metabolito, 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+), ejercen efectos tóxicos sobre las neuronas dopaminérgicas resultando en un fenotipo clínicamente parkinsoniano con degeneración nigral y presencia de AS citoplasmática (Lin & Beal, 2006).

Además, la acumulación de AS salvaje o de sus mutantes en las mitocondrias de las neuronas dopaminérgicas provoca un defecto en la actividad del CI mitocondrial incrementando la producción de ROS (Devi et al., 2008). Se ha reportado una deficiencia de la actividad del CI en la corteza frontal, fibroblastos y trombocitos de pacientes con la EP (Deas et al., 2015). Además del CI, se han encontrado disfunción de otros complejos de la cadena respiratoria. AS también puede unirse al CIV causando alteraciones funcionales en la mitocondria (Elkon et al., 2002; Hsu et al., 2000).

Por otro lado, se reportaron cambios en las moléculas antioxidantes en estadios tempranos de la enfermedad (Floyd et al., 2001). Por ejemplo, en el sistema nervioso central de pacientes con EP, se han encontrado niveles

disminuidos de GSH y elevados de hierro (Halliwell, 2006), una condición que podría contribuir al daño a las neuronas dopaminérgicas.

4. Dinámica mitocondrial

Las mitocondrias no son organelas estáticas sino que se movilizan a través del citoesqueleto, se fusionan y se dividen, lo que indica que son dinámicas y de aspecto variable. El espectro de las morfologías mitocondriales comprende formas esféricas, largas hebras individuales e incluso ramificaciones filamentosas que pueden formar una gran red mitocondrial interconectada distribuida en el citoplasma. Estas morfologías son el resultado del balance entre dos procesos antagónicos denominados *fusión* y *fisión*, necesarios para el correcto funcionamiento de esta organela y de la célula. En este marco teórico, el concepto *Dinámica Mitocondrial* se refiere al movimiento de las mitocondrias a lo largo del citoesqueleto y a la regulación de su morfología (Liesa et al., 2009).

Las células han desarrollado complejos sistemas para hacer frente a diversos desafíos impuestos sobre la integridad mitocondrial. La primera línea de defensa está integrada por un sistema proteolítico conservado que lleva a cabo el control de calidad de las proteínas. En dicho sistema, participan chaperonas y proteasas que monitorean el correcto plegamiento de las proteínas mitocondriales removiendo de manera selectiva a aquellas que resultan defectuosas. La segunda línea de defensa reside en la naturaleza dinámica de las mitocondrias a través de los eventos de fusión y fisión gobernados por una familia de GTP-asas.

La *fusión* es un proceso que involucra la unión de dos o más mitocondrias y su función primaria es la de permitir la mezcla de contenidos entre las mismas. Así, la existencia de redes fusionadas correspondientes a mitocondrias conectadas permite la complementación del ADN a través del intercambio de genomas entre las organelas que se están fusionando, facilita la transmisión de energía acoplada al $\Delta \phi m$ a lo largo de la célula, además de restituir mitocondrias dañadas cuando estas se fusionan con mitocondrias intactas (Westermann, 2010)

(Figura 10). La fusión mitocondrial es un proceso en dos pasos, donde las MME y MMI se fusionan en eventos separados. Esto tiene correlato con la ubicación diferencial de las principales proteínas de fusión: las mitofusinas 1 y 2 (Mfn-1/2) se encuentran en la MME y el El y la proteína *Optic Atrophy-1* (Opa-1) en la MMI y el El. Si bien se han realizado importantes avances en el estudio del mecanismo involucrado en la fusión, aún resta determinar con exactitud el mecanismo que interviene en la fusión coordinada de ambas membranas y elucidar cuál es la región particular de las membranas donde se inicia la unión y la fusión, seguida de la mezcla de los contenidos mitocondriales (Campello & Scorrano, 2010: Pernas & Scorrano, 2015).

La *fisión* da lugar a mitocondrias fragmentadas, las cuales son fácilmente transportables, de modo de permitir un rápido tráfico de estas organelas a través de los microtúbulos hacia sitios de requerimiento energético dentro de las células. Dado que las mitocondrias proliferan a partir del crecimiento y división de otras preexistentes, la fisión es un evento importante para el mantenimiento del número, pero también durante la mitosis, permitiendo a la célula madre el traspaso de sus mitocondrias a las células hijas. Así mismo, la fisión facilita la mitofagia (degradación de mitocondrias dañadas por autofagia) e interviene en la muerte celular apoptótica, contribuyendo a la liberación del citocromo c al citoplasma (Figura 10). La principal proteína involucrada en la fisión es la dynamin-1-related protein, Drp-1. La localización intracelular de Drp-1 es mayormente citoplasmática pero una parte considerable de esta proteína es detectada en puntos concretos ("foci") de la mitocondria donde se producirá la escisión mitocondrial. Frente a un estímulo de muerte, Drp-1 es defosforilada en la serina 637, lo que induce su translocación a la mitocondria. Allí, Drp-1, mediante interacción con los adaptadores Fis1, Mff, MiD49 y MiD51, se oligomeriza formando un anillo de constricción alrededor de la organela, lo que culmina en la escisión mediada por hidrólisis de GTP (Losón et al., 2013; Qi & Mochly-Rosen, 2013).

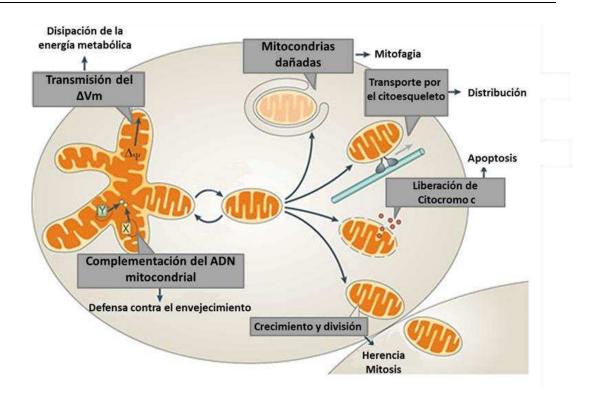


Figura 10: Funciones biológicas de la dinámica mitocondrial. X e Y representan alelos de genes mitocondriales diferentes. (Adaptado de Westermann, 2010).

En los últimos años se ha señalado la importancia de los procesos de fusión y fisión en la señalización por calcio, síntesis de ATP, estrés oxidativo, supervivencia celular y vías de muerte celular. Dependiendo del contexto celular, se han descripto distintas morfologías mitocondriales. En la mayoría de las células de mamíferos las mitocondrias presentan formas tubulares bajo condiciones normales pero cambian ante perturbaciones diversas (Ahmad et al., 2013). Durante la apoptosis, por ejemplo, es característica la presencia de mitocondrias fisionadas (redondeadas) mientras que en la necrosis aparecen hinchadas y se distienden. Más recientemente, se ha descripto una nueva morfología: la dona (*donut shaped*). Existe escasa información acerca de la razón por la cual las mitocondrias adquieren forma de donas y el mecanismo molecular implicado. El consenso más aceptado por el momento indica que luego de un período de estrés oxidativo leve es posible la reversión de la forma dona hacia la forma tubular (normal). Por su parte, si el estrés oxidativo es severo o sostenido en el tiempo y

la mitocondria adquiere la morfología de esfera, habría una incapacidad de retorno hacia la forma tubular. Esta teoría se originó a partir de estudios donde se monitorearon en tiempo real los cambios exhibidos por las mitocondrias luego de períodos de estímulos de estrés oxidativo y recuperación (Ahmad et al., 2013).

4.1 Dinámica mitocondrial y Enfermedad de Parkinson

Las neuronas son células con altos requerimientos energéticos, en las que las mitocondrias juegan un rol central. Por lo tanto, las propiedades dinámicas de estas organelas (fisión, fusión, tráfico, biogénesis y degradación), aunque esenciales en todas las células, son especialmente relevantes en las neuronas. En los últimos años, se han acumulado evidencias que relacionan la disfunción en los procesos de la dinámica mitocondrial con el desarrollo de la EP (Gomez-Lazaro et al., 2008; Jordan & Schrader, 2008; Kamp et al., 2010; Nakamura et al., 2011).

Los estudios relacionados a la morfología mitocondrial en la SNPC de pacientes con EP han sido limitados por varias razones. En primer lugar, si bien es posible obtener biopsias de tejido, los detalles ultraestructurales, a menudo, apenas se conservan. Segundo, las muestras de biopsias de cerebro provienen de pacientes con estadios avanzados de la enfermedad, momento en el que los cambios debido a la patología ya no reflejan los estadios del proceso de neurodegeneración (Franco-Iborra et al., 2015).

Recientemente se ha reportado que las proteínas PINK1 y Parkina, relacionadas con el desarrollo de la EP, son reguladores clave del control de calidad mitocondrial. Así, la vía PINK1/Parkina actuaría regulando los procesos de fusión, fisión, transporte y biogénesis mitocondrial como también la mitofagia.

En las neuronas, las mitocondrias son particularmente abundantes en las sinapsis y se concentran en regiones subcelulares con altos requerimientos metabólicos, por ejemplo en los conos de crecimiento (Chang et al., 2006). Drp-1 es crítica para el marcado de mitocondrias hacia las terminales nerviosas y una

disrupción en la fisión mitocondrial puede contribuir a la muerte de las neuronas dopaminérgicas de la SNPC (Berthet et al., 2014). Una de las razones más aceptadas de la vulnerabilidad de las neuronas dopaminérgicas a los cambios en la dinámica mitocondrial es el bajo número basal del contenido de mitocondrias comparado con otras neuronas del mesencéfalo (Liang et al., 2007). Esta evidencia podría explicar la vulnerabilidad selectiva de estas neuronas a estímulos tóxicos externos e internos que afectarían la fusión/fisión mitocondrial y la mitofagia, comprometiendo la homeostasis mitocondrial durante la patogénesis de la EP (**Figura 12**).

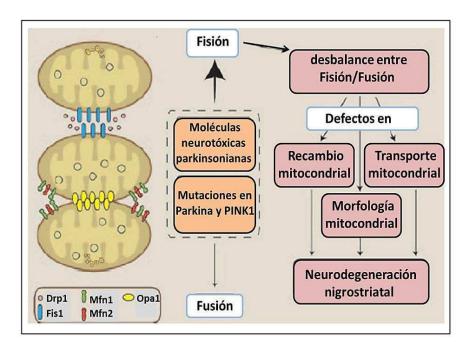


Figura 12: Desbalance de los procesos de fisión y fusión mitocondrial en el desarrollo de la EP. Drp-1, Fis1, Mnf1/2 y Opa-1 son las moléculas implicadas en la fisión y fusión mitocondrial. Son responsables del control del número y tamaño de las organelas en las células. Drp-1 debe ser reclutada a la MME e interactuar con la proteína Fis1. Las Mnf1/2 son necesarias para la unión de la MME mientras que Opa-1 es responsable de la fusión de la MMI. Un desbalance en la dinámica mitocondrial ya sea por exposición a neurotoxinas o al desarrollo de la EP ligada a mutaciones de Parkina o PINK1 afecta la morfología mitocondrial, el recambio mitocondrial y su eventual transporte dando lugar a la neurodegeneración nigrostriatal. (Adaptado de Franco-Iborra et al, 2015).

4.2 α-sinucleína y dinámica mitocondrial

Recientemente se ha sugerido que la asociación de AS con la mitocondria juega un rol crítico en la morfología mitocondrial. Se ha reportado que la interacción entre la proteína y la organela induce la fisión (Nakamura et al., 2011) o inhibe la fusión (Kamp et al., 2010) dependiendo del modelo experimental. La capacidad de AS de inducir fisión podría ser independiente de la actividad de Drp-1 y parecería radicar simplemente en la interacción directa AS-mitocondria, aunque los mecanismos son aún desconocidos. Si bien se cuenta aún con escasa información, la evidencia obtenida parecería indicar que AS pertenece a un grupo de proteínas que afectan directamente la dinámica de membranas (Varkey et al., 2010).

5. Autofagia

El término **autofagia** deriva de las raíces griegas, *auto* (a uno mismo) y *phagos* (comer). Este mecanismo se encuentra conservado evolutivamente y es un proceso por el cual el contenido citoplasmático es secuestrado en vesículas y enviado a los lisosomas para su degradación. Desde su descubrimiento hace más de 40 años por Christian de Duve (Deter & De Duve, 1967) en células hepáticas de rata, la identificación de proteínas reguladoras de la autofagia (*Atg*, por sus siglas en inglés *autophagy-regulating proteins*) ha tenido un sustancial incremento permitiendo entender cómo funciona este proceso (Mizushima, 2007; Yin & Gao, 2008).

Existen tres tipos de autofagia: la *macroautofagia*, la *microautofagia* y la *autofagia mediada por chaperonas* (*CMA*, por sus siglas en inglés *chaperone-mediated autophagy*). Todos estos mecanismos promueven la degradación de los componentes citosólicos en el lisosoma (**Figura 13**).

La **macroautofagia** requiere de la formación de una vesícula de doble membrana, que comienza como un fagóforo y luego madura a la estructura denominada autofagosoma. Este último encierra los componentes a ser

degradados, que pueden ser proteínas citosólicas, ribosomas y organelas tales como mitocondrias y retículo endoplasmático, así como también bacterias y virus. El autofagosoma libera su cargo en el lisosoma cuando se fusiona con éste, formando lo que se denomina un autofagolisosoma. La macroautofagia requiere de la activación del complejo pro-autofágico Beclina1/PI3K y el reclutamiento de proteínas Atg que inducen la formación de los autofagosomas (Rambold & Lippincott-Schwartz, 2011).

En la **microautofagia**, los componentes citosólicos son captados directamente por el lisosoma por invaginación de su membrana. Ambos procesos, macro y micro-autofagia son capaces de degradar grandes estructuras a través de mecanismos selectivos y no selectivos (Glick et al., 2010).

En la **CMA**, las proteínas a ser degradadas, son translocadas a través de la membrana del lisosoma debido a que son reconocidas por el receptor denominado *lysosomal-associated membrane protein* 2A (LAMP-2A). Estas proteínas forman un complejo con chaperonas (por ejemplo Hsc-70) y una vez dentro del lisosoma son desplegadas y degradadas (Glick et al., 2010).

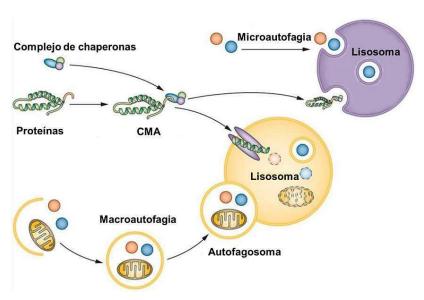


Figura 13: Esquema representativo de los tres mecanismos de autofagia. (Adaptado de Schneider et al. 2014).

5.1 Activación de la macroautofagia

Existen dos sistemas clave para la activación de la macroautofagia en los que se requiere la conjugación de las proteínas Atg5-Atg12 y el procesamiento de LC3.

5.1.1 Conjugación de Atg5-Atg12

En el primer sistema Atg7 actúa como una ubiquitina E1-like que activa a Atg12 de una manera ATP-dependiente. Atg12 es luego transferida a Atg10 (E2 ubiquitina-like) que potencia la unión covalente de Atg12 a una lisina de Atg5. El complejo Atg5-Atg12 se une al dímero Atg16L para formar el complejo multimérico Atg5-Atg12-Atg16L que se asocia con el fagóforo en formación. Una vez que el autofagosoma está formado, el complejo Atg5-Atg12-Atg16L se disocia de la membrana (**Figura 14**) (Glick et al., 2010).

5.1.2 Procesamiento de LC3

El segundo sistema tipo ubiquitina involucrado en la formación del autogafosoma es el encargado del procesamiento de la proteína denominada *microtubule-associated protein light chain 3*, LC3. Esta proteína se expresa en la mayoría de las células como una proteína citosólica que, bajo la inducción de la autofagia, es clivada por Atg4, una cisteína-proteasa, que genera LC3-I, dejando en su C-terminal, una glicina expuesta. LC3-I es activada por Atg7 de una manera ATP-dependiente y luego es asociada con Atg3, que funciona como carrier, antes de que la glicina expuesta se conjugue con el fosfatidiletanolamina para generar LC3-II. Esta forma es la que se recluta al fagóforo en formación y es dependiente del complejo Atg5-Atg12. LC3-II se encuentra tanto en la cara externa como en la cara interna del autofagosoma donde juega un rol fundamental en la fusión de las membranas del autofagosoma con el lisosoma y en la selección del cargo a ser degradado. El procesamiento de LC3 se incrementa durante la autofagia,

transformándose en un indicador fundamental de este proceso (**Figura 14**) (Glick et al., 2010).

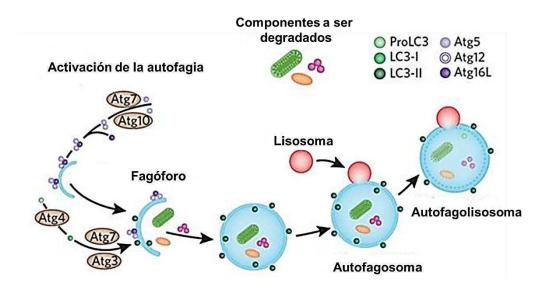


Figura 14: Activación de la macroautofagia. Las proteínas Atg son responsables de la iniciación de la autofagia. La elongación del fagóforo requiere de la unión del complejo Atg12–Atg5–Atg16L y el procesamiento de LC3-I a LC3-II. La membrana crece encerrando los materiales citosólicos para dar lugar al autofagosoma. Al final de este proceso, un lisosoma de fusiona con el autofagosoma formando un autofagolisosoma. El lisosoma libera las hidrolasas encargadas de la degradación de los componentes citosólicos. (Adaptado de Fleming et al, 2011).

5.2 Mitofagia y Enfermedad de Parkinson

La degradación de mitocondrias por autofagia se conoce específicamente como *mitofagia*. Este proceso ocurre ante una variedad de condiciones que incluyen la disfunción mitocondrial, control del número de mitocondrias durante el desarrollo, estrés oxidativo y falta de nutrientes (Rambold & Lippincott-Schwartz, 2011) (**Figura 15**).

En pacientes con EP se han encontrado neuronas portadoras de mitocondrias defectuosas y se ha sugerido que la morbilidad de esta patología

podría estar asociada con una falla en la remoción de estas organelas (Chen & Dorn, 2013). Este defecto traería como consecuencia un aumento del número de mitocondrias disfuncionales que resultaría en un incremento de los niveles de estrés oxidativo y pérdida de neuronas dopaminérgicas (Youle & Narendra, 2011). En la revisión realizada por (Cheung et al., 2011), se muestra que varios estudios han reportado que la mitofagia juega un papel clave tanto en la EP familiar como esporádica. Las proteínas Pink1 y Parkina son mediadoras de la degradación selectiva de mitocondrias disfuncionales a través de la mitofagia y las mutaciones de Parkina, asociadas la EP, provocan una pérdida del proceso de degradación de las mitocondrias mediada por mitofagia, sugiriendo que la acumulación de organelas dañadas puede contribuir al desarrollo de esta patología (Geisler et al., 2010; Lynch-Day et al., 2012; Schapira, 2008).

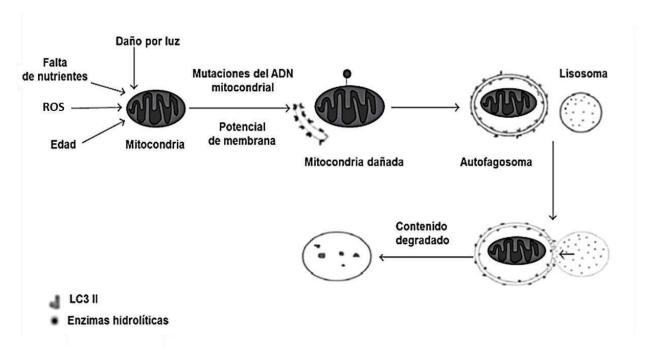


Figura 15: Esquema del proceso de mitofagia. (Adaptado de Shirihai et al, 2015).

Referencias Bibliográficas

- Ahmad, T., Aggarwal, K., Pattnaik, B., Mukherjee, S., Sethi, T., Tiwari, B. K. & Roy, S. S. (2013). Computational classification of mitochondrial shapes reflects stress and redox state. *Cell death & disease*, *4*(1), 461.
- Ahmed, N. N., Sherman, S. J., & VanWyck, D. (2008). Frailty in Parkinson's disease and its clinical implications. *Parkinsonism & related disorders*, 14 (4), 334-337.
- Alberts, B.; Lewis, A.; Raff, J.; Keith, R. & Peter, W. (2008) "Energy Conversion: Mitochondria and Chloroplasts", en *Molecular Biology of the Cell*. [5^a ed.] 813-839.
- Auluck, P. K., Caraveo, G., & Lindquist, S. (2010). α-Synuclein: membrane interactions and toxicity in Parkinson's disease. *Annual review of cell and developmental biology*, 26, 211-233.
- Berthet, A., Margolis, E. B., Zhang, J., Hsieh, I., Zhang, J., Hnasko, T. S. & Nakamura, K. (2014). Loss of mitochondrial fission depletes axonal mitochondria in midbrain dopamine neurons. *The Journal of Neuroscience*, 34(43), 14304-14317.
- Beyer, K. (2006). α-Synuclein structure, posttranslational modification and alternative splicing as aggregation enhancers. *Acta neuropathologica*, *112*(3), 237-251.
- Blesa, J., Trigo-Damas, I., Quiroga-Varela, A., & Jackson-Lewis, V. (2015). Oxidative stress and Parkinson's disease. Frontiers in neuroanatomy, (9), 91.
- Bolisetty, S., & Jaimes, E. (2013). Mitochondria and reactive oxygen species: physiology and pathophysiology. *International journal of molecular sciences*, *14*(3), 6306-6344.
- Brettschneider, J., Del Tredici, K., Lee, V. M. Y., & Trojanowski, J. Q. (2015). Spreading of pathology in neurodegenerative diseases: a focus on human studies. *Nature Reviews Neuroscience*, 16 (2), 109-120.
- Campello, S., & Scorrano, L. (2010). Mitochondrial shape changes: orchestrating cell pathophysiology. *EMBO reports*, *11*(9), 678-684.
- Chang, D. T., Honick, A. S., & Reynolds, I. J. (2006). Mitochondrial trafficking to synapses in cultured primary cortical neurons. *The Journal of neuroscience*, 26(26), 7035-7045.
- Chartier-Harlin, M. C., Kachergus, J., Roumier, C., Mouroux, V., Douay, X., Lincoln, S. & Waucquier, N. (2004). α-Synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease. *The Lancet*, 364(9440), 1167-1169.
- Chen, Y., & Dorn, G. W. (2013). PINK1-phosphorylated mitofusin 2 is a Parkin receptor for culling damaged mitochondria. *Science*, *340*(6131), 471-475.
- Cheung, Z. H., & Ip, N. Y. (2011). Autophagy deregulation in neurodegenerative diseases—recent advances and future perspectives. *Journal of neurochemistry*, *118*(3), 317-325.
- Defebvre, L. (2010). Parkinson's disease: Role of genetic and environment factors. Involvement in everyday clinical practice. *Revue neurologique*, 166 (10), 764-769.
- Desplats, P., Spencer, B., Coffee, E., Patel, P., Michael, S., Patrick, C. & Masliah, E. (2011). α-Synuclein Sequesters Dnmt1 from the Nucleus a novel mechanism for epigenetic alterations in lewy body diseases. *Journal of Biological Chemistry*, 286(11), 9031-9037.
- Deter, R. L., & De Duve, C. (1967). Influence of glucagon, an inducer of cellular autophagy, on some physical properties of rat liver lysosomes. The Journal of cell biology, 33(2), 437-449.
- Detmer, S. A., & Chan, D. C. (2007). Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 8(11), 870-879.
- Devi, L., Raghavendran, V., Prabhu, B. M., Avadhani, N. G., & Anandatheerthavarada, H. K. (2008). Mitochondrial import and accumulation of α-synuclein impair complex I in human dopaminergic neuronal cultures and Parkinson disease brain. *Journal of Biological Chemistry*, 283(14), 9089-9100.

- Floyd, R. A., West, M., & Hensley, K. (2001). Oxidative biochemical markers; clues to understanding aging in long-lived species. *Experimental gerontology*, *36*(4), 619-640.
- Franco-Iborra, S., Vila, M., & Perier, C. (2015). The Parkinson Disease Mitochondrial Hypothesis Where Are We at?. *The Neuroscientist*, 22(3), 266-77.
- Frank, C., Pari, G., & Rossiter, J. P. (2006). Approach to diagnosis of Parkinson disease. *Canadian family physician*, *52*(7), 862-868.
- Gandhi, S., & Abramov, A. (2012). Mechanism of oxidative stress in neurodegeneration. Oxidative medicine and cellular longevity, 2012:428010.
- Geisler, S., Holmström, K. M., Skujat, D., Fiesel, F. C., Rothfuss, O. C., Kahle, P. J., & Springer, W. (2010). PINK1/Parkin-mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1. *Nature cell biology*, 12(2), 119-131.
- Glick, D., Barth, S., & Macleod, K. F. (2010). Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *The Journal of pathology*, 221(1), 3-12.
- Gomez-Lazaro, M., Bonekamp, N. A., Galindo, M. F., Jordán, J., & Schrader, M. (2008). 6-Hydroxydopamine (6-OHDA) induces Drp1-dependent mitochondrial fragmentation in SH-SY5Y cells. Free Radical Biology and Medicine, 44(11), 1960-1969.
- Halliwell, B. (2006). Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now?. Journal of neurochemistry, 97(6), 1634-1658.
- Hsu, L., Sagara, Y., Arroyo, A., Rockenstein, E., Sisk, A., Mallory, M., & Masliah, E. (2000).
 α-Synuclein promotes mitochondrial deficit and oxidative stress. The American journal of pathology, 157(2), 401-410.
- Indo, H., Yen, H., Nakanishi, I., Matsumoto, K., Tamura, M., Nagano & Minamiyama, Y. (2015). A mitochondrial superoxide theory for oxidative stress diseases and aging. *Journal of clinical biochemistry and nutrition*, 56(1), 1.
- Kamp, F., Exner, N., Lutz, A. K., Wender, N., Hegermann, J., Brunner, B. & Eimer, S. (2010). Inhibition of mitochondrial fusion by α-synuclein is rescued by PINK1, Parkin and DJ-1. *The EMBO journal*, 29(20), 3571-3589.
- Kim, G., Kim, J., Rhie, S., & Yoon, S. (2015). The Role of Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. *Experimental neurobiology*, 24(4), 325-340.
- Kontopoulos, E., Parvin, J. D., & Feany, M. B. (2006). α-synuclein acts in the nucleus to inhibit histone acetylation and promote neurotoxicity. *Human molecular genetics*, 15(20), 3012-3023.
- Kuznetsov, A. V., Hermann, M., Saks, V., Hengster, P., & Margreiter, R. (2009). The cell-type specificity of mitochondrial dynamics. The international journal of biochemistry & cell biology, 41(10), 1928-1939.
- Lehninger, A. L., Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2005). *Principios de Bioquimica*. Barcelona: Omega.
- Lépori, L (2005). Parkinson. Buenos Aires: ECSA [1ªed.] [Disponible en www.miniatlas.com consultado el 26-05-2016]
- Liang, C. L., Wang, T. T., Luby-Phelps, K., & German, D. C. (2007). Mitochondria mass is low in mouse substantia nigra dopamine neurons: implications for Parkinson's disease. *Experimental neurology*, 203(2), 370-380.
- Liesa, M., Palacín, M., & Zorzano, A. (2009). Mitochondrial dynamics in mammalian health and disease. *Physiological reviews*, 89(3), 799-845.
- Lin, M. T., & Beal, M. F. (2006). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature*, *443*(7113), 787-795.
- Losón, O. C., Song, Z., Chen, H., & Chan, D. C. (2013). Fis1, Mff, MiD49, and MiD51 mediate Drp1 recruitment in mitochondrial fission. *Molecular biology of the cell*, 24(5), 659-667.

- Lynch-Day, M. A., Mao, K., Wang, K., Zhao, M., & Klionsky, D. J. (2012). The role of autophagy in Parkinson's disease. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 2(4), 9357.
- Mani, S. (2015). Production of reactive oxygen species and its implication in human diseases. In Free Radicals in Human Health and Disease (pp. 3-15). Springer India.
- Maroteaux, L., Campanelli, J. T., & Scheller, R. H. (1988). Synuclein: a neuron-specific protein localized to the nucleus and presynaptic nerve terminal. *The Journal of Neuroscience*, 8 (8), 2804-2815.
- Mizushima, N. (2007). Autophagy: process and function. Genes & development, 21(22), 2861-2873.
- Nakamura, N; Nemani, M; Azarbal, F.; Skibinski, G.; Levy, J.; Egami, K.; Munishkina, L.; Zhang, J; Gardner, B.; Wakabayashi, J. Direct membrane association drives mitochondrial fission by the Parkinson disease-associated protein α-synuclein, *Journal of Biological Chemistry* 286 (2011) 20710-20726.
- Navarro, A., & Boveris, A. (2007). The mitochondrial energy transduction system and the aging process. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 292(2), 670-686.
- Ozansoy, M., & Başak, A. (2013). The central theme of Parkinson's disease: α-synuclein. Molecular neurobiology, 47(2), 460-465.
- Parkinson, J. (2002). An Essay on the Shaking Palsy, Journal of Neuropsychiatry Clinical Neurosciences. Neuropsychiatry Classics. 14:2.
- Pernas, L., & Scorrano, L. (2015). Mito-Morphosis: Mitochondrial Fusion, Fission, and Cristae Remodeling as Key Mediators of Cellular Function. *Annual review of physiology*. 10 (78), 505-31.
- Polymeropoulos, M., Lavedan, C., Leroy, E., Dehejia, A., Dutra, A. & Stenroos, E. (1997).
 Mutation in the α-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science*, 276(5321), 2045-2047.
- Qi, X., Qvit, N., Su, Y. C., & Mochly-Rosen, D. (2013). A novel Drp1 inhibitor diminishes aberrant mitochondrial fission and neurotoxicity. *Journal of cell science*, *126*(3), 789-802.
- Rambold, A. S., & Lippincott-Schwartz, J. (2011). Mechanisms of mitochondria and autophagy crosstalk. Cell Cycle, 10(23), 4032-4038.
- Sagan, L. (1967). On the origin of mitosing cells. Journal of theoretical biology, 14(3), 225-IN6.
- Schapira, A. (2008). Mitochondria in the aetiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *The Lancet Neurology*, 7(1), 97-109.
- Schulz-Schaeffer, W. J. (2010). The synaptic pathology of α-synuclein aggregation in dementia with Lewy bodies, Parkinson's disease and Parkinson's disease dementia. *Acta neuropathologica*, 120 (2), 131-143.
- Sheikh, S., Haque, E., & Mir, S. S. (2012). Neurodegenerative diseases: multifactorial conformational diseases and their therapeutic interventions. *Journal of neurodegenerative* diseases, vol. 2013.
- Shirihai, O. S., Song, M., & Dorn, G. (2015). How mitochondrial dynamism orchestrates mitophagy. *Circulation research*, *116*(11), 1835-1849.
- Singleton, A. B., Farrer, M., Johnson, J., Singleton, A., Hague, S., Kachergus, J. & Lincoln, S. (2003). α-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science*, 302(5646), 841-841.
- Spillantini, M., Crowther, R., Jakes, R., Hasegawa, M., & Goedert, M. (1998). α-Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95 (11), 6469-6473.
- Tatsuta, T., & Langer, T. (2008). Quality control of mitochondria: protection against neurodegeneration and ageing. *The EMBO journal*, 27(2), 306-314.

- Turrens, J. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. The Journal of physiology, 552(2), 335-344.
- Uversky, V. N., Li, J., Souillac, P., Millett, I. S., Doniach, S., Jakes, R., & Fink, A. L. (2002). Biophysical Properties of the Synucleins and Their Propensities to Fibrillate inhibition of α-synuclein assembly by β-and γ-synucleins. *Journal of Biological Chemistry*, 277 (14), 11970-11978.
- Varkey, J., Isas, J. M., Mizuno, N., Jensen, M. B., Bhatia, V. K., Jao, C. & Langen, R. (2010). Membrane curvature induction and tubulation are common features of synucleins and apolipoproteins. *Journal of Biological Chemistry*, 285(42), 32486-32493.
- Von Stockum, S., Nardin, A., Schrepfer, E., & Ziviani, E. (2015). Mitochondrial dynamics and mitophagy in Parkinson's disease: A fly point of view. Neurobiology of disease.
- Westermann, B. (2010). Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nature reviews Molecular cell biology*, *11*(12), 872-884.
- Yin, X. M., Ding, W. X., & Gao, W. (2008). Autophagy in the liver. *Hepatology*, 47(5), 1773-1785.
- Youle, R., & Narendra, D. (2011). Mechanisms of mitophagy. *Nature reviews Molecular cell biology*, *12*(1), 9-14.
- Zarranz, J., Alegre, J., Gómez-Esteban, J., Lezcano, E., Ros, R., Ampuero, I. & Llorens, V. (2004). The new mutation, E46K, of α-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia. *Annals of neurology*, 55(2), 164-173.

Hípótesis y Objetívos

1. Hipótesis de estudio

Las enfermedades neurodegenerativas se caracterizan por un conjunto de disfunciones en el metabolismo neuronal de zonas específicas del cerebro. Estas disfunciones suelen acarrear una pérdida progresiva de estas células en estadios avanzados de las patologías. Con el descubrimiento de proteínas tales como αsinucleina, β-amiloide y huntingtina entre otras, en cerebros post-mortem de pacientes se asoció el efecto nocivo de estas moléculas con su sobreexpresión en las neuronas afectadas. Estas proteínas pueden presentar ganancia de función, cambios en su conformación, agregación y mutaciones. Estas evidencias han abierto un amplio campo de investigación acerca del efecto de estos eventos sobre el metabolismo celular. En lo referente a AS, hasta la actualidad se continúa tratando de encontrar consenso sobre el comportamiento de α -sinucleina en condiciones fisiológicas y patológicas. Uno de los blancos más estudiados de esta molécula es la mitocondria. Sin embargo, los mecanismos por los cuales αsinucleína afecta la funcionalidad mitocondrial o es capaz de interactuar con esta organela permanecen poco esclarecidos. En base a los antecedentes descriptos, la hipótesis de este trabajo propone que AS se incorpora a la mitocondria y se distribuye en sus distintos compartimientos. En esas localizaciones, esta proteína generaría disfunción mitocondrial incidiendo negativamente sobre distintos parámetros metabólicos, sobre la dinámica mitocondrial y la autofagia.

2. Objetivo general

Estudiar la localización submitocondrial de la α-sinucleína y su efecto sobre la función mitocondrial en mitocondrias aisladas de cerebro de rata y en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y.

2.1 Objetivos específicos

- **2.1.1** Estudiar la localización de AS en los distintos compartimientos mitocondriales empleando mitocondrias aisladas de cerebro de rata.
- **2.1.2** Evaluar el rol de AS sobre la funcionalidad mitocondrial en mitocondrias aisladas de cerebro de rata.
- **2.1.3** Investigar los efectos de la sobreexpresión de AS sobre la morfología y los procesos de fusión y fisión mitocondrial en células SH-SY5Y. Analizar el rol de Drp-1 en los eventos de fisión.
- **2.1.4** Analizar el rol de la AS en el proceso autofágico y su impacto en el destino celular. Evaluar la ocurrencia de mitofagia en células SH-SY5Y.

Materíales y Métodos

1. Materiales

1.1 Reactivos para cultivos de células eucariotas

Medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle's Medium-F12 (DMEM-F12) y tripsina 0,25% en PBS y EDTA 1 mM (Sigma Aldrich, *Grand Island, MO, USA*). Suero fetal bovino (SFB) (BIO-NOS, *Bs As, Argentina*). Antibióticos: penicilina 100U/ml, estreptomicina 100μg/ml (Richet S.A., *Argentina*) y Glutamina 2mM (Parafarm, *Argentina*).

1.2 Reactivos y soluciones generales

- Acrilamida-Bisacrilamida Solución 30%, 29:1 N° 161-0156 (BIO-RAD Life Sciences, Miami Lakes, Florida).
- ADP (Adenosina 5'-difosfato) N° 01905, ATP (Adenosina 5' trifosfato) N° A9187, Citocromo c N° C7752, DAPI (4',6-Diamidino-2-fenilindol dihidrocloruro), DCFH-DA (2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato, D6883), Ditionito de sodio (Na₂S₂O₄), N° 71699, CCCP (Carbonilcianida 3-clorofenilhidrazona) N° C2759, Mowiol 4-88 (Poli-vinil alcohol) N° 81381, MTT (4,5-dimetiltiazol-2,5-difeniltetrazolium), TEMED (N,N,N',N'-Tetrametiletilenediamina) N° T9281, NADH (β-niconitamida adenina dinucleótido como sal dipotásica) N° 4505, Oligomicina A N° 75351, Rotenona, R8875, Succinato de sodio dibásico hexahidratado N° S9637 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA).
- DMSO (dimetilsulfóxido) SIN-061003-0 (Sintorgan, Bs As, Argentina).
- ECL Prime Western Blotting Reactivo de detección N° RPN2232 (Amersham, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK).
- IPTG (isopropil-β-D-thiogalactopiranosido), N° V3951 (PROMEGA, Madison, USA).

- Luria Broth Base (medio LB) Nº 12795-084 (Invitrogen, California, USA).
- Mdivi-1 (3-(2,4-dicloro-5-metoxifenil)-2-sulfanil-4(3H)-quinazolinona (Santa Cruz Biotechnology, California, USA).
- Membrana de PVDF P 0.45 N° 10600023 (GE Healthcare Life Sciences, Amersham, Alemania)
- MitoSOX Red (indicador de superóxido mitocondrial) Nº M36008
 (Invitrogen, Molecular probes, Oregon, USA).
- Mitotracker Deep Red 633 N° M22426 y MitoTracker Red CMXRos N° M7512 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA).

Todos los demás reactivos utilizados fueron de grado biología molecular o grado analítico según el caso.

1.3 Anticuerpos

-Anticuerpos primarios monoclonales:

- anti- α -synuclein, N° 610786 (1:1000) (*BD Biosciences, New Jersey, USA*).
- anti-TOM20, (FL-145) (1:1000) sc-11415 (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA).
- anti-Opa-1, N° 612607 (1:1000); anti-Drp-1 N° 611113 (1:400) (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA).
- anti-Complex III subunit core 1-OxPhos, N° 459140 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA).
- Anti-Complex I GRIM-19, N° 438900 (1:500) *(Invitrogen, St Louis, USA).*-Anticuerpos primarios policionales:
 - anti-MnSOD, N° 06984 (1:1000) (Millipore, CA, USA)

anti-VDAC 1/2/3, (FL-283) sc-98708 (1:300), anti-Citocromo c (A-8) sc-13156 (1:500), anti-MAP LC3 I/II (N-20) sc-16755, anti- β- Actina(C4) sc-47778 (1:10000) (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA).

-Anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa de rábano:

• anti-IgG rabbit-HRP sc-2030 (1:1000), anti- IgGmouse-HRP sc-2031 (1:1000) (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA).

-Anticuerpos secundarios acoplado a fluoróforos y a oro:

- Alexa Fluor 488 anti-mouse IgG (A-11034) (1:1000), Alexa Fluor 647 anti-rabbit (A-11036) (1:1000), Alexa Fluor 555 anti-mouse (1:1000) (A-21422),
 Alexa Fluor 555 anti-goat (1:1000) (A-21432) (Molecular Probes, Invitrogen, OR, USA).
- Anti-Mouse IgG-Gold antibody (G7652) (1:50) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA).

1.4 Cepas de bacterias

Escherichia coli DH5α F-, endA1, hsdR17 (rk-mk-), supE44, thi1, recA1, gyrA(NaIr), relA1, Δ (lacZYA-argF) U169, ϕ 80-d lacZ Δ M15: para transformación y obtención de plásmidos.

Escherichia coli BL21(DE 3) F-, ompT, hsdS (r-m-), dcm, gal, (DE3) tonA : para transformación y expresión de proteínas *in vitro*.

1.5 Líneas celulares

Se utilizó la línea celular SH-SY5Y (ATCC® CRL-2266™) de *Homo* sapiens.

1.6 Animales de laboratorio

Se utilizaron ratas macho *Wistar* de 8 semanas de edad (250-300 gramos de peso) para el aislamiento de las mitocondrias de cerebro. Las mismas fueron provistas por el Bioterio Central de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires. El tratamiento de los animales se realizó bajo las normas vigentes de la Comisión Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la FCEN.

1.7 Plásmidos

pCI-neo mAtg5^{WT} y pCI-neo mAtg5^{K130R}: fueron cedidos por el Dr. Noburu Mizushima (Universidad de Tokyo, Japón) y el Dr. Tamotsu Yoshimori (Universidad de Osaka, Japón) y amplificados por la Dra. R. Gorojod en el Laboratorio de Disfunción Celular en Enfermedades Neurodegenerativas y Nanomedicina, Dpto. de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires; IQUIBICEN-CONICET.

Los plásmidos pcDNA3-ASwt, pT7-7-ASwt, pT7-7-A90C y pt7-7-A140C fueron cedidos por el Dr. T. Jovin (Max Planck Institute, Göettingen, Alemania).

Los vectores pcDNA3-GFP y pcDNA3 son parte del stock disponible en el laboratorio Laboratorio Interdisciplinario de Dinámica Celular y Nanoherramientas, Dpto. de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires; IQUIBICEN-CONICET.

2. Métodos

2.1 Preparación de bacterias competentes

Se generaron bacterias competentes de la cepa DH5α de *E. coli* para la amplificación de plásmidos y BL21 de *E. Coli* para la expresión de proteínas recombinantes. Se partió de un cultivo de 10mL de medio completo Luria-Bertani (LB) (Peptona 1%; Extracto de Levadura 0,5%; NaCl 1%; pH 7) sin ampicilina que se dejó crecer durante la toda la noche (ON) a 37°C con agitación. A continuación, se sembraron 2mL de este cultivo bacteriano en 40mL de medio LB y se dejó agitando a 37°C hasta llegar a una densidad óptica (DO) de 0,4-0,6 medida a 600 nm. Posteriormente, se centrifugó a 3.000rpm durante 5min a 4°C y el pellet resultante se resuspendió en 16mL de CaCl₂ 50mM estéril y se incubó durante 15min en hielo. Nuevamente, se realizó una centrifugación a 3.000rpm durante 2min a 4°C y finalizado este paso, se resuspendió el pellet en 2mL de CaCl₂ 50mM y glicerol 15%. Por último, se armaron *stocks* de bacterias competentes con alícuotas de 100μL y éstas fueron congeladas a -80°C.

2.2 Transformación de bacterias competentes

Las bacterias competentes (100μL) se transformaron con 1-2μg de los plásmidos de interés (con resistencia a ampicilina) incubando durante 30min en hielo y luego sometiéndolas a un *shock* térmico (42°C durante 1min y posterior pasaje a hielo durante 5min). Se les agregó 1mL de LB sin antibiótico y se incubó 1h con agitación a 37°C. Una alícuota del cultivo (100μL) se expandió en una placa con LB-ampicilina (50μg/mL) y se incubó ON a 37°C. Se seleccionó una colonia y se la dejó crecer ON en 100mL de medio LB con ampicilina. Al día siguiente, se tomaron 400μL del cultivo y se preparó un *stock* agregando glicerol a una concentración final de 15% y se almacenó a -80°C.

2.3 Extracción de ADN plasmídico: lisis alcalina

El volumen restante (~100mL) crecido en LB-ampicilina se centrifugó a 6.000g 15min a 4°C. Se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 10 mL de la solución 1 (Tris-HCl 25mM; EDTA 10mM; Glucosa 50mM; RNAasa A 2mg/mL; pH 8) y se agitó en vortex. Luego se agregaron 10mL de la solución 2 (NaOH 0,2M; SDS 1%) y se mezcló por inversión de 4 a 6 veces. Por último, se agregaron 10mL de la solución 3 (Acetato de potasio 5M; Ácido acético glacial 3M; pH 5,5) y se mezcló por inversión para lograr la precipitación del ADN genómico. Se incubó en hielo durante 20min y se procedió a centrifugar a 20.000 x g 30min a 4°C. El sobrenadante se volvió a centrifugar durante 15min y luego se precipitó al ADN plasmídico con 0,7 volúmenes de isopropanol. Se centrifugó a 15.000 x g 30min a 4°C. El pellet se lavó con etanol frío 70% y se centrifugó nuevamente a 15.000 x g durante 10min a 4°C. Se dejó secar y el pellet se resuspendió en *buffer* TE (Tris HCl 10mM; EDTA 1mM, pH 8).

2.4 Determinación de la concentración del ADN plasmídico

Para determinar la concentración del ADN purificado, se midió la absorbancia a una longitud de onda de 260nm en un equipo NanoDrop1000 Spectrophotometer, THERMO Scientific (*Wilmington, USA*). El equipo muestra directamente la concentración obtenida a partir de la fórmula: $(A / \epsilon x b) x d = C$, donde, A es la absorbancia obtenida a 260nm, ϵ es el coeficiente de extinción molar (50-1 L x M-1 x cm-1), b es el camino óptico y d es la dilución. Por otra parte, para determinar la pureza del ADN, se obtuvieron los valores de las absorbancias a 280nm (proteínas), 260nm (ácidos nucleicos) y 230nm (sales). Se consideró una extracción de ADN con óptima pureza cuando las relaciones A260/A280 y A260/230 resultaban ser \geq 1,8 y 2,3 respectivamente.

2.5 Evaluación del ADN plasmídico por separación en gel de agarosa

Los plásmidos aislados fueron separados por electroforesis en gel de agarosa 0,8% (p/v) en TAE 1 X (Tris-acetato 40mM; EDTA 1mM; pH 8). En cada calle del gel se sembró una mezcla que contenía: 5µl del plásmido a verificar, 5µl buffer TE y 3,5µL de buffer de muestra (Blue/Orange Loading Dye, G188A, Promega, *Madison, USA*) y en paralelo se sembró un marcador de PM (Lambda DNA/ EcoR I + Hind III Marker; Promega, *Madison, USA*). Luego, se procedió a realizar una electroforesis a 80V en buffer TAE 1X. Finalizada la corrida electroforética, se sumergió el gel en una solución de Bromuro de Etidio (0,5µg/mL en H₂O destilada) durante 30min. Las bandas correspondientes a los plásmidos fueron visualizadas por transiluminación con UV, verificando que el plásmido se encuentre en el PM correspondiente. Además, se constató la purificación del ADN plasmídico por la ausencia de marca inespecífica que podría deberse a ADN genómico.

2.6 Determinación de la concentración de proteínas

La concentración de proteínas se determinó mediante el método de Bradford empleando seroalbúmina bovina (BSA) como proteína patrón. Se hicieron reaccionar 10µl de la muestra correspondiente con 500µl de reactivo de Bradford (Coomasie brillant blue G-250 0,01%; etanol 4,75%; ácido fosfórico 8,5%) durante 15min en oscuridad. Posteriormente, se determinó la densidad óptica a 595nm en el lector de placas PHERAstar BMG Labtech (*Ortenberg, Alemania*) y la concentración de proteínas de determinó aplicando la Ley de Lambert y Beer: A= Cx£xl, donde la absorbancia (A) de una sustancia es directamente proporcional a la concentración (C) de la sustancia absorbente, la longitud del paso de luz (I) y el coeficiente de extinción molar (£), que es característico de cada sustancia a una longitud de onda determinada (Bradford, 1976).

2.7 Obtención de mitocondrias aisladas

2.7.1 Aislamiento de mitocondrias de cerebro de rata

Los animales fueron sacrificados en una cámara de CO₂. Se extrajo el cerebro e inmediatamente se homogeneizó en frío utilizando un mortero de Teflon-potter a 1.500rpm en *buffer* isotónico (Manitol 0,23 M, sacarosa 0,07M, HEPES/KOH 6gr/L, EGTA 1mM, pH=7,4). Se centrifugó a 700 x g durante 10min a 4°C y el sobrenadante resultante se centrifugó nuevamente a 8.000 x g, 10min a 4°C, obteniéndose en el pellet una fracción enriquecida en mitocondrias funcionales. La funcionalidad de las organelas se comprobó mediante una medida del consumo de O₂. La misma consiste en seguir la disminución de la concentración de O₂ con un electrodo, comparando los registros de respiración basal y luego la respiración máxima por agregado del sustrato ADP. El acoplamiento de la cadena respiratoria se evalúa bloqueando la ATP sintasa con oligomicina y comprobando el retorno a la respiración basal. Por último, se disipa el potencial de membrana con el ionóforo carbonil- cianuro 3-clorofenilhidrazona (cccp) y se registra otra vez un estado de respiración máxima. Todos estos pasos dan información sobre la funcionalidad de las mitocondrias aisladas.

2.7.2 Aislamiento de mitocondrias a partir de células SH-SY5Y

El fraccionamiento subcelular se realizó acorde a lo descripto por Galli et al., (2009) para la obtención de las fracciones citosólica y enriquecida en mitocondrias. Luego de la transfección las células se lavaron con PBS y se levantaron mecánicamente empleando un *cell scraper* y colectando la suspensión de células en un mínimo volumen. Posteriormente, se centrifugaron a 1.000rpm durante 5min a TA y el pellet fue resuspendido en buffer MSHE (manitol 0,22M; sacarosa 0,07 M; EGTA 0,5mM; HEPES-KOH 2mM; inhibidores de proteasas: aprotinina 1,54µM y PMSF 0,5mM; pH 7,4). Las muestras se sonicaron a 40% de

potencia durante 10seg en un equipo Fisher Sonic Dismembrator modelo 500 (Fisher Scientific, *Loughborough*, *UK*). A continuación, se centrifugó a 2.000rpm durante 10min y a 4°C, para separar núcleos, los cuales permanecen en el pellet 1. Luego, se centrifugó el sobrenadante 1 durante 20min a 4°C a 10.000rpm, obteniéndose en el pellet 2 la fracción mitocondrial y en el sobrenadante 2, la fracción citosólica. Para obtener una fracción mitocondrial con mayor pureza, libre de ARNm citoplasmático, el pellet 2 fue lavado con 150mM KCl y se volvió a centrifugar a 10.000rpm, durante 10min a 4°C. Finalmente, se obtuvo el pellet 3 que constituye una fracción subcelular enriquecida en mitocondrias.

2.8 Expresión, purificación y marcación de AS

AS salvaje y las variantes A90C y A140C fueron expresadas y purificadas de acuerdo al protocolo reportado por Antony et al., 2003. Se seleccionaron dichas variantes por poseer un grupo –SH disponible para su posterior marcación con un fluoróforo. Se realizaron mínimas modificaciones en la etapa de purificación para A90C y A140C debido a que la presencia de cisteínas requirió la adición del agente reductor Tris (2-carboxietil) fosfina clorhidrato (TCEP).

La expresión de proteínas se llevó a cabo por transformación de *E. coli* BL21 en placas de agar con ampicilina 100µg/mL. Se seleccionó una colonia y se incubó (16h a 37°C) en 10mL de medio LB/ampicilina. Este cultivo fue diluido en 1L de LB/ampicilina y se incubó a 37°C con agitación (200rpm) hasta alcanzar una DO de 0,6-0,8 a 600nm. Posteriormente se indujo la expresión de AS con IPTG 1mM, se mantuvo en cultivo durante 5h, y se cosechó por centrifugación (10min a 3.000 x g). El precipitado fue resuspendido en 15mL de solución de lisis (Tris-HCl 10mM, pH=8/ EDTA 1mM/ PMSF 1mM) y se realizaron 3 ciclos de congelado en N₂ liquído y descongelado en baño de agua a 70°C, seguidos de sonicación. El lisado obtenido se fue colocado en un baño de agua en ebullición durante 20min y luego centrifugado (30min, 2.000 x g, 4°C), con el fin de precipitar los restos de membranas de las bacterias. El sobrenadante fue tratado con sulfato de

estreptomicina (concentración final 10mg/mL) para precipitar el ADN, agitando suavemente a 4°C durante 15min. El ADN fue separado por centrifugación (30min, 20.000 x g, 4°C) y el sobrenadante fue tratado con sulfato de amonio (concentración final 361mg/mL) durante 15min a 4°C, con el fin de precipitar las proteínas. Se centrifugó una vez más (30min, 20.000 x g, 4°C) y se conservó el precipitado conteniendo AS. En el caso de las mutantes con cisteínas (A90C y A140C), la solución de lisis fue suplementada con TCEP 5mM para evitar la oxidación de los tioles. A continuación, el precipitado del tratamiento con sulfato de amonio fue resuspendido en 20mL de solución reguladora Tris-HCl 25mM, pH=7,7 (con TCEP 5mM para las variantes con cisteínas). La solución se filtró con un filtro de polipropileno de 0,45µm con el fin de eliminar partículas en suspensión y luego se purificó la proteína en solución por cromatografía de intercambio iónico en una columna MonoQ 4.6/100PE, No 17-5179-0, (Sigma-Aldrich California, USA), previamente activada con NaCl1M. Se empleó un equipo FPLC (Fast protein liquid chromatography), GE AKTA, Biocad 700E. El sistema se equilibró en solución reguladora Tris-HCl 25mM, pH=7,7 (+ TCEP 5mM para variantes con cisteínas) y se aplicó un gradiente salino de NaCl, la proteína fue eluída aproximadamente a una concentración de NaCl 300mM. Se colectaron las fracciones conteniendo la proteína (detectada por su absorbancia a λ =280nm) y se concentraron juntas utilizando concentradores con un corte de peso molecular de 10kDa hasta llegar a un volumen final de aproximadamente 5mL. La proteína concentrada de dializó contra solución reguladora de fosfato de potasio (K₂HPO₄/KH₂PO₄, 25mM, pH=7,4) y TCEP en caso de cisteínas, durante 48h con cambio de solución a las 24h. Luego de dializada, se ultracentrifugó a 100.000 x g para precipitar posibles agregados. La concentración de la proteína fue calculada midiendo la absorbancia a 280nm y utilizando su coeficiente de extinción molar (5600 M⁻¹ cm⁻¹). Se prepararon alícuotas de la proteína y se congelaron en N₂ liquído para luego guardarlas a -80°C hasta su uso.

2.8.1 Geles SDS-PAGE-Coomasie Blue

Para evaluar la purificación de AS luego del FPLC, la eliminación de agregados por ultracentrifugación y la marcación de la proteína con fluoróforos, se realizaron geles SDS-Page 12-15%. Los geles fueron teñidos con una solución de Coomasie Brilliant Blue R-250 (2,5 g Coomassie R-250; 450mL metanol; 100mL ácido acético glacial y agua bidestilada hasta completar 1L) durante 30min a temperatura ambiente (TA) y en agitación. Luego se destiñeron con una solución conteniendo 150mL de ácido acético y 200mL de metanol y agua bidestilada hasta un volumen final de 1L. La decoloración se realizó durante toda la noche en agitación a TA.

2.8.2 Marcación de AS con fluoróforos

Para llevar a cabo la marcación de AS con fluoróforos, se prepararon 500 μL de A90C ó A140C a concentración final 200μM en solución reguladora de fosfato de potasio 25mM, pH=7,2 y se agregó TCEP, 2mM para mantener reducidos los tioles. Posteriormente, se calculó la concentración del fluoróforo (ATTO-550 y Alexa-647), para obtener 500μL del fluoróforo en DMSO y alcanzar una relación 5:1 respecto a la concentración de proteína. La solución del fluoróforo se colocó por goteo a la de proteína, con agitación, 1h a TA, con el objetivo de mantener homogénea la mezcla y evitar la formación de agregados. Se mantuvo luego a 4°C ON a resguardo de la luz. Para eliminar el exceso del fluoróforo se utilizó una columna de exclusión por tamaño (tamiz molecular) PD-10 (GE Healthcare, *Freiburg, Alemania*). La columna fue previamente equilibrada por pasaje de 5 volúmenes de columna con la solución reguladora de fosfato de potasio y luego se sembró la proteína marcada. Las fracciones fueron colectadas y se midió la concentración de la proteína marcada a λ=280nm y con un coeficiente de extinción 5.600 M⁻¹ cm⁻¹.

2.9 Determinación de la respiración mitocondrial y acoplamiento de la cadena respiratoria

2.9.1 Oxígrafo de Clark

Se midió el consumo de O_2 de mitocondrias aisladas de cerebro. Las mitocondrias recién aisladas se incubaron con AS salvaje en diferentes concentraciones (0, 10 y 100 μ M) con el fin de analizar el efecto que tiene esta proteína sobre el metabolismo mitocondrial.

La respiración mitocondrial fue evaluada calculando la velocidad de respiración de las mitocondrias según el estado metabólico y la disponibilidad de sustratos. Esta última se obtuvo calculando la pendiente de las curvas de concentración de O₂ en función del tiempo, relativa a la concentración de proteínas. Estas velocidades permiten obtener el control respiratorio (CR), que es el cociente entre el estado 3 /estado 4 (E3/E4). Este control es función del grado de acoplamiento de la cadena respiratoria y es un indicador fundamental de la integridad mitocondrial (**Figura 16** y **Tabla 1**). Un CR>3 indica una alta integridad de las mitocondrias.

Para la determinación del consumo de O₂, se utilizó un oxígrafo de Clark previamente calibrado. La calibración se realizó colocando agua bidestilada en la cámara de medida, se seleccionó la temperatura (25°C) y se fijó la señal obtenida como el 100 % de saturación de O₂. A continuación, se agrega una solución concentrada de Na₂S₂O₄ y se fija la señal obtenida como el 0% de saturación de O₂. Para la determinación del consumo de O₂ se colocó en la cámara del oxígrafo a 30°C, 1mL de la solución reguladora para medir respiración (Manitol 0.23M, sacarosa 0,07M, Tris-HCl 20mM, EDTA 1mM, Cl₂Mg 4mM, H₂KPO₄/HK₂PO₄ 5mM, pH=7,4) y aproximadamente 120µg de suspensión de mitocondrias luego de su respectiva incubación con AS. Se agregó una solución de malato (0,6M)/ glutamato (0,4M) como sustrato para activar la cadena respiratoria desde el

complejo I y evaluar el E4 (respiración basal). Luego de registrar durante 2min este parámetro, se agregó ADP (25mM) para evaluar el E3 de respiración máxima. El cálculo de las pendientes de consumo de O_2 para el E3 y el E4 se realiza en las diferentes condiciones experimentales.

A partir de las pendientes, se expresan las velocidades de respiración mitocondrial en ng-átomo de O/min.mg proteína según la siguiente fórmula:

ng-átomo de O/min x mg proteína =
$$2 \times [m (ng O_2/min.mL) \times Vf (mL)]$$

Vm (mL) x [Prot] (mg/mL)

Donde m es la pendiente obtenida del registro, Vf es el volumen final de la reacción en la cubeta, Vm es el volumen de la suspensión de mitocondrias y Prot es la concentración de proteínas mitocondriales. Si bien el oxígrafo mide nmoles de O₂/mL se hace la correspondiente conversión a masa (ng).

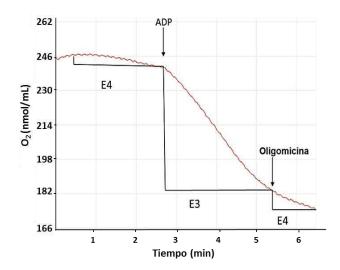


Figura 16: Curva característica de la velocidad de consumo de O₂ de las mitocondrias aisladas. E4= estado 4 que corresponde a la respiración basal de las mitocondrias sin adición de sustrato y activadas desde el CI con malato/glutamato. E3= estado 3 que corresponde a la respiración máxima. El cambio de pendiente corresponde al agregado de ADP y al consecuente aumento de la velocidad de consumo de O₂. El agregado de oligomicina bloquea la actividad de la ATPsintasa (CV) y la mitocondria vuelve a un estado de respiración basal al no poder reducir el O₂.

Estos registros se realizaron en el laboratorio de la Dra. Silvia Álvarez perteneciente a la Cátedra de Físico-Química de Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires.

Estado	Oxígeno	ADP	Sustrato	Consumo de O2	Factor limitante
3	disponible	alto	alto	rápido	cadena respiratoria
4	disponible	bajo	alto	lento	ADP

Tabla 1: Parámetros mitocondriales que definen la integridad de las mitocondrias aisladas. El estado 3 indica el estado de respiración máxima debido al exceso de ADP en el medio con mitocondrias frescas. El estado 4 representa el estado basal respiratorio de las mitocondrias cuando la concentración de ADP es limitante (Adaptado de Lehninger, 2005).

2.9.2 Oxígrafo de alta resolución

El oxígrafo OROBOROS (O2K) (Innsbruck, Austria) se caracteriza por proveer registros de alta resolución para monitorear la función respiratoria mitocondrial empleando pequeñas cantidades de tejido (Gnaiger et al., 2005). En nuestro caso, se estudió cualitativamente el cambio en el consumo de O2 en presencia de diferentes concentraciones de AS (10µM y 100µM) en mitocondrias aisladas de cerebro de rata. Para ello, se partió de 0,2mg/ml de mitocondrias en 2mL de medio de respiración (125mM KCl, 5mM HEPES, 3mM MgCl₂, 2mM KH₂PO4 y 0,5mM EGTA (pH 7.4). Las mediciones de consumo de O₂ se realizaron a 30°C y en agitación (500rpm), abarcando un rango de 0 a 300nmol/mL de O₂. Se agregó una solución para activar la cadena respiratoria desde el CI (10mM de Lglutamato, 2 mM malato y 5mM piruvato), se tomó el registro y luego se bloqueó la actividad de este complejo con rotenona 0,5µM. A continuación se agregó 10mM de succinato para activar la cadena respiratoria desde el CII. La respiración máxima (E3), en ambos casos, se registró luego del agregado de ADP. La respiración basal (E4) se obtuvo por el agregado de un inhibidor del CIII, antimicina A. La adición de los sustratos e inhibidores de la cadena respiratoria correspondientes a cada etapa del registro se utilizó para monitorear la capacidad respiratoria y el acoplamiento de la cadena (Figura 17).

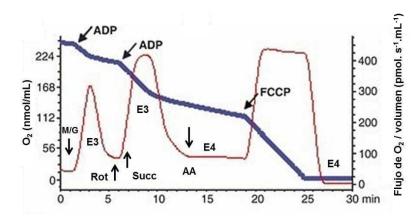


Figura 17: Registro modelo obtenido con el oxígrafo de alta resolución. La curva azul indica la disminución de la concentración de O₂ y la roja el flujo de O₂ mitocondrial. El agregado de malato/glutamato (M/G) activa la cadena respiratoria desde el CI y la adición de ADP permite el paso del E4 al E3 de respiración máxima. El agregado de rotenona (Rot) inhibe al CI y el de succinato (Succ) activa la cadena respiratoria desde el CII. Un agregado adicional de ADP permite registrar nuevamente el E3. Luego se bloquea la cadena agregando antimicina A (AA) y se registra el E4 de reposo. Cuando se agrega el ionóforo Trifluorometoxi Carbonil Cianida Fenilhidrazona (FCCP), se disipa el potencial de membrana mitocondrial y se registra la máxima respiración que, en el caso de coincidir con el valor del agregado de ADP, confirma el acoplamiento de la cadena respiratoria. Estos experimentos fueron realizados en colaboración con el grupo del Dr. Rafael Radi y la Dra. Adriana Cassina, CEINBIO, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

2.10 Velocidad de producción de ATP en mitocondrias aisladas

El ATP producido por las mitocondrias en presencia de AS 0, 10 y 100μM (15min, 25°C) se determinó a través de una técnica quimioluminiscente basada en el sistema luciferina-luciferasa:

luciferasa + luciferina + ATP → luciferasa-luciferil-AMP + Pi luciferasa-luciferil-AMP + O_2 → luciferasa + Oxiluciferina + AMP + O_2 + hv El ATP generado se determinó en un medio de reacción conteniendo KCl 120mM; Tris-HCl 20mM; EDTA 1,6mM; BSA 0,08%; K₂HPO₄/KH₂PO₄ 8mM; MgCl₂ 0,08mM; pH 7,4; Tris-acetato 0,04M (pH 7,75); luciferina 0,04mM; luciferasa 1μg/ml y 30-50μg de mitocondrias frescas y acopladas. Para determinar la velocidad de producción de ATP se agregó Malato 1mM, Glutamato 1mM y ADP 0,1 mM. Las mediciones se realizaron en un contador de centelleo líquido LKB Wallack 1209 Rack beta liquid scintillation counter (Perkin Elmer, *Argentina*) y se realizaron lecturas cada 15s durante 3min. Para expresar los resultados, se realizó una curva de calibración utilizando distintas cantidades de ATP (de 0 a 100 nmoles) (Vives-Bauza et al., 2007). El contenido de ATP se expresó en nmol ATP/mg prot. y la velocidad de producción de ATP como nmol ATP/min.mg prot. Es importante destacar que debe analizarse el grado de acoplamiento de las mitocondrias de la muestra en forma previa a la determinación de la producción de ATP.

2.11 Producción de O₂ en mitocondrias aisladas

Se utilizó la sonda MitoSOX Red como indicador de la producción de anión superóxido (O2⁺) mitocondrial. El MitoSOX Red es un derivado catiónico del dihidroetidio (DHE) que es capaz de ingresar al interior de células vivas y dirigirse específicamente a la mitocondria. Una vez allí, puede ser oxidado por radicales O2⁺ para formar 2-hidroximitoetidio, el cual presenta una intensa fluorescencia roja al unirse a ácidos nucleicos con pico de excitación a 510nm y de emisión a 595nm. De modo similar al DHE, el MitoSOX Red puede reaccionar con otros oxidantes para formar mitoetidio, que fluoresce en la misma longitud de onda que el 2-hidroximitoetidio. Sin embargo, es posible detectar independientemente el producto específico de la oxidación del MitoSOX Red por O2⁺ ya que el mismo posee un pico de excitación a 400nm, que no comparte con el mitoetidio (Robinson et al., 2008).

Las mitocondrias aisladas de cerebro de rata se incubaron con AS salvaje 10 y 100μM. Luego de 15 min a 25°C se centrifugó suavemente (700 x g, 2min) y se descartó el sobrenadante. Las mitocondrias presentes en el pellet, se lisaron por shock osmótico y se realizó una centrifugación a 10.000 rpm, 10min. Luego se tomaron 70μL del sobrenadante (aproximadamente 30 μg de proteínas) y se colocaron en pocillos de placas oscuras. Se agregó MitoSOX Red 10 μM final, se incubó 10min a 37°C, en oscuridad y se midió la fluorescencia de los ROS inespecíficos a λex: 485nm; λem: 590nm y de O_2^{\bullet} a λex: 420nm: λem: 590nm.

2.12 Microscopía electrónica de transmisión

Las mitocondrias incubadas con AS 100µM durante 30min a 37°C se centrifugaron a 5.000 rpm 15min a 4°C y el pellet se fijó con una mezcla de glutaraldehído 0,05% y PFA 2% en PBS durante 1h a 4°C. Luego de la fijación, las muestras fueron embebidas en la resina LR White hidrofílica (London ResinWhite resin-Polyscience, Inc. 17411), según el protocolo descripto previamente (Harris et al., 1995) y posteriormente cortadas en secciones ultrafinas de aproximadamente 80nm con un ultramicrótomo (Sorvall MT2B, *Oshawa, Canadá*).

Para realizar la inmunomarcación, primero se inactivó el exceso de glutaraldehído con glicina 100mM durante 20min. Luego se agregó Proteinasa K 100 μg/mL durante 40min para exponer los epítopes de AS y se bloqueó con BSA 3% en PBS durante 1h a TA. Posteriormente se incubó con el anticuerpo primario anti-AS en una dilución 1/30, ON a 4°C. Se realizaron 3 lavados con PBS de 10min cada uno. Luego se incubó (1h a TA) con un anticuerpo secundario conjugado con oro (5nm) en una dilución 1/50, y se realizaron 3 lavados con PBS de 10min cada uno. Posteriormente, el material se contrastó con acetato de uranilo (2% m/v) durante 30min. Las imágenes fueron tomadas con un microscopio electrónico de transmisión Philips EM 301 (*Illinois, USA*) a una magnificación de 70.000X.

2.13 Transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET)

Se evaluó por FRET la interacción entre TOM20 y AS con el fin de dilucidar un posible mecanismo de entrada de la proteína a la mitocondria. La AS marcada con el fluoróforo ATTO-550 se utilizó como *donor*. TOM20 se marcó con un anticuerpo secundario Alexa647 y fue utilizado como *aceptor*. Las mitocondrias se incubaron con AS durante 30min a 37°C, luego se adhirieron a cubreobjetos con previo *coating* de poli-L-lisina durante 20min.

La técnica de FRET se basa en la interacción fotofísica entre dos fluoróforos. Cuando dos moléculas fluorescentes están próximas (<10nm) la energía de excitación puede ser transferida de manera no radiativa de una hacia otra, como resultado de la formación de un dipolo-dipolo. Por lo tanto, la energía fluye desde un donor excitado a un aceptor con una eficiencia dependiente del par de fluoróforos elegido.

Para este experimento se siguió el protocolo descripto por Grecco y Bastiaens en, 2010 (Grecco & Bastiaens, 2010). Primero se caracterizaron los factores que provocan *bleed-through* (B) y los que producen excitación directa (C). Para el *bleed-through* se tomaron imágenes del donor utilizando el filtro de FRET ($I_{DA}^{solo\ donor}$). Luego se adquirieron imágenes de la misma muestra con el filtro del donor ($I_D^{solo\ donor}$) y se calculó B:

$$B = \frac{\left(I_{DA}^{\text{solo donor}} \right)}{\left(I_{D}^{\text{solo donor}} \right)}$$

Para la excitación directa se tomaron imágenes de muestras marcadas sólo con el aceptor utilizando el filtro de FRET (I_{DA}^{solo} aceptor), luego se tomaron imágenes con el filtro del aceptor (I_A^{solo} aceptor) y se calculó C:

$$C = \frac{\left(I_{DA}^{\text{solo aceptor}} \right)}{\left(I_{A}^{\text{solo aceptor}} \right)}$$

Estos cocientes se realizaron con los valores medios de todas las imágenes tomadas en estas condiciones. I_{DA} es el canal de FRET, I_{D} es el canal del donor e I_{A} es el canal del aceptor.

Una vez realizados estos controles, se procedió a tomar las imágenes de las muestras marcadas con los dos fluoróforos mencionados. Se adquirieron imágenes con I_D , con I_{DA} y con I_A . Luego se procedió a calcular la emisión (sensitized emission, I_{SENS}) utilizando los factores B y C calculados previamente y las imágenes capturadas con I_D , I_{DA} e I_A . Se corrigieron todas las imágenes sustrayendo el *background*:

$$I_{SENS} = I_{DA} - B.I_{D} - C.I_{A}$$

Con este valor, se calcula finalmente la eficiencia aparente de energía transferida en cada pixel (AFEa, por sus siglas en inglés *apparent FRET efficiency, a: acceptor*):

AFEa=
$$\frac{I_{DA} - B.I_D - C.I_A}{I_A} = \frac{I_{SENS}}{I_A}$$

Para su mejor visualización, se multiplicó la imagen de AFEa por una máscara binaria obtenida a partir de la imagen en el canal del aceptor, que es la señal mitocondrial marcando TOM20. Los valores ubicados en zonas donde existe la señal mitocondrial son multiplicados por 1 y mantienen su escala de color. Las zonas correspondientes al fondo de la imagen son multiplicadas por 0 y aparecen de color negro.

2.14 Fraccionamiento submitocondrial

Para evaluar la localización mitocondrial de AS, se realizó fraccionamiento de las mitocondrias aisladas obteniéndose los 4 compartimientos mitocondriales: MME, EI, MMI y MA. Para ello, se lisaron las mitocondrias mediante un shock osmótico con H₂OmQ durante 5min y luego el lisado se centrifugó 10min a 12.000 x g, para obtener un sobrenadante rico en MME y El (Sobrenadante A). El precipitado, correspondiente a los mitoplastos, se sonicó (40W, 60seg a 4°C) y luego se realizó una centrifugación a 8.000 x g durante 10min para obtener un sobrenadante rico en MMI y MA (Sobrenadante B). Posteriormente, los sobrenadantes A y B fueron sometidos a ultracentrifugación a 100.000 x g durante 30min. A partir del sobrenadante A se obtuvo un nuevo sobrenadante enriquecido en El y un precipitado correspondiente a la MME mientras que del sobrenadante B se obtuvo un sobrenadante enriquecido en MA y un pellet conteniendo MMI (Antico-Arciuch et al., 2009). La localización de AS en una o más de estas fracciones fue analizada por western blot (SDS-PAGE, 12%) empleando un anticuerpo específico para AS. Los controles del fraccionamiento se realizaron utilizando marcadores específicos de cada fracción mitocondrial.

2.15 Cultivo celular

Las células SH-SY5Y (pasajes 6-25) (Park & Kim, 2013) se cultivaron en medio mínimo esencial Dulbecco, alta glucosa (DMEM-F12) con 10% de suero fetal bovino, 100 IU/ml penicilina, 100µg/ml estreptomicina, 10mM de piruvato de sodio y 10mM de aminoácidos no esenciales. Las células se incubaron en una estufa Thermo Scientific Heraeus (*Alemania*), con humedad en saturación, 5% CO₂ y a 37°C hasta un 70-80% de confluencia. Los pasajes se efectuaron utilizando tripsina 0,25% con 1mM de EDTA en PBS para remover las células y pasarlas a placas nuevas. En el caso de la preparación de los *stocks*, las células cosechadas se resuspendieron en 1mL de medio de cultivo completo con 10% de

DMSO y se almacenaron en N_2 (liq). Se sembraron $2x10^4$ células por pocillo en placas de 96 pocillos, $5x10^5$ células en placas de 6 pocillos y $3x10^4$ células en placas de 12 pocillos hasta que llegaron a un 70% de confluencia.

2.16 Transfección con ADN plasmídico

Las células SH-SY5Y se transfectaron con los plásmidos correspondientes utilizando como medio de transfección polietilenimina (PEI) (Hsu et al., 2012). Para ello se preparó una mezcla de PEI: ADN (3:1) en medio de cultivo sin suero, se agitó en *vortex* de 10 a 15 seg y se dejó 10min dentro del flujo laminar. Transcurrido ese tiempo, se agregó la mezcla a cada pocillo conteniendo las células, por goteo tratando de cubrir toda la superficie. La mezcla de transfección permaneció 5 h en la estufa a 37°C y luego se reemplazó por medio fresco completo.

2.17 Inmunocitoquímica

Se sembraron 3×10^4 células sobre cubreobjetos de 12mm recubiertos con Poly-D-lisina colocados en placas de 12 pocillos con medio de cultivo DMEM/F12 completo. Luego de realizar los tratamientos correspondientes, se descartó el medio de cultivo y se realizaron 2 lavados con PBS (500μ L por pocillo). Posteriormente, se fijaron las células con PFA 4% durante 20min a TA y se realizaron 3 lavados con PBS de 10min cada uno.

Luego, se permeabilizaron las células con Tritón 0,05% en PBS, 10min a TA (400 µL por pocillo) para permitir que los anticuerpos primarios puedan acceder a su blanco. Se realizaron 2 lavados con PBS de 10min y un bloqueo con solución de BSA 3% en PBS durante 1h a TA. Transcurrido ese tiempo, se descartó la solución y se agregaron las diluciones de los anticuerpos primarios en BSA 3%. Se incubaron durante 1h a TA. Se realizaron 3 lavados de 10min cada uno con PBS. Posteriormente se procedió a la incubación con los anticuerpos secundarios

durante 1h a TA. Se realizaron 3 lavados con PBS de 10min. En los casos en que se realizó co-tinción con DAPI 1µM para marcar los núcleos de las células, se incubó con este colorante, 10min a TA en oscuridad y se lavó 3 veces con PBS. Finalmente se realizó el montaje colocando los vidrios sobre una gota de medio de montaje Mowiol (20 µL por vidrio).

Cuando se realizaron inmnocitoquímicas de mitocondrias aisladas, se procedió de la siguiente manera: las mitocondrias aisladas se incubaron durante 30min a 37°C con la mutante A90C marcada con el fluoróforo ATTO-550-maleimido a concentraciones 1 y 10µM. Luego se colocaron sobre cubreobjetos tratados con poli-L-lisina, se fijaron y se procedió como se describe arriba para las células.

2.18 Determinación de la viabilidad celular

2.18.1 Ensayo de reducción de MTT

Las sales de tetrazolio, como el MTT, poseen un anillo que es capaz de ser reducido por varias deshidrogenasas celulares generando formazan, un producto azul oscuro y parcialmente insoluble. Esta reacción tiene lugar en todas las células metabólicamente activas y es, por lo tanto, un indicador de viabilidad celular. Se siguió la metodología original descripta por Mosman, 1983 (Mosman et al., 1983) con ligeras modificaciones (Alaimo et al., 2011). Luego de la transfección, las células se lavaron con PBS y se incubaron con MTT 0,125 mg/mL en medio de cultivo sin suero a 37°C durante 90min. Transcurrido este tiempo, se retiró el medio y el formazan se solubilizó en 200µL de DMSO. La absorbancia se midió a 570nm y se le restó la absorbancia de referencia medida a 655nm.

2.18.2 Determinación de los niveles de ATP

Se empleó el kit comercial Cell Viability Assay (PROMEGA, *Madison, USA*). En este caso, se genera una señal luminiscente que es proporcional a la cantidad de ATP liberado al medio, en presencia de luciferasa y Mg²⁺, mediante la siguiente reacción:

El ATP presente se cuantifica en base a una curva de calibración obtenida con concentraciones conocidas. Se considera que la señal luminiscente es proporcional al número de células metabólicamente activas, y por lo tanto es un índice de la viabilidad celular. Las medidas de luminiscencia se realizaron en un lector de placas PHERAstar FS BMG LABTECH (*Ortenberg, Alemania*).

2.18.3 Liberación de LDH

La liberación de LDH al medio de cultivo es un indicador de la pérdida de integridad de membrana plasmática. Se utilizó el kit comercial CytoTox-ONE™ *Homogeneous Membrane Integrity Assay* (PROMEGA, *Madison, USA*). La liberación de LDH al medio genera una señal fluorescente debida al resofurin, de acuerdo a las siguientes reacciones:

Las mediciones de todos los ensayos mencionados se realizaron utilizando un lector de placa PHERAstar BMG Labtech (*Ortenberg, Alemania*).

2.19 Generación de ROS

Para detectar los niveles de ROS se utilizó el reactivo: 2',7'-diclorofluoresceína-diacetato (DCFH-DA). Este compuesto difunde dentro de la célula y es desacetilado por esterasas celulares a un compuesto no fluorescente 2', 7'-diclorodihidrofluorescina (DCFH), que es rápidamente oxidado a la especie fluorescente 2', 7'- diclorofluoresceina (DCF), por acción de las ROS presentes. Se siguió la metodología puesta a punto en nuestro laboratorio (Gara et al., 2012).

Las células fueron cultivadas en placas de 96 pocillos. Posteriormente se retiró el medio de cultivo y se lavó suavemente una vez con PBS. Luego se agregaron 200µL de medio RPMI sin suero y sin rojo fenol con DFCH-DA a concentración final de 15µM. La placa se incubó durante 30 min a 37°C en la estufa y protegida de la luz. Una vez finalizada la incubación, el medio se pasó a una placa negra para medir la fluorescencia. Se realizó un lavado con PBS y se pasó a placa para su medición. Las células se incubaron con una solución de lisis hipotónica (KCI 7,5mM, pH=7) durante 1 h a 37°C protegidas de la luz. Luego se homogeneizó el lisado y la placa se centrifugó a 4.500 rpm 15min para bajar las membranas. El sobrenadante resultante se pasó a una placa oscura y se midió la fluorescencia. Los datos obtenidos se relativizaron a la cantidad de proteína presente. Las medidas de fluorescencia se realizaron en un lector de placas FLUOstar OPTIMA BMG LABTECH (*Ortenberg, Alemania*), a longitudes de onda de excitación de 480nm y emisión de 530nm.

2.20 Determinación de anión superóxido

2.20.1 Espectrofluorometría

La producción de O2 se analizó utilizando la sonda MitoSOX Red. Para este ensayo las células SH-SY5Y cultivadas en placas de 96 pocillos se transfectaron con AS y otras con el vector vacío. Como control positivo se empleó

rotenona 100nM, para inducir la formación de O_2 . Las células se incubaron a 37°C con la sonda a una concentración final de 10 μ M, durante 10min en oscuridad. A continuación se retiró el medio, se lavó con PBS y se procedió a lisar las células con el mismo procedimiento utilizado para la DCFH-DA. Las mediciones de fluorescencia se realizaron para el medio de cultivo, el lavado y para el sobrenadante resultante de la lisis. Se utilizó un lector de FLUOstar OPTIMA BMG LABTECH (*Ortenberg, Alemania*). Se midió la fluorescencia de los ROS inespecíficos a λ ex: 485nm; λ em: 590nm y de O_2 a λ ex: 420nm: λ em: 590nm.

2.20.2 Microscopía de fluorescencia

Se prepararon cubreobjetos de 12mm con un doble recubrimiento: en primer lugar Poly-L-lisina 100μg/mL durante 30min a TA y luego laminina 50 μg/mL 3h a 37°C, para favorecer la adhesión de las células al vidrio. Las células se transfectaron con pcDNA3-ASwt y 48h después se realizó el experimento.

Se preparó una solución de MitoSOX Red 10μM en PBS y se colocaron 50 μL de esta solución sobre los vidrios cubriendo toda la superficie. Se incubó, protegido de la luz, durante 10min a 37°C. Posteriormente se lavó con PBS y los controles positivos se incubaron con rotenona 100 y 300nM, durante 15min a 37°C en oscuridad. Una vez finalizada la incubación, se realizó un lavado suave con PBS y las células se fijaron con PFA 4% durante 20min en oscuridad. Se realizaron 3 lavados con PBS y se incubó con DAPI 1μM 10min a TA. Se efectuaron 3 lavados con PBS de 10min y los vidrios se montaron con Mowiol. Las muestras se analizaron en un microscopio de fluorescencia Olympus IX71 (*Tokyo, Japan*), equipado con un objetivo 60 X de aceite AN=1.43, y las imágenes fueron capturadas con una cámara CCD. El procesamiento de las imágenes se realizó con el programa ImageJ. Se cuantificó la intensidad de fluorescencia/área, de todas las células en los diferentes tratamientos.

2.21 SDS-PAGE y Western blot

A las muestras obtenidas a partir de lisados celulares, fraccionamientos subcelulares y fraccionamientos submitocondriales se les agregó buffer de muestra (Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8; SDS 2%; glicerol 30%; β-mercaptoetanol 15%; azul de bromofenol 5,75x10⁻³ %; β-mercaptoetanol 3mM) en la relación 2:1 (muestra:buffer) y luego se calentaron a 100°C durante 10min. Las soluciones utilizadas para la electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes fueron: gel separador (Tris-HCl 350mM; SDS 0,09%; acrilamida/bisacrilamida 8, 10, 12 y 15%, persulfato de amonio 0,1%; TEMED 8.8). Gel concentrador: (Tris-HCl 130 mM. SDS 0.1%. 0,2%, Hq acrilamida/bisacrilamida 3,8%, persulfato de amonio 0,1%, TEMED 0,2%, pH 6,8). Las muestras se corrieron a un voltaje constante de 120V en presencia de buffer de electroforesis (Tris 25mM; glicina 192mM; SDS 0,1%, pH 8,3). Una vez finalizada la separación electroforética, las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF (GE Healthcare Life Sciences, Amersham, Alemania) empleando buffer de transferencia (Tris 25mM; Glicina 190mM; Metanol 20%) en el dispositivo MiniPROTEAN Transblot System (BIO-RAD, Argentina) a un voltaje constante de 90V, durante 2 horas en frío. Luego se realizó una tinción con Rojo Ponceau (Rojo Ponceau S 0,2%: ácido acético 1%) para comprobar la eficiencia de la transferencia.

Luego de la transferencia, las membranas se incubaron en una solución de bloqueo (leche 5% en Tris 20mM pH=7,5; NaCl 150mM; Tween 20 0,1%, TBST) durante 90min a TA y luego en una solución de anticuerpo primario ON a 4°C. Se realizaron 3 lavados con TBST de 10min cada uno y posteriormente se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente (1h, TA). A continuación, se realizaron 3 lavados con TBST de 15min cada uno. Todas las incubaciones con anticuerpos y lavados se realizaron con agitación. Las membranas se revelaron empleando el reactivo quimioluminiscente ECL.

2.22 Análisis de colocalización

Para el análisis de la colocalización se empleó la herramienta *coloc2* del programa Fiji (ImageJ) (U. S. National Institutes of Health, Bethesda, *Madison, USA*). Se calcularon los coeficientes de Manders (M1 y M2). Estos índices miden en una escala de 0 a 1 la superposición de píxeles entre los dos canales. Un coeficiente de correspondencia igual a 1 representa 100% de colocalización, mientras que uno cercano a 0 implica baja colocalización. Esto se realizó utilizando una macro diseñada por el Dr. Federico Fuentes (Academia de Medicina, Bs As, Argentina) que permite la aplicación de umbrales para cada canal, el cálculo de los contornos de las regiones celulares de cada imagen y, finalmente el cálculo de los coeficientes mencionados (Manders et al., 1993).

2.23 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos se expresaron como la media de 2 ó 3 experimentos independientes con el correspondiente error estándar (SEM). Para la determinación de diferencias significativas (p<0,05; p<0,01 y p<0,001), se llevó a cabo el correspondiente análisis estadístico empleando el programa GraphPad Prism 4 (Graph Pad Sofware, *San Diego, USA*).

Para comparar dos medias se aplicó la Prueba *t-Student*, mientras que para llevar a cabo la comparación de tres o más medias, se utilizó el test ANOVA de un factor, con un post-test de Newman- Keuls.

Referencias Bibliográficas

- Alaimo, A., Gorojod, R. M., & Kotler, M. L. (2011). The extrinsic and intrinsic apoptotic
 pathways are involved in manganese toxicity in rat astrocytoma C6 cells. *Neurochemistry*international, 59(2), 297-308.
- Antico-Arciuch, V., Galli, S., Franco, M. C., Lam, P. Y., Cadenas, E., Carreras, M. C., & Poderoso, J. J. (2009). Akt1 intramitochondrial cycling is a crucial step in the redox modulation of cell cycle progression. *PLoS One*, 4(10), e7523.
- Antony, T., Hoyer, W., Cherny, D., Heim, G., Jovin, T. M., & Subramaniam, V. (2003). Cellular polyamines promote the aggregation of α-synuclein. *Journal of Biological Chemistry*, 278(5), 3235-3240.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Galli, S., Jahn, O., Hitt, R., Hesse, D., Opitz, L., Plessmann, & Jovin, T. (2009). A new paradigm for MAPK: structural interactions of hERK1 with mitochondria in HeLa cells. *PLoS One*, 4(10), e7541.
- Gara, P., Garabano, N., Portoles, M., Moreno, M., Dodat, D., Casas, O. R., & Kotler, M. L. (2012). ROS enhancement by silicon nanoparticles in X-ray irradiated aqueous suspensions and in glioma C6 cells. *Journal of Nanoparticle Research*, 14(3), 1-13.
- Gnaiger, E., Wright-Paradis, C., Sondergaard, H., Lundby, C., Calbet, J. A., Saltin, B., & Boushel, R. (2005). High-resolution respirometry in small biopsies of human muscle: correlations with body mass index and age. *Mitochondr Physiol Network*, 10(9), 14-15.
- Grecco, H & Bastiaens, P. Imaging Protein States in Cells, Live Cell. Chater six (2010) (95,117).
- Harris, K. F., Esbroeck, Z., & Duffus, J. E. (1995). Moderate-temperature polymerization of LR white in a nitrogen atmosphere. *Microscopy research and technique*, 32(3), 264-265.
- Hsu, C. Y. M., & Uludağ, H. (2012). A simple and rapid nonviral approach to efficiently transfect primary tissue-derived cells using polyethylenimine. *Nature protocols*, 7(5), 935-945.
- Manders, E. M. M., Verbeek, F. J., & Aten, J. A. (1993). Measurement of co-localization of objects in dual-colour confocal images. *Journal of microscopy*, 169(3), 375-382.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, 65(1-2), 55-63.
- Park, H. J., & Kim, H. J. (2013). Inhibitory effect of nicardipine on rotenone-induced apoptosis in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Molecular medicine reports*, 7(3), 941-946.
- Robinson, K. M., Janes, M. S., & Beckman, J. S. (2008). The selective detection of mitochondrial superoxide by live cell imaging. *Nature protocols*, 3(6), 941-947.
- Vives-Bauza, C., Yang, L., & Manfredi, G. (2007). Assay of mitochondrial ATP synthesis in animal cells and tissues. *Methods in cell biology*, *80*, 155-171.

Resultados

Capítulo 1. ASOCIACIÓN DE AS A LA MITOCONDRIA

Los intentos por dilucidar los mecanismos celulares que promueven la neurodegeneración característica de la EP han llevado a explorar la asociación de AS con la mitocondria. La afinidad de AS por las membranas con aminoácidos ácidos y cardiolipina, característicos de las membranas mitocondriales, ha convertido a esta organela en uno de los blancos principales de investigación (Ghio et al., 2016; Yasuda et al., 2013). Sin embargo, la bibliografía disponible hasta el momento es contradictoria con respecto a la localización submitocondrial de AS (Cole et al., 2008; Devi et al, 2008; Guardia- Laguarta et al., 2014). Por lo tanto, la relación entre dicha localización y su efecto sobre el metabolismo de la organela continúa siendo un campo abierto a la investigación (Banerjee et al., 2010; Parihar et al., 2008). En este trabajo, se decidió trabajar con mitocondrias aisladas como modelo para estudiar importe de proteínas y efectos sobre la funcionalidad, dadas las numerosas ventajas que presentan (Fernández-Vizarra et al., 2010).

Todos los experimentos se realizaron con AS salvaje. Las mutantes con cisteínas han sido utilizadas para la marcación con fluoróforos. De ahora en adelante, se utilizará siempre la notación AS para indicar la proteína salvaje y se aclarará en cada caso qué mutante en cisteína se utilizó.

1.1 Expresión, purificación y marcación fluorescente de AS

1.1.1 Expresión y purificación de AS

El primer paso para el cumplimiento de este objetivo consistió en obtener la proteína AS recombinante pura. Esto se logró a partir de lisados bacterianos de la cepa BL-21 (DE3) de *E.coli* transformada con el plásmido pt7-T7 (T7 RNA *Polymerase System*) que lleva inserto el gen de AS río abajo del promotor T7. Por otra parte, el cromosoma bacteriano tiene incorporado el gen de la T7-RNA

polimerasa río abajo del promotor-Lac inducible por IPTG. Una vez inducida la expresión de la T7-RNA polimerasa se produce la sobreexpresión de la proteína de interés. Las bacterias se lisaron y se procedió a purificar AS como se describe en la sección Materiales y Métodos. La fracción proteica proveniente del último paso de purificación (ultracentrifugación) se evaluó en geles de acrilamida (SDS-PAGE) 12% coloreados con Coomasie Blue. El objetivo de este paso consistió en comprobar si la proteína estaba libre de contaminaciones provenientes de la expresión en bacterias y que la ultracentrifugación fue capaz de eliminar los agregados. Se observaron bandas mayoritarias correspondientes al monómero de AS (PM: 14kDa) (Figura 18A). También de detectó la presencia de una mínima cantidad de proteína de PM ~40 y 70 kDa. Las mutantes purificadas AS-A90C y AS-A140C se obtuvieron siguiendo el mismo procedimiento.

1.1.2 Marcaje de AS con fluoróforos

Las proteínas AS-A90C y AS-A140C provenientes de la purificación se marcaron con diferentes fluoróforos para ser utilizadas en los experimentos de microscopía, como se explicó en la sección Materiales y Métodos. A continuación, para validar la marcación de la proteína, se tomó una alícuota de A90C ó A140C marcada con ATTO-550 ó Alexa-647 y se analizó mediante cromatografía en columna de intercambio iónico. La coincidencia de las señales que corresponden al fluoróforo y a la proteína son indicativos de la efectividad de la marcación (**Figura 18B**). El rendimiento promedio de estas marcaciones fue de 60% en todos los casos. Este dato se calculó utilizando la siguiente fórmula:

%DOL =
$$\left(\frac{A_{\text{max}} \cdot \epsilon_{\text{prot}}}{(A_{280} - A_{\text{max}} \cdot CF_{280}) \cdot \epsilon_{\text{fluor}}}\right) \times 100$$

Donde DOL corresponde al grado de marcación (*Degree of Labeling*) y representa el promedio de moléculas fluorescentes acopladas a una proteína. Este DOL puede calcularse a partir del espectro de absorción de la proteína marcada. A_{max} = longitud de onda a la cual la absorbancia es máxima para el fluoróforo, ε_{prot} = coeficiente de extinción molar de la proteína pura en M^{-1} .cm⁻¹ a 280nm, ε_{fluor} = coeficiente de extinción molar del fluoróforo para su absorbancia máxima (M^{-1} .cm⁻¹), A_{280} = absorbancia de la proteína a 280nm, CF_{280} = factor de corrección que depende las propiedades del fluoróforo (especificadas en el *data sheet* del producto).

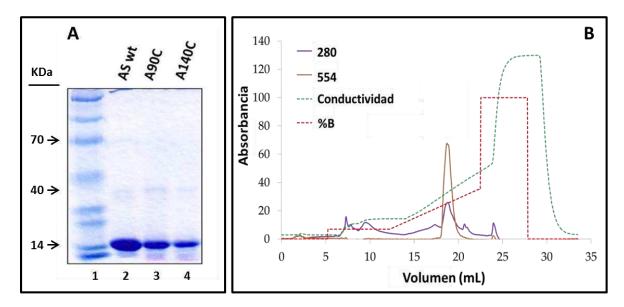


Figura 18. Obtención de AS marcada. A. Las proteínas purificadas se sembraron en un gel SDS-PAGE 12% coloreado con Coomasie Blue. El PM de 14 kDa corresponde al monómero de AS. Calle 1= Marcador de PM, calle 2: 10 μM AS, calles 3 y 4= 5 μM AS (estimada por medición de la absorbancia a 280nm). **B.** Ejemplo de un registro cromatográfico obtenido con AS marcada. La curva violeta corresponde a la proteína (280nm). La línea punteada roja indica el aumento de la concentración de NaCl que permite que la proteína se eluya de la columna (%B). La línea punteada verde registra el aumento de la conductividad coincidente con el aumento de la concentración de sal. La línea marrón indica la señal de emisión del fluoróforo, en este caso ATTO-550 y se registra en coincidencia con el pico de proteínas a 280nm.

Como se observa en la **Figura 18A**, parte de la proteína eluída presenta bandas de PM diferente a AS. Para confirmar que el paso de ultracentrifugación

elimina las especies agregadas de AS, se analizaron mediante western blot las señales de AS provenientes de muestras ultracentrifugadas y sin ultracentrifugar, incubadas o no con AS (30min 37°C) (**Figura 19**). Se observa que las muestras ultracentrifugadas no presentan agregados aún luego de ser incubadas a 37°C. Por lo tanto, todos los experimentos se llevaron a cabo con previa ultracentrifugación.

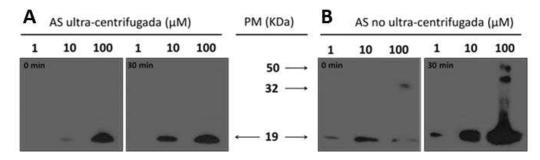


Figura 19: Análisis de AS mediante western blot. A. Sobrenadante de la ultracentrifugación sin posterior incubación y con incubación de 30min a 37°C. **B.** AS no ultracentrifugada sin y con incubación 30min a 37°C.

1.2 Integridad de las mitocondrias aisladas de cerebro de rata

El siguiente paso consistió en analizar la integridad de las mitocondrias aisladas de cerebro de rata. Para ello, las organelas se inmunomarcaron contra la proteína TOM20, un componente del complejo transportador de membrana externa TOM (por sus siglas en inglés: *Transporter Outer Membrane*) y se analizaron por microscopía de fluorescencia (**Figura 20A y B**). Se visualizaron como anillos completos, una morfología característica de las mitocondrias que mantienen su integridad de membrana (Messerschmitt et al., 2003; Bahnemann et al., 2014). Dado que durante el aislamiento, algunas mitocondrias se rompen, se observaron también anillos abiertos o fragmentados (**Figura 20A', asteriscos**). Con el objetivo de estimar el porcentaje de mitocondrias sanas, se cuantificó el número de organelas presentando ambas morfologías en 6 campos al azar obteniéndose un valor de 84,4 ± 8,4% de mitocondrias con forma de anillo.

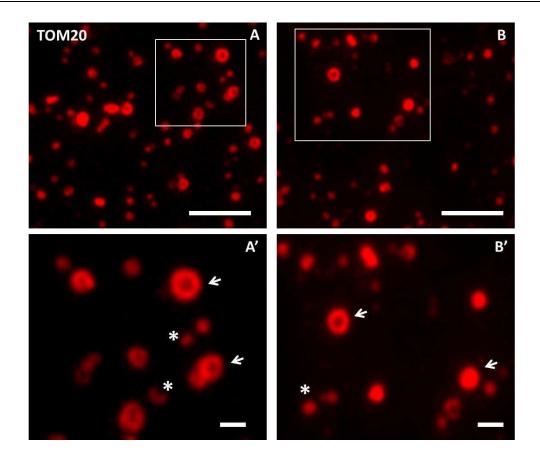


Figura 20: Control de la integridad mitocondrial. A-B. Imágenes de campos aleatorios tomados de dos aislamientos diferentes. Los paneles muestran el resultado de la microscopía de fluorescencia de mitocondrias aisladas. Los recuadros corresponden a las zonas magnificadas en A'-B'. A'-B'. Las flechas blancas muestran ejemplos de mitocondrias enteras (anillos completos) y los asteriscos mitocondrias rotas (fragmentos de mitocondrias que no fueron considerados como organelas intactas), barras=5μm.Las imágenes fueron tomadas en un microscopio de fluorescencia Olympus IX71, objetivo 60X, AN= 1.42, barras=2 μm.

Para validar la integridad mitocondrial también se realizaron medidas del consumo de oxígeno según se describe en el próximo capítulo.

1.3 Localización submitocondrial de AS

Una vez obtenidas las mitocondrias aisladas de cerebro nos propusimos estudiar la localización de AS en los compartimientos mitocondriales y su efecto sobre la funcionalidad de la organela. En la **Figura 21** se resume, además del

esquema de aislamiento y marcación de las mitocondrias ya descriptos, los ensayos planteados a tal efecto.

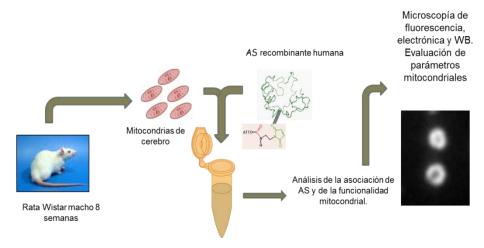


Figura 21: Aislamiento, marcación y análisis del efecto de AS en la mitocondria.

1.3.1 Análisis por microscopía de fluorescencia

En un primer estudio, para establecer la posible asociación entre AS y la mitocondria, se incubó la proteína recombinante con las mitocondrias aisladas y se estudió su localización. Se utilizó AS-A90C marcada con el fluoróforo ATTO-555 maleimido (1 y 10μM) y las mitocondrias se inmunomarcaron contra la proteína TOM20. Se analizó la coincidencia de las señales de AS-A90C con diferentes regiones de la mitocondria (**Figura 22**). La microscopía de fluorescencia permitió registrar la localización de AS (1μM) en la MME y en el interior de la organela (**Figura 22C, flechas**) observándose la característica forma de anillo correspondiente a la estructura de la mitocondria aislada intacta. Cuando se aumentó la concentración de AS (10μM) se observó la señal de la proteína principalmente en el interior de la organela (**Figura 22F**).

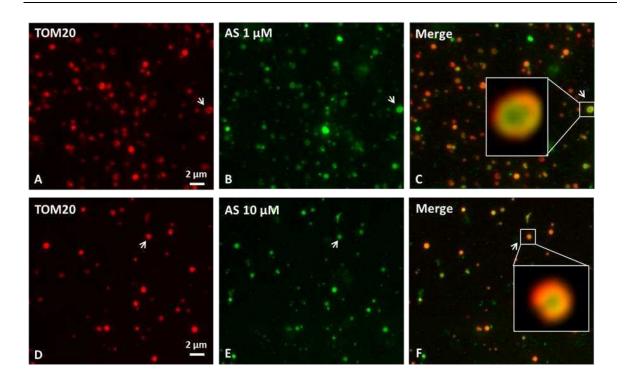


Figura 22: AS se asocia con la mitocondria. Mitocondrias aisladas marcadas con TOM20 (A y D) y AS-A90C-ATTO 555 1μM (B) y 10μM (E). (C y F): Superposición de las señales y ejemplos de la localización de AS: Las flechas blancas indican las mitocondrias con señal de AS en la MME (AS 1 μΜ, C) y en el interior de la mitocondria (AS 10μM, F). Las organelas se incubaron con AS 30min a 37°C. Las imágenes fueron tomadas con un microscopio de fluorescencia OlympusIX71 utilizando un objetivo de aceite 60X, NA=1,42, PLAPON.

1.3.2 Reconstrucción tridimensional de la señal de AS en la mitocondria

Para describir con mayor detalle la asociación de AS con la mitocondria, se realizaron secciones ópticas de las organelas para luego generar una imagen tridimensional que ayudara a confirmar la localización de la proteína en la MME y en el interior de la mitocondria.

La **Figura 23** muestra las hemi-secciones de mitocondrias aisladas de cerebro de rata que fueron deconvolucionadas utilizando el programa computacional *Huygens Professional* (https://svi.nl/HuygensProfessional). La deconvolución es un método de procesamiento de imágenes que consiste en

mejorar el contraste y la resolución de las imágenes tomadas con un microscopio de fluorescencia. Durante el análisis de la deconvolución, la serie entera de secciones ópticas se utilizó para crear una imagen resultante tridimensional. Debido a que las mitocondrias son muy pequeñas (0.5-1µm) y pueden encontrarse por debajo del punto de resolución del sistema óptico, la deconvolución resultó un método adecuado que permitió recuperar la luz fuera de foco y reconstruir la imagen.

En la **Figura 23** (A-D, A´-D´) se muestra un ejemplo de las secciones ópticas de las mitocondrias antes y después de la deconvolución (A-A'; B-B' para AS 1μM y C-C'; D-D' para AS 10μM) y las señales correspondientes a TOM20 (A, A´, C, C´) y AS (B, B´,D, D´). Los paneles E-J corresponden a las reconstrucciones tridimensionales de las mitocondrias. Se observa claramente como la concentración 1μM favorece la localización de AS en la MME mientras que 10μM induce su internalización.

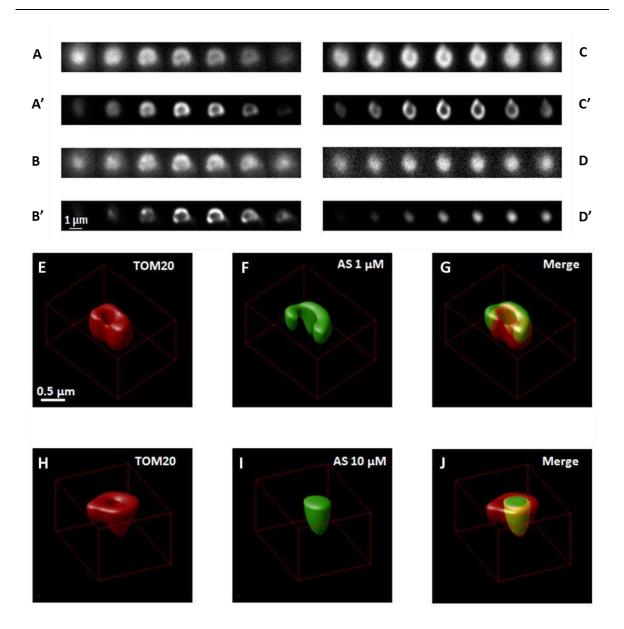


Figura 23: Reconstrucciones 3D de la asociación AS-mitocondria. Cortes de imágenes en el eje "z" de mitocondrias aisladas incubadas con AS-A90C-ATTO550 1μM (A, A΄ y B, B΄) y 10μ M (C, C΄ y D, D΄). La proteína TOM20 fue detectada empleando el anticuerpo secundario Alexa-647 (rojo). Los cortes en z consecutivos (hemi-secciones) para la señal de TOM20 (A, C) están separados por 200 nm. Las secciones de la señal de AS se muestran en B y D. Las imágenes deconvolucionadas obtenidas se muestran en A΄, B΄, C΄ y D΄. En los paneles E, F, H e I se observan las reconstrucciones tridimensionales correspondientes a la mitocondria y a AS (se muestra la mitad de la organela). La superposición de ambas construcciones se ejemplifica en el merge (G y J). Notar la distribución periférica de AS 1μ M y la señal internalizada para AS 10μ M. Las imágenes fueron tomadas con un objetivo Olympus PLAPON, aceite 60X, NA=1,42.

1.3.3 Análisis por microscopía electrónica de transmisión

Una vez establecida la asociación de AS con la mitocondria y su distribución diferencial dependiente de la concentración, se confirmó su localización, mediante Microscopía Electrónica de Transmisión (MET) (Figura 24). Se observó la presencia de partículas de AS de diferentes tamaños tanto en el interior de la mitocondria como en la periferia (Figura 24C, D y E). Existen evidencias que sugieren que la variación en el tamaño de las partículas podría deberse a la acumulación o agregación de la proteína en la mitocondria lo cual podría estar relacionado con su localización (Zhang et al., 2008). Por lo tanto, cuantificamos el tamaño de las partículas de AS para evaluar si había diferencias dependientes de su localización submitocondrial. Se contaron las partículas de oro en 10 mitocondrias incubadas 30min con AS 100µM. No se encontraron diferencias significativas en el tamaño de éstas entre el interior y la periferia (tamaño medio de 22,43 ± 2,1nm) (Figura 24F). Sin embargo, se observó una diferencia en su distribución, siendo mayor la cantidad de partículas en el interior (19) que en la periferia (7). Esta observación reforzaría la idea de que a 100µM la proteína se encuentra mayormente internalizada. Los resultados obtenidos por MET muestran que AS se puede localizar tanto en la MME como en el interior de la mitocondria. Sin embargo, las imágenes de la ultraestructura no resultaron lo suficientemente precisas como para poder asegurar su localización exacta.

El mismo experimento se efectuó incubando mitocondrias con AS 10µM sin embargo, no se logró detectar marca de la proteína a esta concentración.

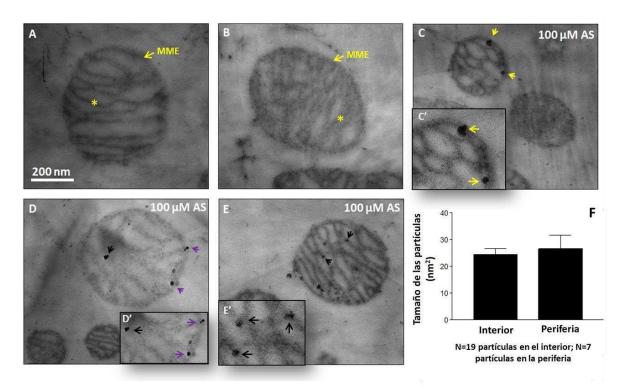


Figura 24: MET de mitocondrias aisladas incubadas con AS. A y B. Controles de la inmunomarcación: MME señala la membrana externa y el asterisco las crestas mitocondriales. C-E: células incubadas con AS 100μM. C: las flechas amarillas señalan la presencia de AS como puntos electrondensos ubicados en la periferia de la organela. D: las fechas violetas señalan la presencia de AS en la periferia y la flecha negra AS en el interior de la organela. E: las flechas indican que AS se encuentra en el interior de la mitocondria y su posible ubicación en la MMI (E').C', D' y E' corresponden a magnificaciones de sus figuras correspondientes. F. Cuantificación del tamaño de las partículas analizadas en la periferia y dentro de la mitocondria. Magnificación de las imágenes=70.000X.

1.3.4 Fraccionamiento submitocondrial y análisis western blot

Para confirmar la localización de AS observada hasta este momento, se realizó un fraccionamiento submitocondrial y posterior análisis western blot partiendo de las organelas incubadas con diferentes concentraciones de AS (**Figura 25**).

Se observó que las mitocondrias que no fueron incubadas con la proteína, contienen AS endógena (**Figura 25A y B**) localizada en MME, El y MMI. Esta detección sólo se logró para tiempos prolongados de exposición de las

membranas (15min). En presencia de AS $10\mu M$, a tiempo cero, no se registró señal en las mitocondrias para un tiempo de exposición de 3-5min (**Figura 25A**). En cambio, el agregado de AS $50\mu M$ resultó en la presencia de la proteína en el El (**Figura 25A**).

Cuando las mitocondrias se incubaron durante 30min sin AS, se observó la señal de la proteína endógena asociada a las mismas fracciones que en el caso anterior, con excepción de la correspondiente a la MMI (**Figura 25B**). En presencia de AS 10 y 50μM (**Figura 25B**) puede notarse la internalización de la proteína hacia el EI y la MMI (10μM) y hacia la MMI y MA (50 μM). En este caso, además de la presencia de monómeros de AS (50μM), se detectaron oligómeros, acorde a lo reportado previamente (Pieri et al., 2016). La **Figura 25C** corresponde a los controles del fraccionamiento submitocondrial, realizados con marcadores específicos, que permitieron validar la pureza de las fracciones obtenidas.

Estos resultados demuestran la incorporación, oligomerización y distribución de AS en los distintos compartimientos mitocondriales, procesos que son dependientes de la concentración de la proteína y del tiempo de incubación.

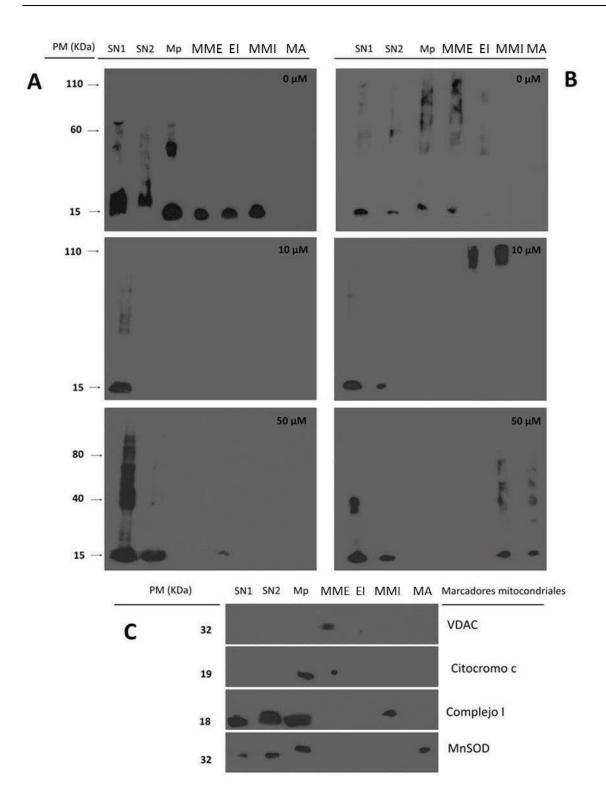


Figura 25: Distribución de AS en los diferentes compartimientos mitocondriales. A. Incubación de AS $(0,\ 10\ y\ 50\mu M)$ con las mitocondrias a tiempo 0: agregado de AS a las mitocondrias e inmediata centrifugación. B. Incubación con AS $0,\ 10\ y\ 50\mu M,\ 30min$ a $37^{\circ}C$. C.

Controles del fraccionamiento con marcadores mitocondriales. VDAC como control de la MME, citocromo c como control de MME y MMI; CI como marcador de MMI y MnSOD como control de la MA. VDAC (*Voltage-dependent anion channels*) y MnSOD (superóxido dismutasa dependiente de manganeso).

1.4 Cinética de la asociación de AS a mitocondrias aisladas

Para estudiar la cinética de la asociación de AS con la mitocondria se incubaron mitocondrias aisladas de cerebro de rata con AS-ATTO-550 (1 μ M y 10 μ M). Posteriormente se realizaron lavados a distintos tiempos (0, 5, 10, 15 y 30 min) con el buffer de aislamiento (MSHE) o con una solución de AS-ATTO550 1 μ M ó 10 μ M (**Figura 26**). A continuación, se realizó una inmunomarcación de las mitocondrias con anticuerpo anti-TOM20.

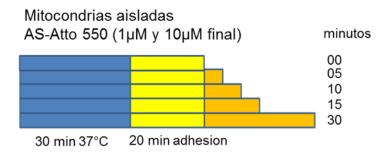


Figura 26: Esquema representando el diseño experimental para el estudio cinético. Las líneas azules representan el tiempo de incubación de las mitocondrias aisladas con AS 1 μ M y 10 μ M durante 30min a 37°C. Las líneas amarillas corresponden al tiempo de adhesión de las organelas sobre los cubreobjetos. Las líneas naranja representan los diferentes tiempos de lavado con la solución de aislamiento MSHE o con las soluciones de AS 1 μ M ó 10 μ M (post-incubación con MSHE o AS).

Se analizó la asociación de AS en función del tiempo clasificando las mitocondrias en cuatro categorías: 1) sin marca de AS, 2) AS localizada en la MME, 3) AS presente en la MME y en el interior de la mitocondria y 4) AS internalizada. Se trabajó en base a un experimento en el cual el observador 1 seleccionó las mitocondrias intactas en base a la marca deTOM20. El observador 2, tomó las imágenes seleccionadas y analizó la señal de AS sin conocer *a priori*

las condiciones de tratamiento con que habían sido incubadas. La **Figura 27** muestra un ejemplo de las imágenes analizadas y de los criterios elegidos para el estudio.

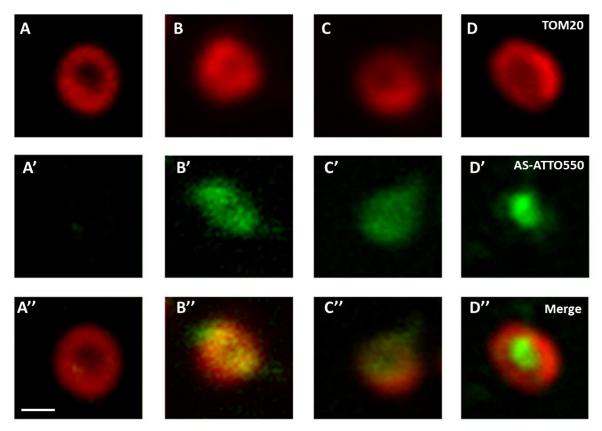


Figura 27: Criterio para clasificar la localización de AS en la mitocondria. A: sin marca de AS, B: AS localizada en la MME, C: AS localizada en la MME y en el interior de la mitocondria, D: AS localizada en el interior de la mitocondria. A-D: mitocondrias marcadas con TOM20, incubadas con AS 1μ M (A y B) y AS 10μ M(C y D). A'-D': señal de AS.A''- D'': merge. Barra= 0.5μ m.

Se cuantificó la localización de AS para los diferentes tratamientos, considerando su concentración (1 o $10\mu\text{M}$), el lavado con MSHE o la postincubación con AS (1 o $10\mu\text{M}$) en función del tiempo (**Figura 28**). En las **Figuras 28A y B** se muestra el efecto de la post-incubación y de los lavados en función del tiempo para AS $1\mu\text{M}$. Se observa que la post-incubación parece favorecer la localización de AS en la MME (verde) y en la MME e interior de la mitocondria (rojo) ya a tiempos cortos (5min) manteniéndose luego en los mismos niveles hasta los 30min de incubación. En cambio, los lavados con MSHE promueven la

liberación de la proteína en función del tiempo para todos los compartimientos analizados. En la **Figura 28C y D** se muestra el resultado de los lavados o postincubación en función del tiempo para AS 10µM. El tratamiento con AS 10µM y la post-incubación con AS no reveló diferencias en la asociación en función del tiempo. A tiempo cero, toda la AS se encuentra en la mitocondria, localizada preferentemente en la MME y en el interior. Para esta concentración de AS los lavados con MSHE no produjeron disociación de la AS de la mitocondria.

Estos resultados demuestran que la dinámica de asociación e internalización de AS depende de su concentración y del tiempo de incubación y avalan los hallazgos descriptos anteriormente relacionados con la localización submitocondrial de la proteína.

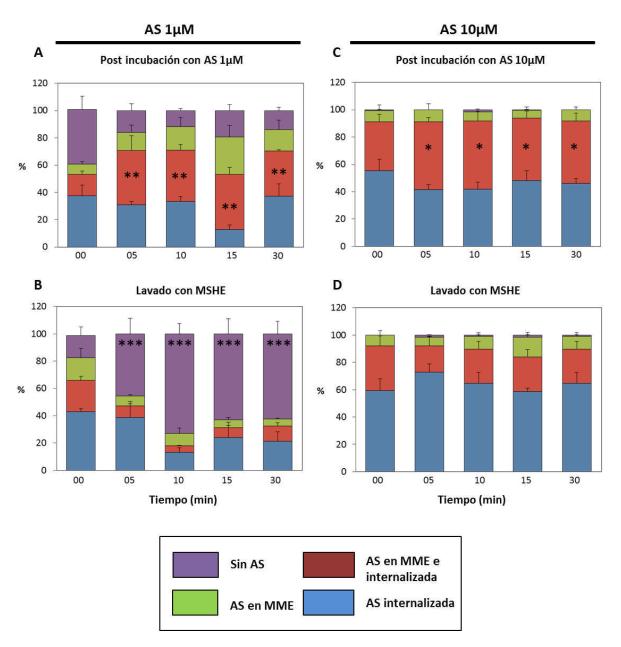


Figura 28: Localización mitocondrial de AS en función del tiempo. Porcentaje de cada una de las categorías calculado sobre un total de aproximadamente 300-350 mitocondrias observadas para cada condición. Análisis de 3 experimentos independientes (6 campos por cada tratamiento). AS 1μΜ: **p< 0,01 mitocondrias con AS en MME e internalizada vs el control (t=0min); Lavado con MSHE para AS 1μΜ: ***p<0,001 mitocondrias sin AS vs el control. AS 10μΜ: *p<0,05 mitocondrias con AS en MME e internalizada vs el control. Los datos de presentan como el porcentaje de cada categoría sobre el total de mitocondrias observadas ± SEM. Análisis estadístico: ANOVA de una vía seguido de un test de *Newman Keuls* de múltiples comparaciones. La imágenes fueron tomadas con un objetivo 60X y NA=1,42 en un microscopio de fluorescencia Olympus IX71.

1.5 Interacción entre AS y TOM20

Se ha reportado que la internalización mitocondrial de AS requiere de los canales de importe de la MME (Devi et al., 2008). Evidencias recientes sugieren que la interacción de AS con la maquinaria de importe mitocondrial, en particular TOM40 (perteneciente al complejo TOM), sería un evento río arriba de la neurotoxicidad inducida por AS. De ser así, esta proteína podría constituir un blanco de relevancia terapéutica en EP (Bender et al., 2013). Para agregar evidencia acerca del mecanismo de internalización de AS a través del complejo TOM, se investigó mediante FRET la posible ocurrencia de una interacción entre TOM20 y AS. En este caso se trabajó con mitocondrias aisladas de células SH-SY5Y debido a su mayor versatilidad como se explicó en la sección de Materiales y Métodos.

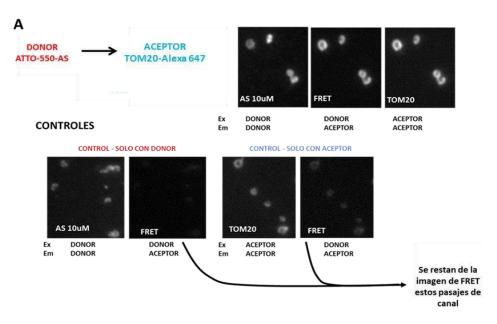
La proteína AS- ATTO-550 fue utilizada como *donor* de FRET (Ex/Em del donor, canal 1) y TOM20 marcado con un anticuerpo secundario Alexa647 como *aceptor* de FRET (Ex/Em del aceptor, canal 2). Para el cálculo de eficiencia de FRET, que hace referencia a la señal obtenida por la emisión del donor que excita al aceptor, se utilizó un tercer canal (**Figura 29A**).

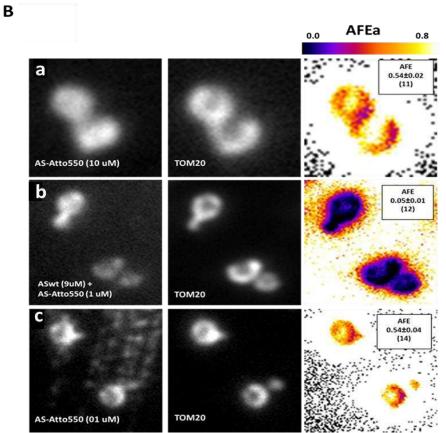
La **Figura 29B** muestra imágenes representativas de los resultados obtenidos. La escala de FRET va de 0 a 0,8. El valor 0 indica que no hubo FRET y el valor 0,8 hace referencia a la eficiencia de FRET máxima. Los resultados de la eficiencia de transmisión (AFEa, *apparent FRET efficiency acceptor*) se muestran gráficamente siguiendo una escala de colores cuyos valores correspondientes se indican en la imagen (**Figura 29B**). La imagen **a** corresponde a las mitocondrias incubadas con la mayor concentración de AS marcada (10μM, ATTO550) y el resultado muestra una eficiencia de FRET efectiva de 0,54 ± 0,02 correspondiente a 11 campos analizados.

La imagen **b** muestra que no hay emisión del aceptor debido a la baja concentración de proteína AS-ATTO550, confirmando que la emisión detectada en a es debida a la interacción con la proteína marcada con el fluoróforo (ATTO550). La eficiencia de FRET en este caso es de 0,05 ± 0,01 calculada en base a 12

campos diferentes. La imagen c corresponde a AS-ATTO550 1µM y la eficiencia de FRET nuevamente es positiva (0,54 ± 0,04, 14 campos analizados), indicando que AS 1 y 10µM está interactuando con TOM20 en la mitocondria. En la **Figura 29C** se muestra un esquema del experimento realizado y del posible mecanismo de internalización.

Los resultados obtenidos sugieren un posible rol para TOM20 en la internalización de AS.





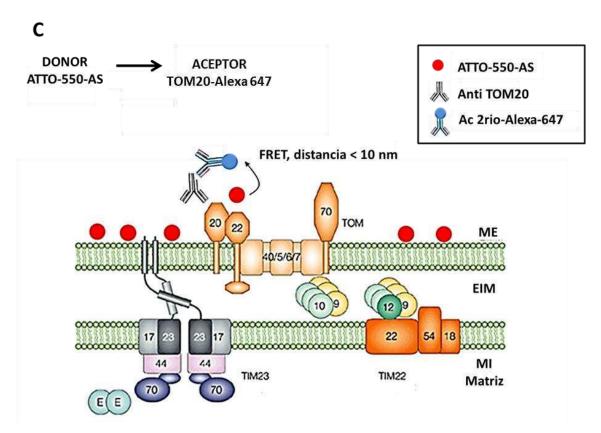


Figura 29: Asociación de AS y TOM20. A. Controles realizados para el cálculo de FRET. **B.** Emisión de FRET en los diferentes tratamientos. AFEa (apparent FRET efficiency): eficiencia de energía transferida calculada como la excitación y emisión del aceptor obtenida con la transferencia de energía de la emisión del donor, dividida por la intensidad del aceptor. **a:** mitocondrias incubadas con 10μM de AS-ATTO550, **b:** mitocondrias incubadas con 1μM de AS-ATTO550 y 9μM de AS no marcada con el fluoróforo y **c** corresponde a AS-ATTO550 1μM. La escala de colores indica el rango de eficiencia de FRET. **C.** Esquema que explica el resultado obtenido. Cuando la distancia entre el donor y el aceptor es < 10 nm hay FRET, sugiriendo una interacción entre las proteínas.

1.6 Efecto de AS sobre el potencial de membrana mitocondrial

Con el objeto de analizar el efecto de AS sobre la funcionalidad de la mitocondria, las organelas aisladas de células SH-SY5Y se incubaron con AS-ATTO550 (1 μ M y 10 μ M) y se marcaron MitoTrackerDeep Red 633. Luego, las muestras se fijaron, se inmunomarcaron con un anticuerpo contra TOM20 y se evaluó el $\Delta \phi$ m por microscopía de fluorescencia. La **Figura 30** muestra una selección de los campos observados. En la primera columna (**Figura 30A**) se

observan las mitocondrias marcadas para TOM20, que se emplearon como referencia para identificar la característica morfología de anillo. La tercera columna (**Figura 30C**) corresponde a la marca de AS-ATTO550 en los distintos tratamientos. La segunda columna (**Figura 30B**) revela la marcación de las organelas con MitoTracker Deep Red 633. Los campos se muestran con pseudocolor para resaltar la intensidad de la marca. Se observa que en el control, la señal del MitoTracker Deep Red 633 es más intensa que en los tratamientos, principalmente en comparación con la incubación con AS 10μM. En este último caso, las mitocondrias que llevan AS exhiben muy baja o ninguna marca de MitoTracker Deep Red 633 indicando la disipación del Δφm.

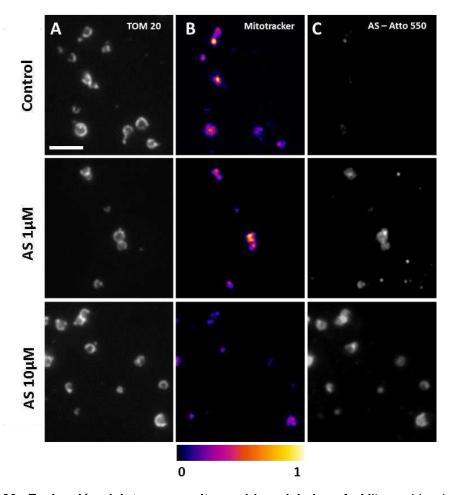


Figura 30: Evaluación del Δφm en mitocondrias aisladas. A. Mitocondrias inmunomarcadas contra TOM20. B. Señal de MitoTracker Deep Red 633 en pseudocolor. C. Señal de AS-ATTO550. Las imágenes fueron adquiridas empleando un microscopio de fluorescencia Olympus X71, objetivo 60X, NA= 1,42. La escala de color hace referencia a la intensidad de la marca de

MitoTracker Deep Red 633. Las imágenes son representativas de 3 experimentos independientes. Barra=2µm

Los campos fotografiados fueron posteriormente analizados con el programa ImageJ para calcular la intensidad de la señal del Mito Tracker Deep Red 633. De esta manera se logró obtener una cuantificación del efecto de AS sobre el $\Delta \phi$ m (**Figura 31**). Las mitocondrias incubadas con AS 10 μ M presentaron una disminución de la marca de MitoTracker Deep Red 633 del 24,5 \pm 0,21 %. Este resultado sugiere que AS afecta el potencial de membrana de la organela lo cual normalmente impacta negativamente en su funcionalidad.

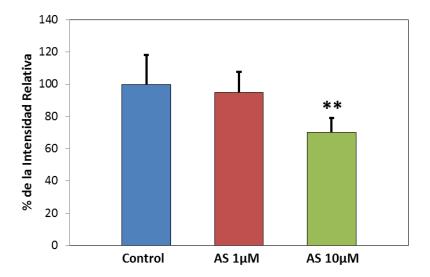


Figura 31: Efecto de AS sobre el $\Delta \phi m$. Se muestran los valores relativizados al control de la intensidad medida para el Mito Tracker Deep Red 633. Los mismos representan valores promedio de 500 mitocondrias obtenidos de tres experimentos independientes. ANOVA de una vía seguido de un post test de *Newman Keuls* de múltiples comparaciones, **p<0,01 ± SEM vs control.

Referencias Bibliográficas

- Bahnemann, J., Kayo, S., Wahrheit, J., Heinzle, E., Pörtner, R., & Zeng, A. P. (2014). In search of an effective cell disruption method to isolate intact mitochondria from Chinese hamster ovary cells. *Engineering in Life Sciences*, 14(2), 161-169.
- Banerjee, K., Sinha, M., Pham, C. L. L., Jana, S., Chanda, D., Cappai, R., & Chakrabarti, S. (2010). α-Synuclein induced membrane depolarization and loss of phosphorylation capacity of isolated rat brain mitochondria: implications in Parkinson's disease. *FEBS letters*, *584*(8), 1571-1576.
- Bender, A., Desplats, P., Spencer, B., Rockenstein, E., Adame, A., Elstner, M., & Pham, E. (2013). TOM40 mediates mitochondrial dysfunction induced by α-synuclein accumulation in Parkinson's disease. *PloS one*, *8*(4), e62277.
- Cole, N. B., DiEuliis, D., Leo, P., Mitchell, D. C., & Nussbaum, R. L. (2008). Mitochondrial translocation of α-synuclein is promoted by intracellular acidification. *Experimental cell research*, 314(10), 2076-2089.
- Devi, L., Raghavendran, V., Prabhu, B. M., Avadhani, N. G., & Anandatheerthavarada, H. K. (2008). Mitochondrial import and accumulation of α-synuclein impair complex I in human dopaminergic neuronal cultures and Parkinson disease brain. *Journal of Biological Chemistry*, 283(14), 9089-9100.
- Fernández-Vizarra, E., Ferrín, G., Pérez-Martos, A., Fernández-Silva, P., Zeviani, M., & Enríquez, J. A. (2010). Isolation of mitochondria for biogenetical studies: An update. *Mitochondrion*, *10*(3), 253-262.
- Ghio, S., Kamp, F., Cauchi, R., Giese, A., & Vassallo, N. (2016). Interaction of α-synuclein with biomembranes in Parkinson's disease-role of cardiolipin. *Progress in lipid research*, *61*, 73-82.
- Guardia-Laguarta, C., Area-Gomez, E., Rüb, C., Liu, Y., Magrané, J., Becker, D., & Przedborski, S. (2014). α-Synuclein is localized to mitochondria-associated ER membranes. *The Journal of Neuroscience*, 34(1), 249-259.
- Messerschmitt, M., Jakobs, S., Vogel, F., Fritz, S., Dimmer, K. S., Neupert, W., & Westermann, B. (2003). The inner membrane protein Mdm33 controls mitochondrial morphology in yeast. *The Journal of cell biology*, 160(4), 553-564.
- Parihar, M. S., Parihar, A., Fujita, M., Hashimoto, M., & Ghafourifar, P. (2008).
 Mitochondrial association of alpha-synuclein causes oxidative stress. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65(7-8), 1272-1284.
- Pieri, L., Madiona, K., & Melki, R. (2016). Structural and functional properties of prefibrillar α-synuclein oligomers. *Scientific reports*, 6:24526.
- Yasuda, T., Nakata, Y., & Mochizuki, H. (2013). α-Synuclein and neuronal cell death. *Molecular neurobiology*, 47(2), 466-483.
- Zhang, L., Zhang, C., Zhu, Y., Cai, Q., Chan, P., Uéda, K., & Yang, H. (2008). Semi-quantitative analysis of α-synuclein in subcellular pools of rat brain neurons: An immunogold electron microscopic study using a C-terminal specific monoclonal antibody. *Brain research*, 1244, 40-52.

Capítulo 2. EFECTO DE AS SOBRE EL METABOLISMO MITOCONDRIAL

Considerando que AS se localiza en la mitocondria y produce disipación del $\Delta \phi m$, el siguiente objetivo consistió en profundizar el estudio del efecto de AS sobre parámetros funcionales característicos del metabolismo mitocondrial. Así, en los siguientes experimentos se estudió el rol de esta proteína *in vitro* sobre el consumo de oxígeno, la producción de ATP y la generación de ROS empleando mitocondrias frescas de cerebro de rata.

2.1 AS disminuye la capacidad respiratoria de las mitocondrias

2.1.1 Análisis del consumo de O2 utilizando un oxígrafo de Clark

La capacidad respiratoria se clasifica tradicionalmente en base a diferentes estados metabólicos de la mitocondria. Estas variaciones son producto de los sustratos agregados al medio en la suspensión mitocondrial. En todos los experimentos se determinó el consumo de O_2 en estado 4 (E4) que corresponde a la respiración basal o de reposo, en ausencia de ADP. La velocidad de consumo de O_2 depende de la velocidad de transferencia de electrones y esta, a su vez, del $\Delta \phi m$. El estado 3 (E3) corresponde a la curva de respiración máxima, que se obtiene por agregado de ADP, observándose claramente un cambio en la pendiente del registro. El control respiratorio (CR) se calcula a partir del cociente E3/E4. La importancia del valor de este parámetro radica en que es un índice que refleja la capacidad funcional de la mitocondria para responder a distintas necesidades energéticas (Boveris et al., 1998).

Para determinar el grado de acoplamiento entre la cadena de transporte de electrones y la síntesis de ATP en las mitocondrias aisladas, se agregó

oligomicina, un inhibidor específico de la fracción Fo de la FoF1-ATPsintasa y se logró un retorno a un estado similar al de la respiración basal (**Figura 32**).

Para el análisis del efecto de AS sobre la respiración, se incubaron mitocondrias aisladas con la proteína purificada (10 y $100\mu M$, concentración final) y se midió el consumo de O_2 . La diferencia observada entre las pendientes correspondientes al E3 para los diferentes tratamientos, indica que la incubación con AS inhibe la respiración, lo que se refleja en un menor consumo de O_2 . No se observaron diferencias significativas para el consumo de O_2 en E4, estando de acuerdo en principio con la integridad de la membrana interna mitocondrial. El CR disminuyó con el agregado de AS, reflejo de la disminución del consumo en estado activo (E3) (**Tabla 2**).

En resumen, estos datos sugieren que AS inhibe la respiración mitocondrial, a través de la desregulación de la cadena respiratoria a nivel de los CI-III debido a que los sustratos utilizados fueron dadores de electrones del CI, sin alterar a la ATPsintasa y manteniendo intacto el grado de acoplamiento mitocondrial.

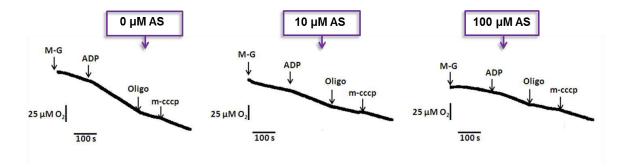


Figura 32: Curvas de consumo de O_2 . Los cambios de pendiente se deben al agregado de diferentes sustratos y a la presencia de AS. **M-G**: Malato-Glutamato, **ADP**: adenosina difosfato, **Oligo**: oligomicina, inhibidor de la ATPsintasa y **mcccp** es el ionóforo que provoca la disipación del $\Delta \phi m$.

AS (μM)	Consumo de O ₂ (ng-at O/min.mg prot)			
	Estado 4 (E4)	Estado 3 (E3)	CR	
0	9,1 ± 1,1	26 ± 4,4	$3,0 \pm 0,3$	
10	10 ± 1,7	19 ± 4,1	1,8 ± 0,1*	
100	7,0 ± 0,5	15 ± 2,0**	2,0 ± 0,2**	

Tabla 2: Consumo de O_2: E4 corresponde a la respiración basal de las mitocondrias aisladas e incubadas con AS. **E3** representa el consumo de O_2 máximo alcanzado por agregado de ADP. El cociente entre el **E3** y **E4** es el control respiratorio (CR). Se muestran las medias \pm SEM. ANOVA de una vía seguido de un test de *Newman Keuls* de múltiples comparaciones, **p<0,01 vs los controles correspondientes y *p<0,05 vs CR del control.

2.1.2 Análisis del consumo de O₂ con un oxígrafo de alta resolución

El consumo de O₂ mitocondrial se evaluó también en forma cualitativa utilizando un respirómetro de alta resolución, OROBOROS. La **Figura 33** muestra los registros obtenidos de los diferentes tratamientos con AS.

En primer lugar se evaluó la respiración basal de la suspensión de mitocondrias. Luego, por agregado de glutamato y malato (sustratos del CI) se indujo la actividad de la cadena respiratoria a partir de este complejo. Con el agregado de ADP se obtuvieron los valores máximos de respiración, evidenciados por el aumento de la tasa respiratoria (pendiente roja) y el correspondiente descenso del nivel de O₂ (cambio de pendiente del registro azul). Luego se agregó rotenona, un inhibidor específico del CI, y la tasa respiratoria descendió llegando a los valores de respiración basal. Cuando se agregó succinato, sustrato del CII, se restauró la respiración. El empleo de este oxígrafo permitió evaluar el estado metabólico de los complejos CI y CII debido a que respondieron a los sustratos y a sus inhibidores específicos. Finalmente, se agregó antimicina A que inhibe al CIII mitocondrial, bloqueando la cadena respiratoria (iglesias-González et al., 2013).

Los resultados revelaron que, en el control y a $10\mu M$ de AS, hay un retorno a los niveles de respiración basal, sugiriendo que el O_2 disponible estaba siendo consumido a través de la cadena respiratoria. La incubación con AS $10\mu M$ reveló una actividad disminuida del CI en comparación con el control; sin embargo, la cadena respiratoria no está desacoplada, lo que se confirma al agregar succinato y registrar la respiración máxima. Las mitocondrias incubadas con AS $100\mu M$ muestran un descenso marcado de la capacidad respiratoria en todas las condiciones.

Estos resultados indican que AS 10 μ M afecta la actividad del CI sin desacoplar la cadena respiratoria, mientras que AS 100 μ M disminuye la capacidad respiratoria severamente.

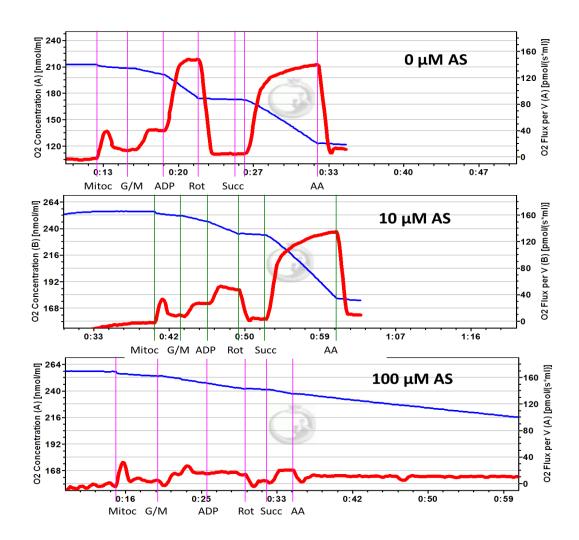


Figura 33: Consumo de O_2 medido en un oxígrafo de alta resolución. Las mitocondrias aisladas de cerebro de rata se incubaron con diferentes concentraciones de AS. Las diferencias en las pendientes indican la capacidad respiratoria (líneas azules); estos valores son calculados por el equipo a partir de las derivadas de las pendientes de los registros de flujo de O_2 (rojo). Se muestran los registros respiratorios de las incubaciones con AS (0, 10 y 100 μ M).

2.2 Velocidad de producción de ATP mitocondrial

La producción de ATP en la mitocondria es llevada a cabo por una enzima ubicada en la membrana interna mitocondrial, la ATPsintasa (CV). Esta enzima utiliza la energía proveniente del potencial electroquímico mitocondrial para catalizar la síntesis de ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico. Por lo tanto, la determinación de la producción de ATP se realizó en mitocondrias frescas controlando la integridad del $\Delta \phi m$, a través de medidas de consumo de O_2 . Para la realización de este ensayo se siguió la metodología descripta por Vanasco et al., (2012) (Vanasco et al., 2012) (**Figura 34**).

Los resultados obtenidos muestran que AS 10 y 100 μ M disminuye el contenido de ATP en 41 ± 5,3 % y 55 ± 11 % respectivamente. Este resultado es acorde con la disminución del consumo de oxígeno descripto previamente.

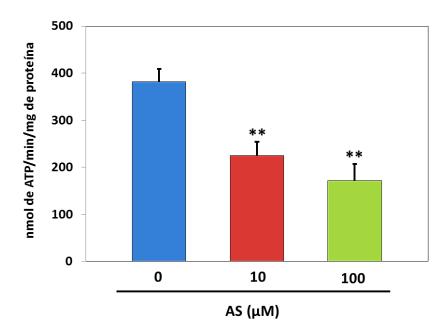


Figura 34: Velocidad de producción de ATP. Las organelas fueron incubadas con AS 10 μM y 100 μM. **Control:** 381,63 ± 27; **AS 10μM:** 225,12 ± 29; **AS 100μM:** 171,74 ± 35 nmol ATP/ min/ mg de proteína. Análisis estadístico: ANOVA de una vía seguido del test *Newman Keuls* de múltiples comparaciones. ** p<0,01 vs el control. Los datos se presentan como la media ± SEM. La producción de ATP se midió a partir de mitocondrias aisladas provenientes de 6 animales.

2.3 AS induce la generación de O2°

El $O_2^{\bullet \bullet}$ es generado como un subproducto de la fosforilación oxidativa. Fisiológicamente, aproximadamente del 1 al 3% del O_2 mitocondrial consumido se reduce de forma incompleta. Estos electrones libres rápidamente interactúan con el O_2 molecular para formar el anión $O_2^{\bullet \bullet}$. Bajo condiciones de estrés oxidativo, como ocurre en la EP, la disfunción de la cadena respiratoria puede llevar a un aumento en la generación de esta especie reactiva.

Se evaluaron entonces los niveles de O_2 mitocondrial empleando la sonda MitoSOX Red. Como se mencionó previamente, este compuesto permite también la detección de otras ROS diferentes al O_2 dependiendo de la longitud de onda de excitación empleada (Robinson et al., 2008). La **Figura 35** muestra que AS 10μ M produce un aumento de 17.5 ± 0.49 % para las ROS totales medido a 485 nm (λ exc) y de 22.8 ± 0.52 % para O_2 medido a 420 nm (λ exc). Dado que no se

observaron diferencias entre los porcentajes de aumento en presencia de AS $10\mu M$, probablemente la especie mayoritaria detectada en este caso sea el anión O_2^{\bullet} . Por otra parte, AS $100\mu M$ no mostró diferencias significativas con respecto al control. Esto podría deberse a que altas concentraciones de AS favorecen la formación de especies reactivas que no son capaces de reaccionar con el MitoSOX Red. El agregado de H_2O_2 , analizado como control positivo, aumenta la producción de O_2^{\bullet} y otras ROS en las mitocondrias aisladas incubadas con $100\mu M$ de AS.

En conjunto, estos ensayos efectuados demostraron que AS, al interactuar con la mitocondria, genera un desbalance en su funcionalidad reflejándose en un menor consumo de O_2 , una disminución de la capacidad de producción de ATP y el concomitante aumento de ROS.

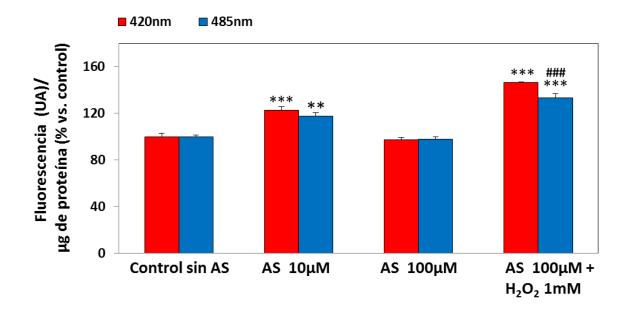


Figura 35: **Generación de O2** en mitocondrias aisladas. Los datos se presentan como porcentaje (%) de UA de fluorescencia de MitoSox Red por μg de proteína mitocondrial. El análisis estadístico consistió en una ANOVA de una vía seguido de un test *Newman-Keuls* de múltiples comparaciones, los datos se representan como la media de 3 repeticiones ± SEM, ***p<0,001 respecto al control a 420nm y **p<0,01 y ***p<0,001 respecto al control a 485nm. ###p<0,001 485nm vs 420nm.

Referencias Bibliográficas

- Boveris, A., Costa, L. E., Cadenas, E., & Poderoso, J. J. (1998). Regulation of mitochondrial respiration by adenosine diphosphate, oxygen, and nitric oxide. *Methods in* enzymology, 301, 188-198.
- Iglesias-González, J., Sánchez-Iglesias, S., Beiras-Iglesias, A., Soto-Otero, R., & Méndez-Álvarez, E. (2013). A simple method for isolating rat brain mitochondria with high metabolic activity: Effects of EDTA and EGTA. *Journal of neuroscience methods*, 213(1), 39-42.
- Robinson, K. M., Janes, M. S., & Beckman, J. S. (2008). The selective detection of mitochondrial superoxide by live cell imaging. *Nature protocols*, 3(6), 941-947.
- Vanasco, V., Magnani, N. D., Cimolai, M. C., Valdez, L. B., Evelson, P., Boveris, A., & Alvarez, S. (2012). Endotoxemia impairs heart mitochondrial function by decreasing electron transfer, ATP synthesis and ATP content without affecting membrane potential. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 44(2), 243-252.

Capítulo 3. ROL DE AS EN LOS PROCESOS DE FUSIÓN-FISIÓN MITOCONDRIAL

Es ampliamente conocido que las mitocondrias son organelas dinámicas que constantemente se fusionan y fisionan y que las alteraciones en el balance fusión-fisión desempeñan un rol en las enfermedades neurodegenerativas, entre ellas la EP. Teniendo en cuenta que los experimentos realizados en mitocondrias aisladas revelaron que AS afecta negativamente la funcionalidad de la mitocondria, el siguiente paso consistió en estudiar el efecto de AS sobre la dinámica mitocondrial.

3.1 Sobreexpresión de AS en células SH-SY5Y

Los experimentos que se detallan a continuación se realizaron con la línea celular humana SH-SY5Y que posee características funcionales y bioquímicas de neuronas dopaminérgicas. Por este motivo han sido ampliamente utilizadas como modelo de EP desde comienzo de la década de 1980 (Xie et al., 2010). Como se ha reportado, además de las mutantes A30P, A53T y E46K, la sobreexpresión de AS salvaje es capaz de desencadenar EP y provocar el desarrollo de esta enfermedad con la misma gravedad que las mutantes. En base a estas consideraciones, elegimos como modelo experimental las células SH-SY5Y transfectadas con AS, un abordaje que hasta el momento ha sido poco estudiado.

Las células se transfectaron con diferentes concentraciones de PEI y DNA hasta obtener una condición óptima entre el mantenimiento de la viabilidad celular y la incorporación del plásmido. La eficiencia de transfección se calculó mediante microscopía de fluorescencia, obteniéndose aproximadamente un 20% de células con sobreexpresión de AS [Eficiencia de transfección= (células fluorescentes/ células totales) x 100)] (Figura 36).

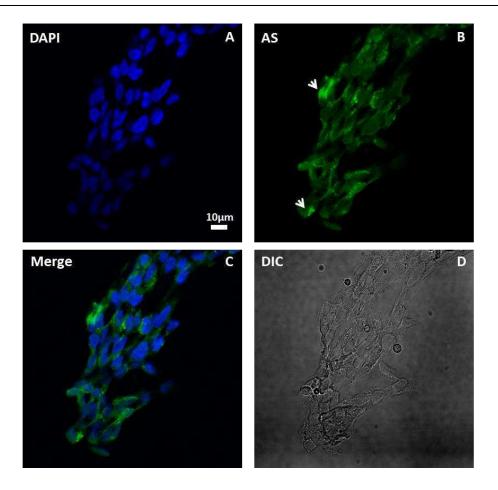


Figura 36: Sobreexpresión de AS. A. Núcleos marcados con DAPI. **B.** Células sobreexpresando AS. **C.** Merge. **D.** Imagen de DIC. Se empleó un microscopio confocal Olympus IX81 utilizando un objetivo 20X.

Además, se determinó el nivel de expresión de AS mediante western blot (**Figura 37**). Se observa que las células transfectadas con el plásmido pcDNA3-AS expresan niveles de AS 3 veces mayores que los endógenos.

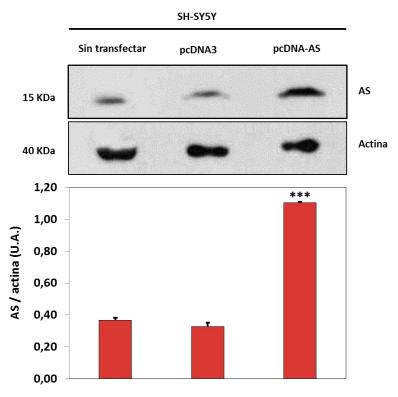


Figura 37: Niveles de expresión de AS. Controles: células sin transfectar y transfectadas con el vector vacío pcDNA3. Las membranas se reprobaron contra actina para realizar el control de carga. Análisis estadístico: ANOVA de una vía, seguido de un post test de *Newman-Keuls* de múltiples comparaciones. Los valores se expresaron como la media ± SEM, N=3. ***p<0,001 vs. Controles.

3.2 Efecto de AS sobre la viabilidad celular

En una primera etapa, se analizó el efecto citotóxico de la AS empleando los siguientes ensayos de viabilidad: reducción del MTT, niveles de ATP y liberación de LDH, los cuales evalúan diferentes eventos celulares (detallado en Materiales y Métodos).

En primer lugar, el ensayo de MTT permitió detectar que la sobreexpresión de AS reduce un 15 ± 2 % la viabilidad celular (**Figura 40 A**), mientras que el de cuantificación de luminiscencia producida por la oxiluciferina reveló una disminución del 34 ± 5 % (**Figura 40 B**). Por su parte, la liberación de LDH, como indicativo de muerte celular, se incrementó en un 31 ± 7 % (**Figura 40 C**). Estos resultados demuestran que las células SH-SY5Y son susceptibles a la

sobreexpresión de la AS. La comparación entre las medidas de viabilidad celular empleando diferentes metodologías mostró un menor porcentaje de muerte celular en el caso del ensayo del MTT con respecto a las otras técnicas. Si bien en primera instancia estas diferencias podrían adjudicarse al hecho de estar empleando técnicas diferentes, no se puede descartar la posibilidad de un mayor compromiso a nivel de la membrana plasmática y producción de energía bajo la forma de ATP.

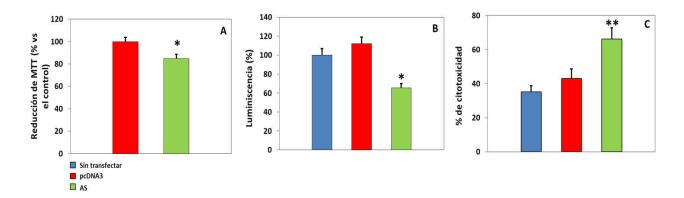


Figura 38: Ensayos de viabilidad celular. A. Ensayo de reducción del MTT. Los datos se expresaron como porcentaje respecto del control tomado como 100%. **B.** Viabilidad celular medida como % de luminiscencia de la oxiluciferina que es proporcional al número de células viables. **C.** Liberación de LDH. La citotoxicidad se calculó como: % de citotoxicidad= 100 x (medida experimental – background del medio/ liberación máxima de LDH - background del medio. Los datos se analizaron mediante una prueba t de student para la reducción de MTT y una ANOVA de una vía seguido de un test *Newman-Keuls.* *p<0,05 vs control; **p<0,01 vs control.

3.3 Efecto de AS sobre la morfología nuclear

Con el objeto de determinar si la disminución de la viabilidad de las células SH-SY5Y por efecto de la AS era consecuencia de una muerte celular de tipo apoptótica, se evaluó la morfología de los núcleos. Para ello, se empleó el reactivo fluorescente DAPI, un colorante que se intercala entre los nucleótidos de adenina y timina. Esta técnica permite la detección de núcleos apoptóticos, en los cuales, la cromatina sufre una transición de un aspecto heterogéneo a una forma altamente condensada, que luego se volverá fragmentada y empaquetada en los

llamados cuerpos apoptóticos. Los resultados obtenidos muestran que los núcleos de las células que sobreexpresan AS no presentan diferencias morfológicas en comparación con los presentes en las células control (**Figura 39A** y **B**). Esto último sugiere que no estaría ocurriendo un proceso apoptótico. La cuantificación del número de núcleos totales, reveló que AS induce una disminución del 29,8 ± 6.8 % en los mismos (**Figura 39C**). Este resultado presenta concordancia con dos de los ensayos de viabilidad celular realizados anteriormente (niveles de ATP y liberación de LDH).

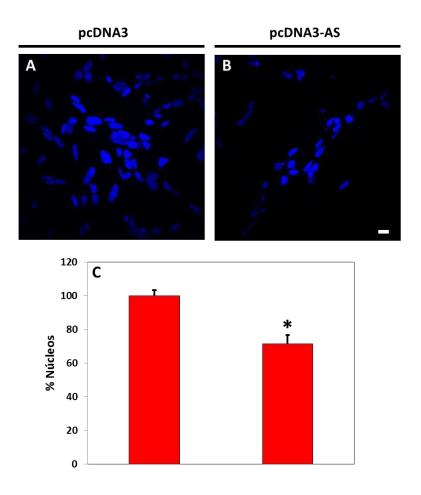


Figura 39: Análisis morfológico y cuantificación de núcleos. A y B. Imágenes representativas de los núcleos teñidos con el reactivo DAPI. **C.** Cuantificación del número total de núcleos. Se contaron 500 núcleos por muestra. El conteo se realizó con el programa Imagej, se realizó una máscara sobre la señal correspondiente a los núcleos de 10 campos diferentes para condición y se seleccionaron las partículas a ser contadas. El análisis estadístico se realizó mediante una prueba *t de Student*, *p<0.05 vs control .Barra: 10μm.

3.4 La sobreexpresión de AS disminuye la producción de ATP

En experimentos anteriores (**Capítulo 2**, **Figura 34**) hemos demostrado que AS disminuye la producción de ATP en mitocondrias aisladas de cerebro de rata. En base a este antecedente y teniendo en cuenta que AS afecta la viabilidad celular, se evaluó cuantitativamente la producción de ATP en las células SH-SY5Y sobreexpresando AS (**Figura 40**). Se observa que AS disminuye un 49 ± 5% la capacidad de producción de ATP, en concordancia con los resultados obtenidos en mitocondrias aisladas de cerebro de rata.

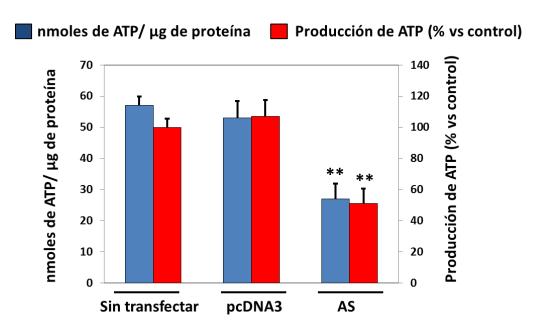


Figura 40. Producción de ATP. La concentración de ATP se calculó refiriendo la medida de luminiscencia a una curva de calibración realizada con concentraciones variables de ATP y se relativizó a la concentración de proteínas. Los datos fueron analizados mediante ANOVA de una vía seguido de un test *Newman-Keuls* de múltiples comparaciones ± SEM; ** p<0,01 vs controles).

En conjunto los resultados descriptos hasta el momento indican que la sobreexpresión de AS en células SH-SY5Y resulta ser citotóxica y afecta negativamente la producción de ATP.

3.5 Efecto de la sobreexpresión de AS sobre la generación de ROS

La sobreexpresión de AS y el estrés oxidativo son eventos clave en el progreso de la EP [2]. Además, la disminución en la producción de ATP descripta anteriormente puede estar relacionada con un incremento en la generación de O_2^{\bullet} H_2O_2 y otras especies reactivas, debido a un desbalance de la actividad de la cadena de transporte de electrones. Por lo tanto decidimos investigar la generación de ROS en células SH-SY5Y con sobreexpresión de AS.

3.5.1 Generación de peróxidos reactivos

Para la determinación de la generación de ROS se empleó la sonda DCFH-DA, que detecta principalmente la presencia de peróxidos reactivos. Los resultados obtenidos se resumen en la **Figura 41**. La sobreexpresión de AS aumentó la generación de estas especies en un 270 \pm 39 % un valor superior al correspondiente al vector vacío en presencia de H_2O_2 (126 \pm 7 %).

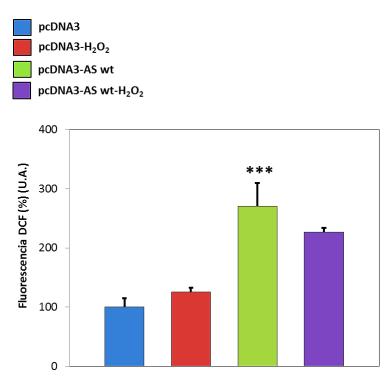


Figura 41: Generación de ROS. Los resultados se expresaron como porcentaje del control. Las células se preincubaron con H_2O_2 500 μ M, 30min a 37°C como control positivo. Se realizó un ANOVA de una vía seguido de un test *Newman-Keuls* de múltiples comparaciones \pm SEM. ***p<0,001 vs el control.

3.5.2 Generación de anión superóxido

Luego evaluamos la producción de especies reactivas producidas específicamente por la mitocondria. Para ello se empleó la sonda MitoSOX Red que es sensible a la producción de O_2^{\bullet} mitocondrial (**Figura 42**). Se observa que las células que sobreexpresan AS muestran un incremento de 17 ± 9% en los niveles de O_2^{\bullet} con respecto al control. Por otra parte, la coincidencia de los valores obtenidos para las distintas longitudes de onda de excitación (485 y 420 nm) indica que la única especie detectada fue el O_2^{\bullet} .

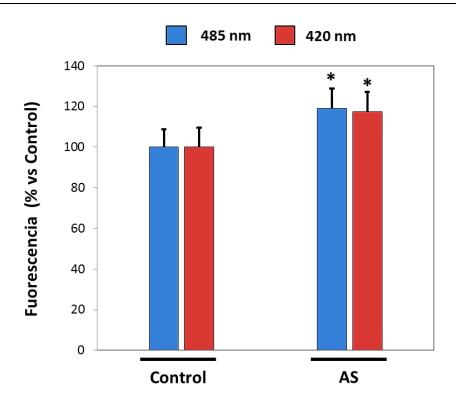


Figura 42: Producción de O_2^{\bullet}. Se compara la producción de ROS totales y O_2^{\bullet} con respecto al control. Análisis estadístico, t de Student *p<0.05.

Los resultados obtenidos indican que la sobreexpresión de AS en células SH-SY5Y induce la generación de ROS, y particularmente de O_2^{\bullet} los cuales podrían ser responsables de la pérdida de viabilidad celular y disminución de la producción de ATP.

3.6 AS y Dinámica Mitocondrial

El balance entre los procesos de fusión y fisión mitocondrial controla la morfología, la función, el número y la distribución de las mitocondrias, e impacta además sobre procesos fundamentales de la célula tales como la biogénesis, la mitofagia y la muerte celular apoptótica. Por lo tanto, no resulta sorprendente que las anormalidades en la dinámica mitocondrial constituyan un importante

mecanismo implicado en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas, entre ellas la EP. Teniendo en cuenta que los experimentos realizados en mitocondrias aisladas de cerebro revelaron que AS afecta negativamente la funcionalidad de la mitocondria, el siguiente paso consistió en estudiar el efecto de esta proteína sobre la dinámica mitocondrial.

3.6.1. Análisis de la morfología mitocondrial

Para encarar este abordaje experimental se empleó el reactivo fluorescente MitoTracker Red CMXRos el cual ingresa a las mitocondrias y queda retenido en aquellas que conservan un $\Delta \phi m$ normal en tanto que se libera al citoplasma cuando hay disrupción de dicho potencial. Por lo tanto, empleando microscopía de fluorescencia fue posible monitorear las células cargadas con este colorante y analizar el efecto de la sobreexpresión de AS sobre la morfología mitocondrial y el $\Delta \phi m$.

Para llevar a cabo el análisis morfológico, se tomó en consideración la clasificación previamente establecida en nuestro laboratorio (Alaimo et al., 2014, Alaimo et al., 2014) con leves adaptaciones. Las categorías celulares analizadas fueron (**Figura 43**): **tubulares** (células con mitocondrias en forma de filamentos), **intermedias** (células que presentan mitocondrias tubulares y fragmentadas), **intermedias con donas** (células con mitocondrias tubulares, fragmentadas y en forma de anillo) y **fragmentadas** (células con mitocondrias en forma esférica-puntillada). A las categorías anteriores se agregó la clasificación de células con mitocondrias presentando **disipación del** Δφm.

Por otra parte, se llevaron a cabo reconstrucciones tridimensionales de las imágenes obtenidas por microscopía de fluorescencia empleando el programa *Huygens Deconvolution*, tal como se describe en Alaimo et al. (2014). El efecto tridimensional permite una simulación de volumen mediante la restauración por deconvolución de imágenes adyacentes. Estas imágenes tridimensionales permitieron la visualización con mayor detalle y calidad de los cambios

morfológicos que ocurren en las mitocondrias de las células que sobreexpresan AS. (Figura 43, A´-E´, A´´- E´´).

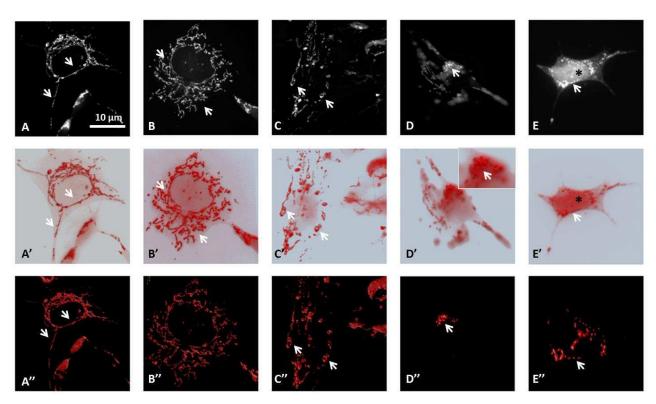


Figura 43: Clasificación de las categorías celulares en base a la morfología mitocondrial y al estado del $\Delta \phi m$. Se establecieron cuatro categorías de células de acuerdo a la morfología mitocondrial: mitocondrias (A) tubulares, (B) intermedias, (C) intermedias con donas, (D) fragmentadas. La quinta categoría (D) corresponde a las células con disipación del $\Delta \phi m$. A'-E' y A"-E". De cada imagen de fluorescencia se realizaron reconstrucciones 3D empleando el programa *Huygens Deconvolution Software*. Las flechas blancas, para cada categoría, resaltan mitocondrias para las cuales se aprecia más claramente la morfología característica. Las mitocondrias se tiñeron con MitoTracker Red CMXRos y se analizaron en un fluorescencia Olympus IX71 ($\lambda Ex=579-\lambda Em=599$).

El análisis de las células transfectadas con el vector vacío pcDNA3 mostró que las mismas no presentaban alteraciones en la morfología de sus mitocondrias con respecto a las células sin transfectar, lo cual indica que el procedimiento de transfección no tiene efecto sobre este parámetro.

En la **Figura 44** se muestran imágenes que ejemplifican el efecto de AS sobre la morfología mitocondrial y el $\Delta \phi m$. En las regiones de la célula donde hay

mayor concentración de AS se observan mitocondrias fragmentadas, además de una marcada disipación del $\Delta \phi m$, evidenciado como una señal difusa de la sonda Mitotracker Red CMXRos.

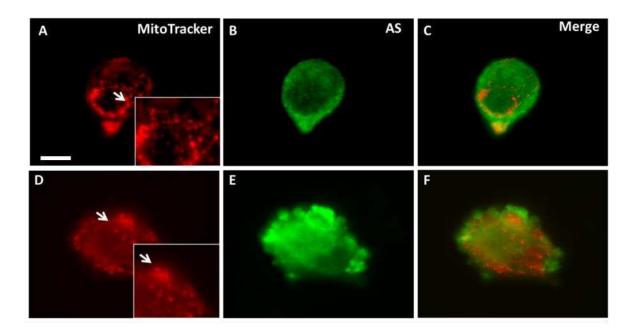


Figura 44: Efecto de la sobreexpresión de AS sobre la morfología mitocondrial. A y D. las flechas señalan mitocondrias fragmentadas y con disipación del $\Delta \phi m$. Los cuadros muestran una magnificación de la imagen. Las imágenes se adquirieron en un microscopio de fluorescencia Olympus IX71. Barra=10 μm .

Posteriormente, se cuantificó el número de células presentando las distintas categorías descriptas. Los resultados obtenidos (**Figura 45**) revelaron que la sobreexpresión de AS induce una disminución en el número de células con mitocondrias tubulares (67,6 \pm 4,6%) y un aumento del 469 \pm 61% en la cantidad de células con mitocondrias fragmentadas en comparación con el control. En cambio, no se observaron diferencias significativas en lo que respecta a la cantidad de células con mitocondrias intermedias e intermedias más donas. Por último, la sobreexpresión de AS indujo un incremento del 392 \pm 47% en las células con mitocondrias que presentaban disipación del $\Delta \phi m$.

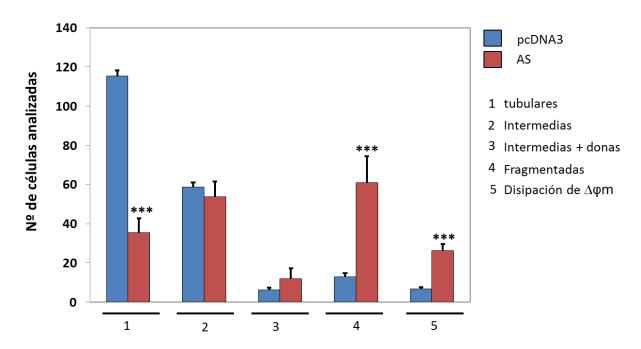


Figura 45: Morfología mitocondrial en células sobreexpresando AS. Se contaron 200 células por muestra; N=3. Se realizó una ANOVA de una vía seguido de un test *Newman-Keuls* de múltiples comparaciones y los resultados se expresaron como N° de células presentando una determinada morfología, ± SEM. ***p<0,001 vs control respectivo.

Con el fin de complementar los resultados obtenidos se realizó un análisis adicional de la morfología mitocondrial, el cual consiste en la determinación de los parámetros: área, perímetro, elongación, circularidad e interconectividad de estas organelas (Tabla 3). La elongación, un parámetro asociado a la forma tubular, disminuyó en las mitocondrias de células transfectadas con AS. Por otra parte, AS aumentó la circularidad, un parámetro asociado a las presencia de mitocondrias fragmentadas y donas. La interconectividad está relacionada con la disposición en red de las mitocondrias. Valores mayores de interconectividad sugieren que las organelas están físicamente más conectadas, mientras que valores más bajos están asociados con mitocondrias fragmentadas. Los resultados obtenidos muestran que la interconectividad de las mitocondrias de las células control es mayor que la correspondiente a las células que sobreexpresan

AS sugiriendo que estas últimas se encuentran más fragmentadas y/o en forma de dona (Wiemerslage & Lee, 2016).

Mitocondrias de células control y de células con AS con Mitotracker (Media representativa de los valores obtenidos ± SEM por microscopía de fluorescencia)							
Tratamientos	Área (μm^2)	Perímetro (μm)	Circularidad maximo=1	Elongación 1/circularidad	Interconectividad (Área/ perímetro)		
Control (n=12 células)	1,15 ± 0,07	12,2 ± 0,70	0,16 ± 0,01	11,7 ± 1,06	0,10 ± 0,004		
(n= 135 mitocondrias)							
AS (n= 10 células)	1,33 ± 0,16	9,03 ± 0,77	0,27 ± 0,02	6,25 ± 0,68	0,14 ± 0,01		
(n= 94 mitocondrias)			***p<0,001	***p<0,001	**p<0,01		
FRAGMENTADAS			circularidad vs control	Elongación vs control	Interconectividad vs control		
AS (n= 12 células)	2,17 ± 0,23	5,79 ± 0,32	0,75 ± 0,02	1,44 ± 0,08	0,33± 0,02		
(n= 75 mitocondrias)			***p<0,001	***p<0,001	***p<0,001		
DONAS			circularidad vs control	Elongación vs control	Interconectividad vs control		

Tabla 3: **Parámetros de la morfología mitocondrial**. Se muestra el promedio de los valores obtenidos de las mediciones ± SEM. El análisis se realizó utilizando el programa ImageJ y siguiendo el protocolo descripto en (Dagda et al., 2009; Wiemerslage & Lee, 2016). El análisis estadístico consistió en una ANOVA de una vía un test *Newman-Keuls* de múltiples comparaciones.

En conjunto, estos resultados indican que AS altera el balance entre los procesos de fusión y fisión induciendo la fragmentación de la red tubular que conforman las mitocondrias, además de promover la disipación del $\Delta_{\phi}m$.

3.6.2 Análisis de los niveles de expresión de las proteínas de fusión y fisión mitocondrial

Una vez demostrada la alteración de la morfología mitocondrial, profundizamos los estudios analizando mediante western blot los niveles de expresión de las proteínas reguladoras de la fusión (Opa-1) y de la fisión mitocondrial (Drp-1).

Opa-1

La proteína Opa-1 es una GTPasa encargada de modular el proceso de fusión y controlar la arquitectura de las crestas mitocondriales regulando las uniones y el diámetro entre ellas. Se ha reportado que Opa-1 es procesada hasta en 8 variantes de *splicing* y que cambios en el balance entre las isoformas largas y cortas afectan el proceso de fusión (Ishihara et al., 2006). Cuando la producción de ATP está comprometida, las células disipan energía, inhibiendo la fusión mitocondrial a través del clivaje de Opa-1. Este incremento en el procesamiento de Opa-1 conduce a la presencia de mayores niveles de la proteína soluble, resultando en una extensiva fragmentación mitocondrial. Esta fragmentación puede prevenirse por sobreexpresión de las isoformas largas de Opa-1 (Ishihara et al., 2006; Palmer et al., 2011).

Se analizaron los niveles de expresión de Opa-1 en fracciones subcelulares mediante western blot, empleando un anticuerpo monoclonal que reconoce los residuos 708-830 correspondientes al dominio efector GTPasa. El inmunoblot reveló bandas correspondientes a ~100 y ~94 KDa, sin diferencia en la expresión de ambas isoformas entre las fracciones mitocondriales control y de células transfectadas con AS (**Figura 46A** y **B**).

Se encontraron formas clivadas de Opa-1 correspondientes a ~ 70kDa y ~ 40kDa en la fracción mitocondrial de las células control (**Figura 46A**; **3 y 5**). La sobreexpresión de AS favorece la aparición de una especie de Opa-1 de menor peso molecular (~35kDa, **Fig. 46A**, **6a**), la señal de 40KDa baja un 71 ± 7 %, en tanto que la señal correspondiente a 70kDa hasta 6 veces en las fracciones mitocondriales con AS. (**Figura 46C**). Sin embargo, no se detectó liberación de isoformas de Opa-1 al citoplasma.

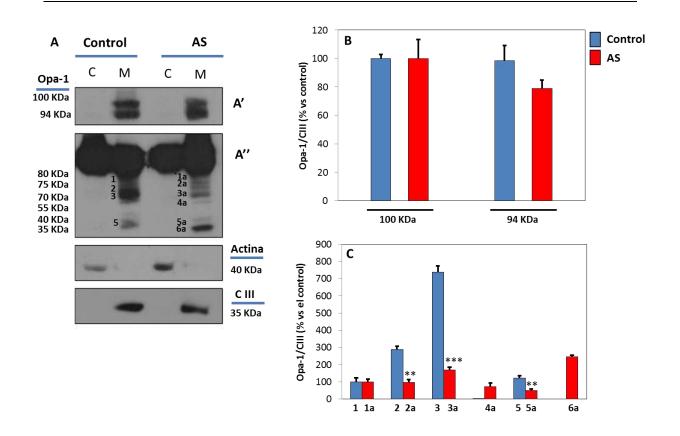


Figura 46: Expresión y localización subcelular de Opa-1. A. Inmunoblot representativo de las bandas de Opa-1 obtenidas. A': bandas correspondientes a las isoformas largas de Opa-1 (~100 y 94 KDa) reveladas con 1min de exposición. A´´: corresponde al mismo western blot que A´ revelado con una exposición de 15min. B y C: Cuantificación de las bandas correspondientes a A´y A´´ respectivamente. Las membranas fueron lavadas y reprobadas para control de carga empleando el anticuerpo anti Complex III subunit core 1- OxPhos (Complejo III) para la fracción mitocondrial y el anticuerpo anti- β-Actina para la fracción citosólica. Anova de una vía seguido de un test de Newman Keuls de múltiples comparaciones, **p<0,01, ***p<0,01. C= citosol; M=mitocondria.

Drp-1

Drp-1 es la proteína maestra reguladora de la fisión mitocondrial (Scott & Youle, 2010). Su participación fue estudiada en varios procesos neurodegenerativos, en particular en la EP. Por lo tanto, en base a estos antecedentes y considerando los resultados obtenidos que demuestran que AS aumenta el número de mitocondrias fragmentadas, investigamos los niveles de expresión y la localización subcelular de la proteina Drp-1 en presencia de AS.

Como se observa en la **Figura 47,** Drp-1 se detectó en la fracción citosólica y mitocondrial, tanto de células control como transfectadas con AS. En la fracción citosólica de las células transfectadas con AS, se observó la aparición de una banda de alto PM (\sim 180 KDa) que podría corresponder a una forma agregada de Drp-1 descripta por Qi en 2013 (Qi et al., 2013) en lisados totales de células SH-SY5Y. AS indujo un aumento en los niveles de Drp-1 de 96 \pm 14 % y 30 \pm 2,8 % en las fracciones citosólica y mitocondrial respectivamente.

El aumento en los niveles de la forma clivada de Opa-1 y de Drp-1 en la fracción mitocondrial avalan el rol de AS en el desbalance de los procesos de fusión-fisión mitocondrial, propuesto anteriormente.

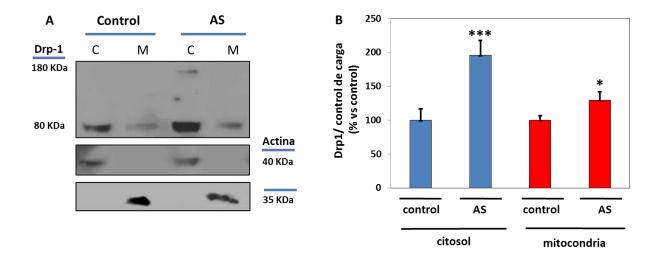


Figura 47: Expresión y localización subcelular de Drp-1. A. Se muestra un western blot representativo. **B.** Cuantificación. Las membranas fueron lavadas y reprobadas para control de carga empleando el anticuerpo anti Complex III subunit core 1- OxPhos (Complejo III) para la fracción mitocondrial y el anticuerpo anti- β-Actina para la fracción citosólica. El análisis estadístico consistio en una ANOVA de una vía seguido de un post test *Newman Keuls* de multiples comparaciones. * p<0,05 vs control; *** p<0,001 vs control C=citosol, M=mitocondria.

3.6.3 Efecto de AS sobre la permeabilización de la membrana mitocondrial

Dado que no se observó liberación de las formas clivadas de Opa-1 al citosol, se realizó un experimento para evaluar si AS inducía la permeabilidad de la membrana mitocondrial. Para ello se analizó mediante western blots la liberación del citocromo c de la mitocondria al citosol, un evento característico que tiene lugar cuando se permeabiliza la membrana mitocondrial ante diferentes estímulos (Tait & Green, 2010). Los resultados obtenidos demuestran que la sobreexpresión de AS no induce liberación del citocromo c al citosol (**Figura 48**). No obstante, cabe destacar que aún no se ha llegado a un acuerdo acerca de si el evento de permeabilización precede o no al clivaje de Opa-1 (Ramonet et al., 2013).

Estos hallazgos sugieren que si bien AS afecta el balance fusión-fisión, la disfunción mitocondrial observada en las condiciones de nuestro modelo experimental, representa un estadio temprano, tal vez previo a la permeabilización de la membrana y a la ejecución del proceso apoptótico. Esto último avala el resultado obtenido en el análisis de la morfología nuclear, donde no se detectaron eventos de condensación y fragmentación del ADN (**Figura 39**).

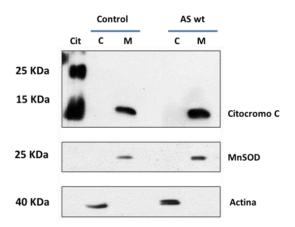


Figura 48: Liberación de citocromo c al citosol. Las membranas fueron lavadas y reprobadas para control de carga empleando el anticuerpo anti MnSOD para la fracción mitocondrial y el anticuerpo anti- β-Actina para la fracción citosólica. Cit= citocromo c puro. C= citosol, M= mitocondrias.

3.6.4 Efecto de Drp-1 en presencia de AS

Posteriormente, con el fin de estudiar la relevancia de la proteína Drp-1 en nuestro modelo experimental, se realizaron experimentos empleando Mdivi-1, una molécula inhibidora de la fisión mediada por Drp-1 (Cassidy-Stone et al; 2008). El mecanismo de inhibición de Mdivi-1 consiste en atenuar los primeros pasos de la fisión, que involucran el autoensamblaje de moléculas de Drp-1. Mdivi-1 se une de manera selectiva y específica al *pool* de moléculas de Drp-1 que se encuentran sin ensamblar en el citoplasma y promueve la acumulación de una conformación incapaz de polimerizar. El autoensamblaje de Drp-1 es un paso crítico para la función de esta proteína, por lo que Mdivi-1 fue postulado como un inhibidor de la actividad GTPasa y finalmente un bloqueante eficaz de la fisión mitocondrial (Lackner & Nunnari, 2010).

Se analizó el efecto de Mdivi-1 (10 µM) en nuestro modelo mediante microscopía de fluorescencia empleando Mitotracker Red CMXRos. Las imágenes obtenidas sugieren que Mdivi-1 inhibe la fragmentación inducida por AS (**Figura 49 C y D**). Sin embargo, también se encontraron células sobreexpresando AS cuyas mitocondrias aparecen principalmente fragmentadas a pesar de la exposición a Mdivi-1 (**Figura 49E y F**).

En base a estas observaciones se decidió cuantificar el número de mitocondrias de acuerdo a la clasificación morfológica establecida previamente (**Figura 50**). Se observa que la presencia del inhibidor en células transfectadas con AS, resulta en un aumento del número de células presentando mitocondrias tubulares mientras que las células con mitocondrias fragmentadas y disipación del $\Delta \phi m$ disminuyen significativamente. Estos resultados avalan la participación de Drp-1 en el proceso de fisión mitocondrial inducido por AS.

En conjunto los resultados demuestran que AS produce un desbalance del equilibrio fusión-fisión mitocondrial y que Drp-1 juega un rol en este proceso.

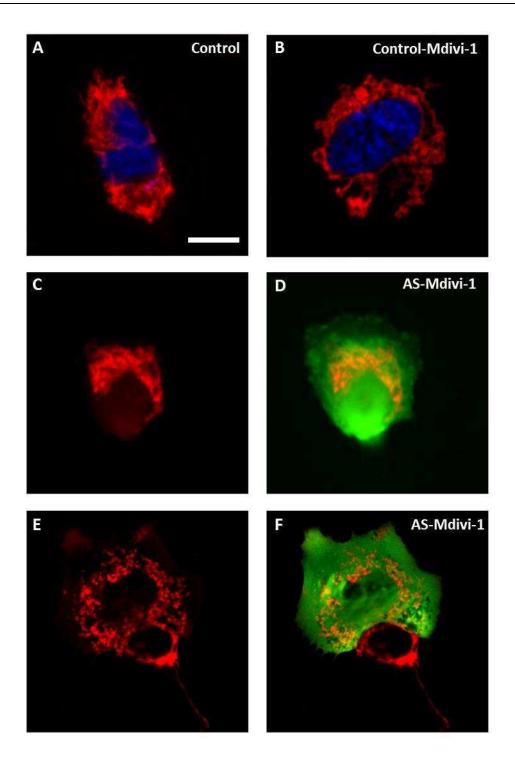


Figura 49: Efecto de Mdivi-1 sobre la fisión inducida por AS. A y B corresponden a los controles sin transfección, sin y con agregado de Mdivi-1 respectivamente. **C**, **D**, **E** y **F** son imágenes representativas de la morfología mitocondrial en células con sobreexpresión de AS. Las imágenes se obtuvieron utilizando un microscopio de fluorescencia Olympus IX71 con un objetivo de aceite 60X, NA=1,42.

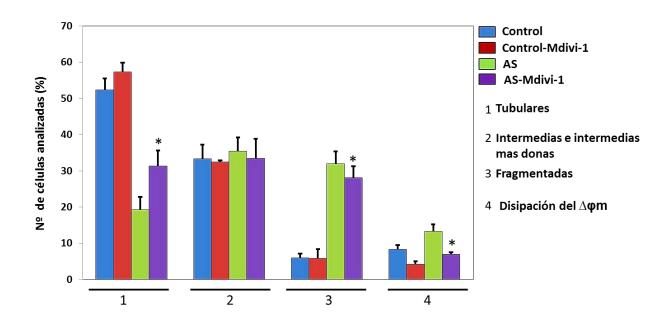


Figura 50: Efecto de Mdivi-1 sobre la fisión inducida por AS. Mdivi se incubó durante 48hs. *p<0,05 vs AS (1, 3 y 4). El análisis estadístico consistió en una ANOVA de una vía seguida de un post test *Newman-Keuls* de múltiples comparaciones.

3.7 Análisis de la morfología mitocondrial en células que presentan aumento en la generación de anión superóxido

En el presente trabajo hemos demostrado que AS aumenta la generación de las ROS y en particular el O_2^{\bullet} y se ha propuesto que estas especies podrían ser responsables de la disfunción mitocondrial. Por lo tanto, para estudiar la relación entre la producción O_2^{\bullet} y la integridad mitocondrial empleamos la sonda MitoSOX Red (Ahmad et al., 2013). Este fluoróforo, dirigido específicamente a la mitocondria permite visualizar por microscopía las diferentes morfologías que adoptan las organelas.

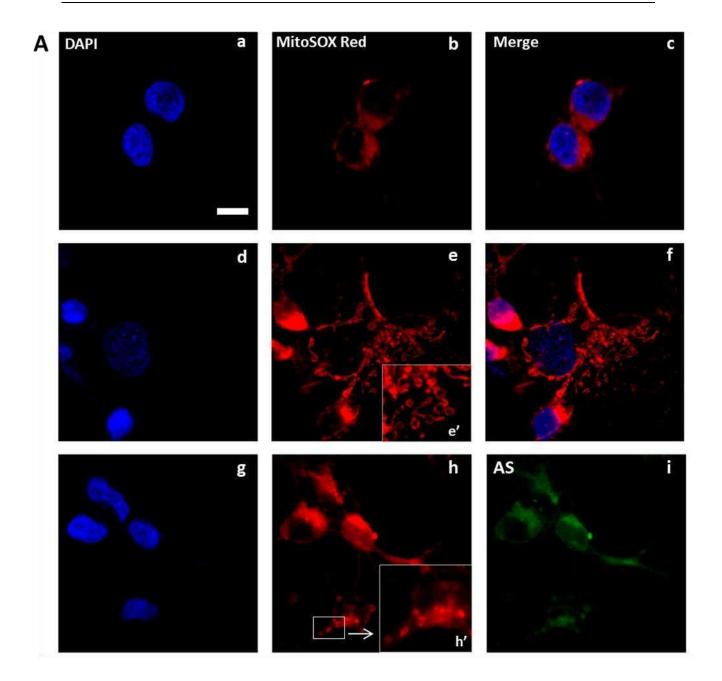
La **Figura 51A** muestra los resultados obtenidos en células control, con presencia de rotenona y transfectadas con AS. La rotenona se empleó como control positivo ya que actúa como desacoplante de los complejos I y III, dos sitios

de la cadena respiratoria relevantes en la generación de O_2^{\bullet} . En las células control se detecta la señal de O_2^{\bullet} correspondiente a los niveles basales de las células SH-SY5Y. El agregado de rotenona 100 nM indujo la formación de mitocondrias fragmentadas y en forma de dona (**Figura 51A**, **e y e'**). Las células que sobreexpresan AS, presentaron eventos morfológicos consistentes con los descriptos para rotenona 100nM.

Posteriormente, se realizó una cuantificación de la intensidad de fluorescencia de MitoSOX Red como medida de la generación de $O_2^{\bullet_-}$ (**Figura 51B**).

Los resultados obtenidos demuestran que las células transfectadas con AS presentan un aumento de dos veces en la intensidad de fluorescencia al igual que las incubadas con rotenona 100nM.

La coexistencia de fragmentación mitocondrial y generación aumentada de O2⁻⁻ en células sobreexpresando AS sugiere que la generación de ROS inducida por la sobreexpresión de AS produce un desbalance en los eventos de fusión-fisión en respuesta al daño.



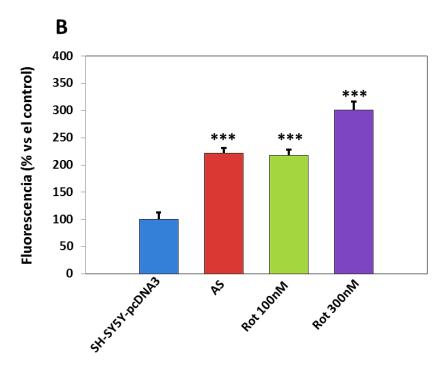


Figura 51: Generación de O2 y morfología mitocondrial. A. Las imágenes a, b y c corresponden a células control; d, e y f corresponden a células con agregado de rotenona 100 nM; g, h, i corresponden a células transfectadas con AS, e' y h' muestran a un detalle de la morfología en cada tratamiento. B. Cuantificación de la intensidad de fluorescencia. Para el análisis se utilizó el programa ImageJ. Se restó el background de cada imagen y se midió el área de las mitocondrias y la intensidad de la fluorescencia, posteriormente se realizó el cociente entre estos dos parámetros. Se realizó un estudio de ANOVA de una vía ± SEM seguida de un post test Newman-Keuls de múltiples comparaciones.

En las muestras procedentes de este experimento se midieron nuevamente los parámetros de circularidad, elongación e interconectividad de las mitocondrias obteniéndose resultados similares a los correspondientes a la **Tabla 3**.

Referencias Bibliográficas

- Ahmad, T., Aggarwal, K., Pattnaik, B., Mukherjee, S., Sethi, T., Tiwari, B. K., & Roy, S. S. (2013). Computational classification of mitochondrial shapes reflects stress and redox state. *Cell death & disease*, 4(1), e461.
- Alaimo, A., Gorojod, R. M., & Kotler, M. L. (2011). The extrinsic and intrinsic apoptotic
 pathways are involved in manganese toxicity in rat astrocytoma C6 cells. *Neurochemistry*international, 59(2), 297-308.
- Alaimo, A., Gorojod, R. M., Beauquis, J., Munoz, M. J., Saravia, F., & Kotler, M. L. (2014).
 Deregulation of mitochondria-shaping proteins Opa-1 and Drp-1 in manganese-induced apoptosis. *PloS one*, *9*(3), e91848.
- Cassidy-Stone, A., Chipuk, J. E., Ingerman, E., Song, C., Yoo, C., Kuwana, & Nunnari, J. (2008). Chemical inhibition of the mitochondrial division dynamin reveals its role in Bax/Bak-dependent mitochondrial outer membrane permeabilization. *Developmental cell*, 14(2), 193-204.
- Dagda, R. K., Cherra, S. J., Kulich, S. M., Tandon, A., Park, D., & Chu, C. T. (2009). Loss of PINK1 function promotes mitophagy through effects on oxidative stress and mitochondrial fission. *Journal of Biological Chemistry*, 284(20), 13843-13855.
- Ishihara, N., Fujita, Y., Oka, T., & Mihara, K. (2006). Regulation of mitochondrial morphology through proteolytic cleavage of OPA1. *The EMBO journal*, *25*(13), 2966-2977.
- Lackner, L. L., & Nunnari, J. (2010). Small molecule inhibitors of mitochondrial division: tools that translate basic biological research into medicine. *Chemistry & biology*, 17(6), 578-583.
- Palmer, C. S., Osellame, L. D., Stojanovski, D., & Ryan, M. T. (2011). The regulation of mitochondrial morphology: intricate mechanisms and dynamic machinery. *Cellular* signalling, 23(10), 1534-1545.
- Qi, X., Qvit, N., Su, Y. C., & Mochly-Rosen, D. (2013). A novel Drp1 inhibitor diminishes aberrant mitochondrial fission and neurotoxicity. *Journal of cell science*, *126*(3), 789-802.
- Ramonet, D., Perier, C., Recasens, A., Dehay, B., Bové, J., Costa, V., & Vila, M. (2013).
 Optic atrophy 1 mediates mitochondria remodeling and dopaminergic neurodegeneration linked to complex I deficiency. *Cell Death & Differentiation*, 20(1), 77-85.
- Scott, I., & Youle, R. J. (2010). Mitochondrial fission and fusion. *Essays in biochemistry*, 47, 85-98.
- Tait, S. W., & Green, D. R. (2010). Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nature reviews Molecular cell biology*, *11*(9), 621-632.
- Wiemerslage, L., & Lee, D. (2016). Quantification of Mitochondrial Morphology in Neurites of Dopaminergic Neurons using Multiple Parameters. *Journal of neuroscience methods*.
- Xie, H. R., Hu, L. S., & Li, G. Y. (2010). SH-SY5Y human neuroblastoma cell line: in vitro cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Chinese medical* journal, 123(8), 1086-1092.

Capítulo 4. EFECTO DE AS EN EL PROCESO DE AUTOFAGIA

La vía autofágica-lisosomal requiere un flujo continuo de formación, fusión y eliminación de vesículas. Por lo tanto, una alteración en alguno de los pasos de esta vía conduce a cambios en su funcionamiento. Los materiales citosólicos que van a degradarse son encerrados por medio de membranas aisladas para formar vesículas de doble membrana denominadas autofagosomas. Posteriormente, los autofagosomas se fusionan con lisosomas para transformarse en autofagolisosomas y degradar los componentes citosólicos (Klionsky et al., 2003)

4.1 Efecto de AS sobre la autofagia

LC3 es el marcador por excelencia de la activación de la autofagia. Ante un estímulo autofágico, LC3-I se conjuga covalentemente a fosfatidiletanolamina para formar LC3-II. Los niveles de LC3-II mantienen una estrecha relación con la cantidad de autofagosomas. Dado que los niveles de esta proteína están sujetos a síntesis y degradación, es necesario separar estos procesos empleando inhibidores que impidan la degradación lisosomal. Sin un inhibidor, el *pool* luminal es degradado luego de la fusión con los lisosomas (Rubinsztein et al., 2013). El antibiótico macrólido Bafilomicina A1 (Baf A1) conduce a la pérdida de función del lisosoma debido a que inhibe irreversiblemente a la v-ATPasa, detiene la acidificación lisosomal y con ello, la degradación en dicha organela (Bowman et al., 1988; Yoshimori et al., 1991). De este modo, la incubación de las células con este inhibidor permite poner en juego una variable a la vez y diferenciar los cambios debidos a la activación de la autofagia de los generados por una disminución en la degradación de los autofagosomas (Bowman et al., 1988; Mizushima & Yoshimori, 2007; Rubinsztein et al., 2009).

Para estudiar una posible activación de la autofagia debida a la sobreexpresión de AS, las células se transfectaron con AS y luego de 48h se agregó Baf A1 (2h, 100nM). Una vez finalizado el tratamiento, las células se lisaron, se realizó un inmunoblot y se midió la expresión de la proteína LC3 (**Figura 52**). La sobreexpresión de AS indujo un aumento de 3,8 veces los niveles de LC3-II (**Figura 52B**) el cual resultó mayor en presencia de Baf A1. Estos resultados indican que la sobreexpresión de AS induce la activación de al autofagia.

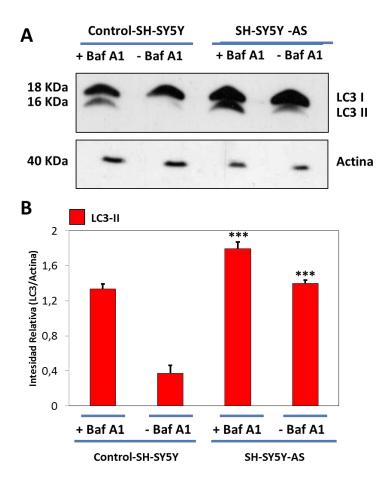


Figura 52: La sobreexpresión de **AS** activa la autofagia. Las células se transfectaron con pcDNA3-AS y luego de 48h se agregó Baf A1 (100nM) durante 2hs. **A**. Inmunoblot representativo que muestra los niveles de LC3-II en cada condición. Las proteínas fueron resueltas por medio de un gel 15% y transferidas a una membrana de PVDF. Las membranas se revelaron con un anticuerpo anti-LC3 y se reprobaron con un anticuerpo anti-Actina como control de carga. **B**. Cuantificación de los niveles de LC3 II. ***p<0,001 AS sin Baf A1 vs control sin Baf A1; ***p<0,001

AS con Baf A1 vs AS sin Baf A1. Análisis estadístico: ANOVA de una vía ± SEM, seguido de un test *Newman Keuls* de múltiples comparaciones. N=3.

4.2 La sobreexpresión Atg5 disminuye la citotoxicidad inducida por AS

Ante un estímulo citotóxico, la autofagia puede favorecer la supervivencia o la muerte celular dependiendo del contexto y la naturaleza e intensidad del daño (Mariño et al., 2014). En relación a AS, varios estudios han demostrado que el papel que juega esta proteína depende del modelo en estudio. Por lo tanto, los resultados que se encuentran publicados hasta el momento están sujetos a una fuerte controversia (Koch et al., 2015). Para analizar el rol que cumple la autofagia en la citotoxicidad inducida por la sobreexpresión de AS, se empleó una estrategia genética de inhibición y se evaluó la viabilidad por medio del ensayo de liberación de LDH. Las células se co-transfectaron con plásmidos conteniendo Atq5wt o la mutante Atq5^{K130R}, la cual previene la conjugación Atq5-Atq12 suprimiendo el proceso autofágico (Gorojod et al., 2015). Los resultados obtenidos demostraron que la inhibición de la autofagia empleando Atg5^{K130R} incrementa la citotoxicidad de la AS, mientras que la sobreexpresión de Atg5^{wt} previene el daño. Estos datos sugieren que el proceso autofágico juega un rol protector frente a la citotoxicidad de la AS. No se observaron diferencias significativas con respecto al control en las células que sobreexpresaron Atg5^{K130R} y Atg5^{wt} (**Figura 53**).

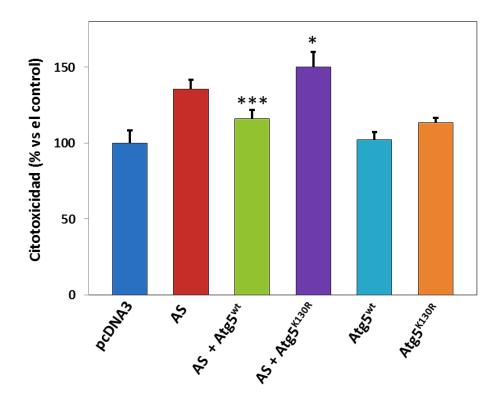


Figura 53: **Efecto de la autofagia sobre la citotoxicidad de la AS**. Las células se cotransfectaron con AS y Atg5^{wt} o Atg5^{K130R}. El gráfico muestra el efecto de la sobreexpresión de estas proteínas sobre la viabilidad celular medida por liberación de LDH. Para el análisis se realizó un ANOVA de una vía seguido de un test de múltiples comparaciones: Newman-Keuls ± SEM. ***p<0,001 AS + Atg5^{wt} vs AS.

4.3 Rol de AS en la inducción de la mitofagia

La autofagia desempeña un rol relevante en el control de calidad mitocondrial. Las organelas defectuosas son excluídas de la red mitocondrial a través de eventos de fisión y enviadas a los lisosomas para su degradación a través de la mitofagia. La despolarización mitocondrial y la fisión se han propuesto como requisitos para la ejecución de este proceso (MacVicar, 2013). Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el capítulo 3, figura 45 y capítulo 1, figura 30 que indicaron que AS induce fisión de las redes mitocondriales y despolarización de la mitocondria, se realizó un ensayo para evaluar la posible inducción de mitofagia como consecuencia de la sobreexpresión de AS. Para ello, las células se

co-transfectaron con AS y Atg5^{wt} o Atg5^{K130R}, se marcaron las mitocondrias (TOM20) y las vesículas autofágicas (LC3) por inmunocitoquímica. Los preparados resultantes se analizaron por microscopía confocal (**Figura 55**). La transfección con los plásmidos Atg5^{wt} o Atg5^{K130R} se realizó para corroborar su efectividad en modular la autofagia empleando una técnica alternativa (inmunocitoquímica).

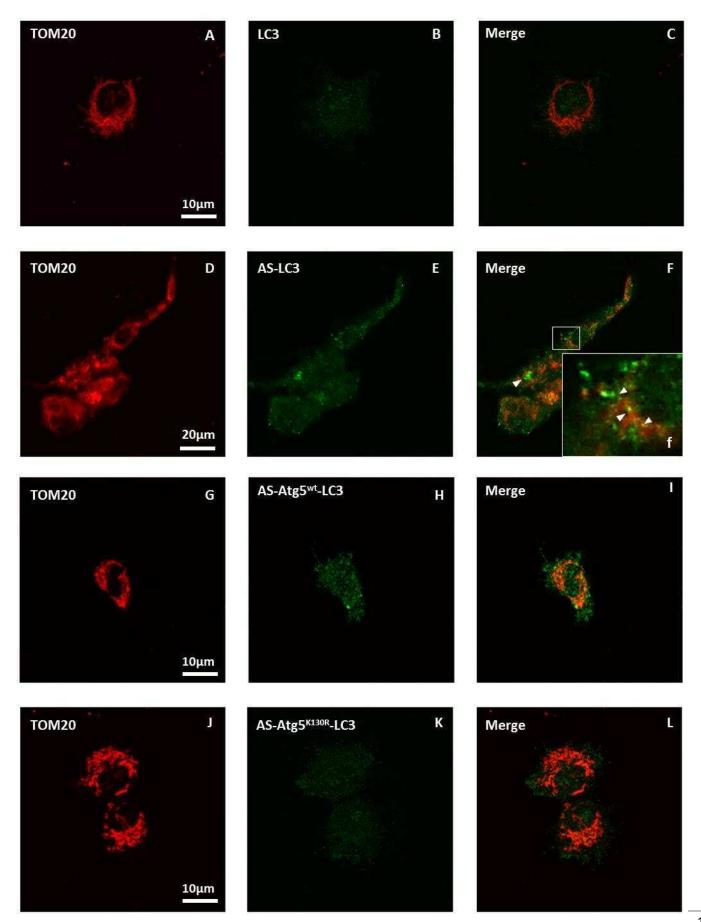


Figura 54: La AS induce mitofagia. Las células se co- transfectaron con AS y Atg5^{wt} o Atg5^{K130R}. Se muestran imágenes de la marca de TOM20 (rojo, A-J) y de LC3 (verde, B-K). Las imágenes de ambos canales fueron superpuestas (Merge: C-L).En **F** se señalan las vesículas conteniendo LC3. Las imágenes se tomaron con un microscopio confocal Olympus IX81, con un objetivo Olympus PLAPON 60X de aceite, NA=1,42.

En concordancia con los resultados obtenidos en la **Figura 53**, AS activó la autofagia como se deduce del aumento en la formación de vesículas marcadas con LC3. La transfección con el plásmido Atg5^{K130R} dio como resultado un patrón de marcación semejante al control; en tanto que con Atg5^{wt} aumentó el número de vesículas marcadas con LC3 con respecto al control. Por otra parte, la señal de LC3 co-localizó con la marca mitocondrial (TOM20), sugiriendo la ocurrencia de mitofagia.

4.3.1 Análisis de la colocalización

La colocalización entre la señal mitocondrial detectada con TOM20 y la señal de LC3 se evaluó mediante el test de Manders (Manders et al., 1993), calculando el coeficiente M₁. Este coeficiente determina la relación entre la señal mitocondrial que colocaliza con LC3 sobre la señal mitocondrial total según:

Los valores se encuentran dentro de una escala que va de 0 a 1, donde 0 es exclusión y 1 es la colocalización con LC3 del total de la señal de TOM20. En la **Figura 55** se grafican los valores obtenidos para M₁ en los distintos tratamientos. Los resultados muestran que el tratamiento con AS resultó en un incremento significativo de 1,5 veces sobre el valor del control sugiriendo un aumento en la mitofagia. La transfección con los vectores Atg5^{wt} o Atg5^{K130R} disminuye la colocalización por debajo de los valores del control. Esto podría indicar que se

activan vías alternativas de degradación independientes de Atg5. Sin embargo, se requieren más estudios para evaluar esta posibilidad.

Los resultados sugieren que AS induce la autofagia y la mitofagia en las células SH-SY5Y. La autofagia se desencadena como un mecanismo de preservación favoreciendo la viabilidad celular. Por su parte, la activación de la mitofagia indica que la disfunción inducida por AS en las mitocondrias es suficientemente crítica como para que sean seleccionadas para su degradación.

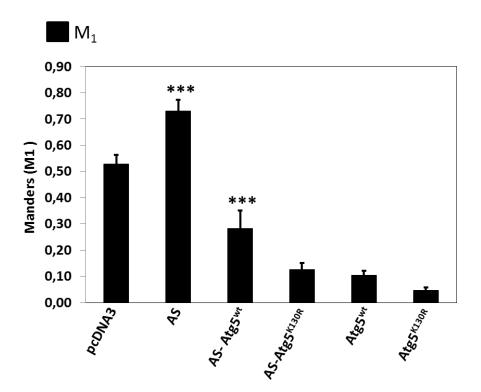


Figura 55: Colocalización de mitocondrias y LC3. El cálculo del coeficiente de M₁ se efectuó utilizando el programa Fiji (ImageJ), con el plugin "Coloc2" y una macro diseñada especialmente para el análisis de los coeficientes de Manders. Se realizó un ANOVA de una vía seguido de un post test Newman-Keuls. Los datos se expresaron como la media ± SEM.**M**₁: ***p<0,001 AS vs pcDNA3 y ***p<0,001 AS-Atg5K^{wt} vs AS.

Referencias Bibliográficas

- Bowman, E. J., Siebers, A., & Altendorf, K. (1988). Bafilomycins: a class of inhibitors of membrane ATPases from microorganisms, animal cells, and plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85(21), 7972-7976.
- Gorojod, R. M., Alaimo, A., Alcon, S. P., Pomilio, C., Saravia, F., & Kotler, M. L. (2015). The
 autophagic-lysosomal pathway determines the fate of glial cells under manganese-induced
 oxidative stress conditions. Free Radical Biology and Medicine, 87, 237-251.
- Klionsky, D. J., Cregg, J. M., Dunn, W. A., Emr, S. D., Sakai, Y., Sandoval, I. V.& Ohsumi, Y. (2003). A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Developmental cell*, 5(4), 539-545.
- Koch, J. C., Bitow, F., Haack, J., d'Hedouville, Z., Zhang, J. N., Tönges, L., Jovin, T. & Tatenhorst, L. (2015). Alpha-synuclein affects neurite morphology, autophagy, vesicle transport and axonal degeneration in CNS neurons. *Cell death & disease*, 6(7), e1811.
- MacVicar, T. (2013). Mitophagy. Essays in biochemistry, 55, 93-104.
- Manders, E. M. M., Verbeek, F. J., & Aten, J. A. (1993). Measurement of co-localization of objects in dual-colour confocal images. *Journal of microscopy*, 169 (3), 375-382.
- Mariño, G., Niso-Santano, M., Baehrecke, E. H., & Kroemer, G. (2014). Self-consumption: the interplay of autophagy and apoptosis. *Nature reviews Molecular cell biology*, 15(2), 81-94.
- Mizushima, N., & Yoshimori, T. (2007). How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy*, *3*(6), 542-545.
- Rubinsztein, D. C., Cuervo, A. M., Ravikumar, B., Sarkar, S., Korolchuk, V. I., Kaushik, S.,
 & Klionsky, D. J. (2009). In search of an "autophagomometer". *Autophagy*, 5(5), 585-589.
- Yoshimori, T., Yamamoto, A., Moriyama, Y., Futai, M., & Tashiro, Y. (1991). Bafilomycin A1, a specific inhibitor of vacuolar-type H (+)-ATPase, inhibits acidification and protein degradation in lysosomes of cultured cells. *Journal of Biological Chemistry*, 266(26), 17707-17712.

Discusión

Capítulo 1. ASOCIACIÓN DE AS A LA MITOCONDRIA

La asociación de AS con las membranas biológicas ha sido estudiada desde que esta proteína fue vinculada al desarrollo de la EP desde 1988 (silva et al., 2013). Hasta la actualidad, se han llevado a cabo importantes progresos enfocados en entender las propiedades fisicoquímicas de esta proteína y su actividad relacionada con la unión a membranas (Uversky & Fink, 2002; Uversky, 2007; Uversky & Eliezer, 2009). Sin embargo, las funciones fisiológicas de AS no han sido totalmente esclarecidas. Esto se debe principalmente a que se trata de una proteína intrínsecamente desordenada que puede adoptar diversas conformaciones y es versátil en cuanto a interacción con membranas de diferentes regiones subcelulares (Nakamura et al., 2011; Parihaar et al., 2008). Como ejemplo de este comportamiento, se la ha llamado la proteína camaleón (Silva et al., 2013).

Por otra parte, se ha demostrado que en altas concentraciones AS es capaz de agregar hasta formar fibrillas, acumulándose en el citoplasma (Roberti et al., 2007). Durante mucho tiempo se postuló que estos grandes agregados de AS eran los responsables de la injuria encontrada en los cerebros de pacientes con EP. Sin embargo, tiempo después se comenzó a observar que las especies oligoméricas intermedias entre el monómero y la fibra tenían mayor capacidad de dañar a la célula que las fibrillas. Estos oligómeros interactúan con membranas de diferentes organelas provocando desbalances en el metabolismo de la célula (Chen et al., 2015; Ghosh et al., 2015). Uno de los principales blancos de AS en condiciones patológicas es la mitocondria. Esta proteína es capaz de alterar la funcionalidad mitocondrial, por ejemplo, actuando directamente sobre el Cl y afectando el funcionamiento de la cadena respiratoria (Parihar et al., 2008). Sin embargo, existen discrepancias y controversias sobre la localización específica de esta proteína en la mitocondria (Liu et al., 2009), la vía de ingreso (Devi & Anandatheerthavarada, 2010), la función o funciones que allí establece e incluso si realmente se encuentra en la mitocondria o limitada a una región de esta organela y el RE. Esta región correspondería al subdominio del RE asociado a la mitocondria (MAM, por sus siglas en inglés *mitochondria- associated endoplasmic reticulum membranes*) (Guardia-Laguarta et al., 2014; Guardia-Laguarta et al., 2015).

En la primera etapa del presente trabajo se planteó el desafío de poner a punto un sistema *in vitro* con el que se pudiera abordar un estudio detallado de la relación entre AS y las mitocondrias. Por una parte, se diseñaron experimentos que permitieron discernir la asociación entre la proteína y la organela y por el otro, se trabajó para disponer de mitocondrias funcionales con el fin de evaluar los efectos que AS pudiera tener sobre su metabolismo. La obtención de la proteína pura y monomérica se utilizó para todos los ensayos bioquímicos y las mutantes en cisteína se conjugaron con fluoróforos para ser utilizadas en las diferentes técnicas de microscopía. El aislamiento de las mitocondrias requirió poner a punto un protocolo que permitiera obtener una gran proporción de mitocondrias enteras. Además se controló la funcionalidad de las organelas a través de la medición del consumo de O₂ (**Figura 16**).

Las primeras observaciones que realizamos hacen referencia a la asociación de AS con las membranas mitocondriales. AS se detectó en más del 80% de los casos (**Figura 22**) en la mitocondria y su localización fue variable. Los primeros ensayos nos permitieron concluir que a diferentes concentraciones, AS parece variar su localización entre la MME y el interior de la mitocondria (**Figura 22**). Las imágenes deconvolucionadas y las reconstrucciones tridimensionales demostraron que a medida que aumenta la concentración de AS (1-10µM), se favorece su internalización (**Figuras 23**).

Un estudio posterior realizado por MET nos permitió detectar la proteína en el interior de la mitocondria, en regiones cercanas a la MMI, el El y la MA. También se observó en la cercanía de la MME (**Figura 24**). En un trabajo realizado por Zhang et al., (Zhang et al., 2008) los autores reportan que AS se encuentra en distintas regiones subcelulares de neuronas de diferentes áreas del cerebro y especialmente se concentra en las mitocondrias y el RE. Establecen que AS no solo se localiza en la MME sino también en la MMI, sobre las crestas, y en la MA. En nuestro estudio mostramos que AS es capaz de asociarse a organelas

aisladas siguiendo el mismo patrón descripto por Zhang et al., en tejidos y que el número de partículas de AS es mayor en el interior de la mitocondria que en la MME, indicando un posible proceso de internalización. Estos resultados avalan los obtenidos mediante microscopía de fluorescencia.

Continuando con el objetivo de dilucidar en cuales regiones específicas de la organela se localiza AS, fraccionamos las mitocondrias luego de la incubación con la proteína. En los controles (Figura 25A y B) se detectó la señal de AS endógena y algunas especies de alto PM, indicando que en condiciones fisiológicas puede haber proteína agregada interaccionando con la mitocondria. Luego de la incubación con la proteína (Figura 25B), demostramos que esta se localiza en el El y en la MMI presentando PM correspondientes a los agregados (Pieri et al., 2016) posiblemente como producto de la interacción con las membranas. Esto se refuerza al observar en el SN1 y SN2 sólo la proteína monomérica que no interactuó con la mitocondria (Figura 25B 10μM). Con AS 50µM, se detectaron especies de alto PM en la MMI y en la MA además de la forma monomérica (Figura 25B 50µM). Este ensayo nos permitió confirmar que AS se internaliza en la mitocondria y también describir en que subregión específica de la organela se encuentra. Además aportamos información sobre una posible redistribución dentro de la organela dependiente de la concentración (Figura 25B 10μM vs 50μM).

Con este resultado decidimos evaluar si esta asociación era también dependiente del tiempo de incubación. El experimento de cinética de asociación mostró que la proteína, a concentración 1µM, se disocia de la mitocondria cuando se la somete a lavados en distintos tiempos. Sin embargo, esto no ocurre a concentraciones altas (10µM) a pesar de los lavados. Este resultado sugiere que una vez asociada a la membrana o en el interior de la mitocondria, la proteína no se libera de la organela, es decir, su internalización es irreversible, lo que explicaría un comportamiento de interacción dependiente del tiempo y de la concentración de AS (**Figura 28**).

En los últimos años se han propuesto diferentes mecanismos para explicar la incorporación de AS en la mitocondria (Devi & Anandatheerthavarada, 2010;

Parihar et al., 2008). Estudios realizados en membranas artificiales comprobaron que esta proteína se une a fosfolípidos ácidos y a cardiolipina (Ghio et al., 201), un fosfolípido específico de la MMI. Un estudio computacional realizado por Tsigelny et al., en 2012 (Tsigelny et al., 2012) modeló el curso de penetración de AS salvaje y de la mutante A53T a través de un poro formado por la misma proteína debido a cambios en su estructura secundaria. Sin embargo, aún no se ha llegado a un consenso para explicar este fenómeno de internalización.

En el presente trabajo se diseñó un experimento de FRET para evaluar la posibilidad de entrada de AS a la mitocondria mediada por TOM20. El resultado mostró que AS interactúa con el transportador de MME sugiriendo que la proteína podría utilizar esta vía para ingresar en la organela (Figura 29). Si bien se han propuesto vías de internalización, este experimento realizado por FRET aporta un claro indicio de este mecanismo que, si bien no descarta la posibilidad de intervención de otras vías, lo convierte en un candidato clave debido a las características de la zona N-terminal de AS que son similares a las proteínas que se importan a la mitocondria a través de estos complejos (Devi & Anandatheerthavarada, 2010).

Capítulo 2. EFECTO DE AS SOBRE EL METABOLISMO MITOCONDRIAL

En los últimos años, diversos estudios empleando diferentes modelos experimentales han señalado a la disfunción mitocondrial como un mecanismo patológico relevante en la inducción de la neurodegeneración en cerebros de pacientes que padecen PD (Bir et al., 2014; Deas et al., 2015; Devi et al., 2008; Parihar et al., 2008). Sin embargo los mecanismos por los que esta proteína produce un desbalance de la funcionalidad mitocondrial siguen siendo materia de estudio. Por lo tanto, en la segunda etapa del trabajo nos enfocamos en el estudio del efecto de AS sobre distintos parámetros funcionales característicos del metabolismo mitocondrial.

La medición del consumo de O₂ y del control respiratorio depende del acoplamiento de la cadena respiratoria y constituyen una medida fundamental para corroborar la integridad de la mitocondria (Boveris et al., 1999). En el presente trabajo se decidió medir el consumo de O₂ por dos motivos: (i) para asegurarnos que partíamos de mitocondrias funcionales y (ii) para evaluar el efecto de AS sobre la respiración y el acoplamiento de la cadena de electrones. Los resultados indicaron que AS disminuye la respiración mitocondrial, a través de la inhibición de la cadena respiratoria a nivel del complejo I-III, sin alterar a la ATPsintasa y manteniendo intacto el grado de acoplamiento mitocondrial (**Figura 32, Tabla 2**). La evaluación cualitativa del consumo de O₂ utilizando un equipo de alta resolución nos permitió confirmar los resultados referentes a la inhibición del CI por parte de AS (10μM) (**Figura 33**).

En línea con estas observaciones, AS disminuyó la capacidad de las mitocondrias de generar ATP (**Figura 34**). Este efecto podría ser una consecuencia directa de la pérdida del $\Delta \phi$ m. Es bien conocido que la ocurrencia de este último proceso se encuentra estrechamente vinculada a la generación aumentada de ROS (Vogt et al., 2016). Cuando se evaluó este parámetro, encontramos que AS aumenta específicamente la generación O_2^{\bullet} , una especie producida como consecuencia de

la disfunción de la cadena respiratoria (**Figura 35**). Este resultado guarda correlación con la inhibición observada a nivel del CI de la cadena respiratoria.

Si bien existen estudios que investigan el efecto de AS sobre parámetros funcionales en mitocondrias aisladas de cerebro de rata (Banerjee et al, 2010; Bir et al., 2014) en ninguno de ellos se presenta un análisis completo que permita correlacionar las distintas variables estudiadas como se ha presentado en este trabajo.

En conjunto, los estudios de funcionalidad indican que AS disminuye el consumo de O_2 y la producción de ATP y aumenta la generación de anión O_2 , lo cual seguramente resulta en un impacto negativo a nivel celular.

Capítulo 3. ROL DE AS EN LOS PROCESOS DE FUSIÓN-FISIÓN MITOCONDRIAL

La línea celular SH-SY5Y es una sub-línea clonada de las células SK-N-SH establecida a partir de una biopsia de médula ósea de un paciente con neuroblastoma en el ganglio simpático adrenérgico. Esta línea celular ha sido utilizada como modelo de neuronas desde comienzos de los años '80 (Xie et al., 2010) y constituye un modelo adecuado para estudiar EP debido a que poseen características de neuronas dopaminérgicas. Es decir, son capaces de sintetizar dopamina a través de la enzima dopamina-β-hidroxilasa (Oyarce & Fleming, 1991) y expresan el transportador de dopamina, una proteína exclusiva de las neuronas dopaminérgicas (Takahashi et al., 1994). Como la presencia del transportador de dopamina es un pre-requisito para la incorporación de MPP+, las células SH-SY5Y han sido ampliamente usadas para estudiar la neurotoxicidad de este inductor del fenotipo parkinsoniano. Por estas razones se eligió este modelo celular para extender el estudio del efecto de AS a nivel celular.

Se evaluó la eficiencia de transfección de AS mediante microscopía de fluorescencia y análisis western blot (Figuras 36 y 37). Posteriormente se realizó un análisis del efecto de AS sobre la viabilidad celular. En primer lugar se estudió este parámetro por reducción de MTT lo que reveló una leve pero significativa disminución de la viabilidad celular (Figura 38A). Sin embargo, teniendo en cuenta que los ensayos de viabilidad/citotoxicidad se basan en la medición de diferentes parámetros celulares, los mismos pueden arrojar resultados (Borenfreund et al., 1988: Weyermann et al., 2005) que pueden llevar a sobre- o sub-estimar los datos, por lo que es recomendable emplear más de un ensayo para poder realizar una observación concluyente. Por lo tanto, la viabilidad celular se determinó además mediante la detección de luminiscencia en función de la cantidad de ATP generada por las células viables y la citotoxicidad a través de la liberación de LDH debida a la disrupción de la integridad de la membrana plasmática. Estos ensayos mostraron mayor disminución en la viabilidad celular

que el correspondiente a la reducción de MTT (**Figura 38B y C**) y de este modo brindaron un marco más amplio de respuesta para ser empleadas en experimentos posteriores.

Por otra parte se demostró que AS disminuye significativamente la capacidad de producción de ATP en concordancia con el mismo parámetro medido utilizando mitocondrias aisladas (**Figura 40**). El paso a seguir consistió en evaluar los niveles de ROS producidos por la presencia de AS y se corroboró que hay un aumento significativo de la generación de peróxidos reactivos y de O₂*- en estas células (**Figuras 41 y 42**). La disminución de la viabilidad celular, la reducción de la producción de ATP y el aumento en la generación de ROS ponen de manifiesto los efectos nocivos de AS salvaje en altas concentraciones.

Para profundizar en el análisis de los efectos de AS sobre la funcionalidad mitocondrial, se abordó el estudio del rol de esta proteína sobre los procesos de fusión y fisión. Si bien se ha reportado que AS afecta la morfología mitocondrial (Guardia-Laguarta et al., 2014, Koch et al., 2015; Nakamura et al., 2011) existe discrepancia acerca de los mecanismos por los cuales esta proteína produce esas alteraciones. Nosotros encontramos que AS disminuye de forma significativa el número de células presentando mitocondrias tubulares y aumenta el número de células con mitocondrias fragmentadas. También se observó un aumento en el número de células con mitocondrias presentando disipación del Δφm (Figuras 44 y 45). Posteriormente se realizó un análisis adicional de la morfología que incluyó la medición de la elongación, circularidad e interconectividad de las organelas, y que confirmó que AS favorece la aparición de formas fragmentadas y disminuye la interconectividad, un factor relevante para el mantenimiento de la homeostasis mitocondrial (Tabla 3). Se ha reportado que la disfunción en la fosforilación oxidativa acarrea defectos en la fusión de las MMI (Mishra & Chan, 2016). Los mismos, podrían colaborar en la segregación de mitocondrias disfuncionales y evitar la fusión con mitocondrias sanas para rescatar el fenotipo normal.

El estudio de las proteínas de fusión y fisión (Opa-1 y Drp-1 respectivamente) mostró que AS favorece el clivaje de Opa-1 y la aparición de una isoforma corta de 35 kDa. La liberación de Opa-1 al citosol suele asociarse con el inicio de

eventos apoptóticos, provocando la liberación del citocromo c (Jourdain & Martinou, 2009). En este trabajo no detectamos ninguno de estos dos eventos (**Figura 46 y 48**). La ausencia de liberación de citocromo c al citosol, (un parámetro indicativo de apoptosis) muestra concordancia con el análisis de núcleos empleando el reactivo de DAPI (**Figura 39**) donde no se detectó presencia de núcleos fragmentados y/o condensados.

Cuando se analizaron los niveles de expresión de Drp-1, se observó que AS incrementa marcadamente la expresión de esta proteína en el citosol registrándose un incremento del 30% de los niveles de Drp-1 en la fracción mitocondrial (**Figura 47**). Estos resultados sugieren que Drp-1 desempeña un rol en la fisión mitocondrial. En este sentido, cuando se inhibió la actividad de esta proteína con Mdivi-1, se encontró que este compuesto inducía un aumento en el número de células presentando mitocondrias elongadas. En paralelo se observó una disminución en el número de células con mitocondrias fragmentadas y con disipación del $\Delta \phi m$. Estos resultados señalan a Drp-1 como una de las proteínas responsables del proceso de fisión mitocondrial.

Es importante destacar el número relativamente bajo de células presentando mitocondrias con disipación del $\Delta\phi m$ en presencia de AS (**Figura 50**). Dado que la pérdida de $\Delta\phi m$ es un evento directamente relacionado con la permeabilización de la membrana mitocondrial (Landes & Martinou, 2011), resulta coherente que no se haya observado liberación de citocromo c en estas condiciones. Adicionalmente, Drp-1 es una proteína que colabora en la permeabilización de la membrana mitocondrial. Por lo tanto, los bajos niveles de Drp-1 traslocados a la mitocondria también reforzarían los resultados obtenidos. Posiblemente, el modelo experimental nos ubique en un marco temporal temprano (o incipiente) en lo que respecta al desencadenamiento del proceso apoptótico mediado por el proceso de fisión.

Finalmente se decidió realizar un estudio de la morfología mitocondrial en células marcadas con Mitosox Red (**Figura 51**). El aporte se este experimento consiste en que se logra analizar la morfología mitocondrial en células que presentan un aumento en la generación de anión $O_2^{\bullet-}$. Los resultados obtenidos corroboraron

que la sobreexpresión de AS favorece la fragmentación de las mitocondrias. La coexistencia de fragmentación mitocondrial y generación aumentada de O_2^{\bullet} en células sobreexpresando AS sugiere que la generación de ROS inducida por la sobreexpresión de AS interviene en el desbalance de los eventos de fusión-fisión en respuesta al daño.

Capítulo 4. EFECTO DE AS EN EL PROCESO DE AUTOFAGIA

Si bien los estudios pioneros enfocados a investigar la vía de degradación de AS, proponían que este evento ocurría exclusivamente a través del proteasoma (Bennet et al., 1999; Imai et al., 2000); hoy en día se conoce que el lisosoma es la ruta principal para la eliminación de agregados de esta proteína (Cuervo et al., 2004; Webb et al., 2003). Desde ese momento hasta la actualidad han surgido numerosas investigaciones que vinculan a AS y sus mutantes A30P y A53T con la macroautofagia siendo los resultados controversiales especialmente en lo referente al proceso de mitofagia (Koch et al., 2015; Xilouri et al., 2016).

En este trabajo se abordó el tema analizando los niveles de LC3-II en presencia y ausencia de Baf A1. La sobreexpresión de AS indujo un aumento de los niveles de LC3-II el cual resultó mayor en presencia de Baf A1, sugiriendo que AS activa la autofagia por vía lisosomal (**Figura 52**). Evaluamos luego el rol de la autofagia sobre la viabilidad celular para tratar de esclarecer si la activación de la autofagia en las células con sobreexpresión de AS implica un efecto protector o actúa favoreciendo la muerte celular. El ensayo de viabilidad celular por liberación de LDH reveló que la inhibición de la autofagia empleando Atg5^{K130R} incrementa la citotoxicidad de la AS, mientras que la sobreexpresión de Atg5^{wt} previene el daño. Esta observación implica que la autofagia estaría actuando como un sistema de protección frente al daño inducido por AS (**Figura 53**).

Dado que las mitocondrias disfuncionales son normalmente degradadas por mitofagia, analizamos la ocurrencia de este proceso mediante inmnocitoquímica empleando TOM20 y LC3. El análisis de colocalización calculando el coeficiente de Manders, M₁, indicó que AS promueve la mitofagia (**Figura 55**).

Nuestros resultados permiten concluir que AS promueve la autofagia y que este proceso se activaría para favorecer la viabilidad celular. Además, se produciría un aumento de la mitofagia, resultado coherente con el efecto nocivo, descripto anteriormente, producido por esta proteína en la funcionalidad de la organela.

Referencias Bibliográficas

- Banerjee, K., Sinha, M., Pham, C. L. L., Jana, S., Chanda, D., Cappai, R., & Chakrabarti, S. (2010). α-Synuclein induced membrane depolarization and loss of phosphorylation capacity of isolated rat brain mitochondria: implications in Parkinson's disease. *FEBS letters*, 584(8), 1571-1576.
- Bennett, M. C., Bishop, J. F., Leng, Y., Chock, P. B., Chase, T. N., & Mouradian, M. M. (1999). Degradation of α-synuclein by proteasome. *Journal of Biological Chemistry*, 274(48), 33855-33858.
- Bir, A., Sen, O., Anand, S., Khemka, V. K., Banerjee, P., Cappai, R., Chakrabarti, S. (2014).
 α-synuclein-induced mitochondrial dysfunction in isolated preparation and intact cells:
 Implications in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry*, 131(6), 868-877.
- Borenfreund, E., Babich, H., & Martin-Alguacil, N. (1988). Comparisons of two in vitro cytotoxicity assays—the neutral red (NR) and tetrazolium MTT tests. *Toxicology in vitro*, 2(1), 1-6.
- Chen, S. W., Drakulic, S., Deas, E., Ouberai, M., Aprile, F. A., Arranz, R.,& Klenerman, D. (2015). Structural characterization of toxic oligomers that are kinetically trapped during α-synuclein fibril formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *112*(16), E1994-E2003.
- Cuervo, A. M., Stefanis, L., Fredenburg, R., Lansbury, P. T., & Sulzer, D. (2004). Impaired degradation of mutant α-synuclein by chaperone-mediated autophagy. *Science*, 305(5688), 1292-1295
- Deas, E., Cremades, N., Angelova, P. R., Ludtmann, M., Yao, Z., Chen, S., Devine, M. (2015). Alpha-synuclein oligomers interact with metal ions to induce oxidative stress and neuronal death in Parkinson's disease. *Antioxidants and Redox Signaling*. 24(7):376-91.
- Devi, L., & Anandatheerthavarada, H. K. (2010). Mitochondrial trafficking of APP and alpha synuclein: Relevance to mitochondrial dysfunction in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1802(1), 11-19.
- Devi, L., Raghavendran, V., Prabhu, B. M., Avadhani, N. G., & Anandatheerthavarada, H. K. (2008). Mitochondrial import and accumulation of α-synuclein impair complex I in human dopaminergic neuronal cultures and Parkinson disease brain. *Journal of Biological Chemistry*, 283(14), 9089-9100.
- Ghio, S., Kamp, F., Cauchi, R., Giese, A., & Vassallo, N. (2016). Interaction of α-synuclein with biomembranes in Parkinson's disease-role of cardiolipin. *Progress in lipid research*, 61, 73-82.
- Guardia-Laguarta, C., Area-Gomez, E., Rüb, C., Liu, Y., Magrané, J., Becker, D., Przedborski, S. (2014). α-Synuclein is localized to mitochondria-associated ER membranes. *The Journal of Neuroscience*, 34(1), 249-259.
- Guardia-Laguarta, C., Area-Gomez, E., Schon, E. A., & Przedborski, S. (2015). Novel subcellular localization for α-synuclein: possible functional consequences. Frontiers in Neuroanatomy, (9) 1-17.
- Imai, Y., Soda, M., & Takahashi, R. (2000). Parkin suppresses unfolded protein stressinduced cell death through its E3 ubiquitin-protein ligase activity. *Journal of Biological Chemistry*, 275(46), 35661-35664.
- Jourdain, A., & Martinou, J.-C. (2009). Mitochondrial outer-membrane permeabilization and remodelling in apoptosis. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 41(10), 1884-1889.
- Koch, J., Bitow, F., Haack, J., d'Hedouville, Z., Zhang, J., Tönges, L., Liman, J., Jovin, T. (2015). Alpha-synuclein affects neurite morphology, autophagy, vesicle transport and axonal degeneration in CNS neurons. *Cell death & disease*, 6(7), e1811.

- Landes, T., & Martinou, J.-C. (2011). Mitochondrial outer membrane permeabilization during apoptosis: the role of mitochondrial fission. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1813(4), 540-545.
- Liu, G., Zhang, C., Yin, J., Li, X., Cheng, F., Li, Y., Yu, S. (2009). α-Synuclein is differentially expressed in mitochondria from different rat brain regions and dose-dependently down-regulates complex I activity. Neuroscience letters, 454(3), 187-192.
- Mishra, P., & Chan, D. C. (2016). Metabolic regulation of mitochondrial dynamics. The *Journal of Cell Biology*, 212(4), 379-387.
- Nakamura, K., Nemani, V. M., Azarbal, F., Skibinski, G., Levy, J. M., Egami, K., & Sesaki, H. (2011). Direct membrane association drives mitochondrial fission by the Parkinson disease-associated protein α-synuclein. *Journal of Biological Chemistry*, 286(23), 20710-20726.
- Oyarce, A. M., & Fleming, P. J. (1991). Multiple forms of human dopamine betahydroxylase in SH-SY5Y neuroblastoma cells. [Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. Biochem Biophys, 290(2), 503-510.
- Parihar, M. S., Parihar, A., Fujita, M., Hashimoto, M., & Ghafourifar, P. (2008).
 Mitochondrial association of alpha-synuclein causes oxidative stress. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65(7-8), 1272-1284.
- Parihar, M. S., Parihar, A., Fujita, M., Hashimoto, M., & Ghafourifar, P. (2008).
 Mitochondrial association of alpha-synuclein causes oxidative stress. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65(7-8), 1272-1284.
- Pieri, L., Madiona, K., & Melki, R. (2016). Structural and functional properties of prefibrillar α-synuclein oligomers. *Scientific Reports*, 6, 24526.
- Roberti, M. J., Bertoncini, C. W., Klement, R., Jares-Erijman, E. A., & Jovin, T. M. (2007).
 Fluorescence imaging of amyloid formation in living cells by a functional, tetracysteine-tagged α-synuclein. *Nature methods*, 4(4), 345-351.
- Silva, B. A., Breydo, L., & Uversky, V. N. (2013). Targeting the chameleon: a focused look at α-synuclein and its roles in neurodegeneration. *Molecular neurobiology*, 47(2), 446-459.
- Takahashi, T., Deng, Y., Maruyama, W., Dostert, P., Kawai, M., & Naoi, M. (1994). Uptake of a neurotoxin-candidate, (R)-1,2-dimethyl-6,7-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline into human dopaminergic neuroblastoma SH-SY5Y cells by dopamine transport system. *J Neural Transm Gen Sect*, 98(2), 107-118.
- Tsigelny, I. F., Sharikov, Y., Wrasidlo, W., Gonzalez, T., Desplats, P. A., Crews, L., Masliah, E. (2012). Role of α-synuclein penetration into the membrane in the mechanisms of oligomer pore formation. *FEBS Journal*, 279(6), 1000-1013.
- Uversky, V. N. (2007). Neuropathology, biochemistry, and biophysics of α-synuclein aggregation. *Journal of neurochemistry*, 103(1), 17-37.
- Uversky, V. N., & Eliezer, D. (2009). Biophysics of Parkinson's disease: structure and aggregation of α-synuclein. *Current protein & peptide science*, 10(5), 483.
- Uversky, V. N., & Fink, A. L. (2002). Biophysical properties of human alpha-synuclein and its role in Parkinson's disease. *Recent Research Developments in Proteins*, 1, 153-186.
- Uversky, V. N., Li, J., Souillac, P., Millett, I. S., Doniach, S., Jakes, R., & Fink, A. L. (2002). Biophysical Properties of the Synucleins and Their Propensities to Fibrillate inhibition of α -synuclein assembly by β -and γ -synucleins. *Journal of Biological Chemistry*, 277(14), 11970-11978.
- Vogt, S., Rhiel, A., Weber, P., & Ramzan, R. (2016). Revisiting Kadenbach: Electron flux rate through cytochrome c-oxidase determines the ATP-inhibitory effect and subsequent production of ROS. *BioEssays*, 38(6), 556-567.
- Webb, J. L., Ravikumar, B., Atkins, J., Skepper, J. N., & Rubinsztein, D. C. (2003). α-Synuclein is degraded by both autophagy and the proteasome. *Journal of Biological Chemistry*, 278(27), 25009-25013.

- Weyermann, J., Lochmann, D., & Zimmer, A. (2005). A practical note on the use of cytotoxicity assays. *International Journal of Pharmaceutics*, 288(2), 369-376.
- Xie, H., Hu, L.-S., & Li, G.-Y. (2010). SH-SY5Y human neuroblastoma cell line: in vitro cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Chinese Medical Journal*, 123(8), 1086-1092.
- Xilouri, M., Brekk, O. R., & Stefanis, L. (2016). Autophagy and Alpha-Synuclein: Relevance to Parkinson's Disease and Related Synucleopathies. *Movement Disorders*, 31(2), 178-192.
- Zhang, L., Zhang, C., Zhu, Y., Cai, Q., Chan, P., Uéda, K., Yang, H. (2008). Semi-quantitative analysis of α-synuclein in subcellular pools of rat brain neurons: An immunogold electron microscopic study using a C-terminal specific monoclonal antibody. *Brain research*, 1244, 40-52.

Conclusiones

En el presente trabajo se han descripto experimentos que han contribuido al esclarecimiento del efecto que produce AS sobre el metabolismo mitocondrial, un evento fundamental en el desarrollo de la EP. Los principales hallazgos se resumen a continuación:

En los experimentos que involucraron mitocondrias aisladas y la proteína AS pura se ha demostrado que:

- Mediante el análisis por diferentes técnicas de microscopía se demostró que AS es capaz de asociarse a la MME e incorporarse a los distintos compartimientos, incluso la MA.
- La dinámica de asociación e internalización de AS depende de su concentración y del tiempo de incubación. La asociación es reversible para AS 1µM e irreversible a 10µM.
- AS 100µM se agrega en la mitocondria observándose por MET como partículas de diferente tamaño el cual no se relaciona con su localización submitocondrial.
- AS posiblemente interactúa con la subunidad del transportador de membrana externa, TOM20, sugiriendo que el complejo TOM podría constituir una posible vía de incorporación a la mitocondria.
- AS disminuye la capacidad respiratoria de las mitocondrias, un efecto que es dependiente de la concentración.
- AS 10µM inhibe la actividad del CI de la cadena respiratoria.

- AS 10µM y 100µM disminuyen la capacidad de producción de ATP por parte de la mitocondria. Esto concuerda con la disminución de la capacidad respiratoria.
- AS 10μM induce un aumento de la generación de O₂⁻⁻ lo cual concuerda con la disminución en la actividad del CI.

En los experimentos que involucraron células SH-SY5Y se ha demostrado que:

- AS disminuye la viabilidad celular determinada por tres metodologías diferentes.
- AS aumentó la generación de ROS en concordancia con lo observado en las mitocondrias aisladas y con la inhibición del CI.
- No se observa ocurrencia de eventos apoptóticos. La ausencia de liberación de citocromo c al citosol y de núcleos fragmentados y/o condensados, avalan esta conclusión.
- AS disminuye el número de células presentando mitocondrias elongadas mientras que aumenta el número de células con mitocondrias fragmentadas y con disipación de Δφm, indicando una alteración en el balance entre la fusión y la fisión mitocondrial.
- El análisis de la circularidad mitocondrial reveló que AS aumenta el número de mitocondrias fragmentadas, representado como un aumento de la circularidad y de la morfología de donas junto con una disminución de la interconectividad y de la elongación.

- AS favorece la aparición de una forma corta de Opa-1 de 35kDa. Sin embargo no se observa liberación de Opa-1 al citoplasma en concordancia con la ausencia de liberación de citocromo c.
- AS aumenta la translocación de Drp-1 a la mitocondria, sugiriendo su participación en la fisión mitocondrial.
- El inhibidor de la actividad de Drp-1, Mdivi-1 disminuyó los efectos de AS sobre la morfología mitocondrial demostrando su rol en el proceso de fisión.
- AS aumentó los niveles del marcador de autofagia LC3-II en presencia y ausencia de Baf A1 demostrando que esta proteína induce la activación de la autofagia.
- La sobreexpresión conjunta de AS con Atg5^{K130R} o Atg5^{wt} demostró que el desencadenamiento de la autofagia tiene lugar como mecanismo de rescate celular.
- AS activa la mitofagia probablemente como una vía de degradación de las mitocondrias dañadas.