



Universidad Nacional de Córdoba
Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales
Carrera de Ciencias Biológicas

Defectos en el tráfico intracelular en la patogénesis de la enfermedad de Parkinson

Tesinista:

Milagros Ovejero

Firma:

Director:

Dr. Agustín Anastasía

Firma:

Lugar de trabajo:

**Instituto Ferreyra, INIMEC-CONICET,
Universidad Nacional de Córdoba.**

Friuli 2434, Barrio Parque Vélez Sarsfield (5016), Córdoba.



Defectos en el tráfico intracelular en la patogénesis de la enfermedad de Parkinson

Tribunal examinador:

Dra. Laura Cecilia Giojalas Firma:

Dra. Melina Mara Musri Firma:

Dr. Gustavo Pigino Firma:

Calificación:

Fecha:

Agradecimientos

A mi familia, mi mamá, mi papá y mi hermana que siempre me contuvieron, me ayudaron y confiaron en mí dándome su apoyo en todo momento.

A Barto, que es una de las personas más importantes, siempre sabe sacarme una sonrisa o mejorar mi día pase lo que pase. Y se banca mi mal humor como nadie.

Al resto de la familia, mis abuelas, tías, tíos y primos.

A la educación pública y a la UNC por permitir mi formación académica y mi crecimiento personal durante estos años.

A mis amigas del colegio que son uno de los pilares más importantes, me conocen y acompañan hace más de diez años.

Al Gabi que siempre tiene la palabra justa, y es uno de los mejores compañeros que se puede tener.

Al Agus, que sin él nada de esto hubiera sido posible, me abrió las puertas de su laboratorio, y me hizo sentir siempre como en mi casa. Agradezco infinitamente la paciencia y dedicación que tuvo a la hora de enseñarme durante estos años.

A Mile y Guada, dos genias que siempre me hicieron sentir acompañada dentro del laboratorio y con las que aprendí un montón de cosas.

A la gente del laboratorio, los técnicos, los investigadores y sobre todo a los becarios, en especial a la Gaby por alentarme siempre, a la Jose por la paciencia a la hora de ayudarme con los experimentos, al Seba y a Favio que son dos grandes personas, hacen que las horas en el laboratorio sean mucho más divertidas y siempre que les pedí una ayuda o un consejo se tomaron el tiempo de explicarme con total paciencia.

A Mariano Bisbal por darme una mano con mis experimentos siempre que lo necesité y por los cultivos hipocampales increíbles que hicieron posible este trabajo.

A los chicos de la facu, los que cursan conmigo desde primer año y los que se fueron sumando durante estos años.

Al CIN (Consejo Interuniversitario Nacional) por la BECA “Estímulo a las Vocaciones Científicas 2018” (EVC-CIN).

A las fuentes de financiamiento de nuestro proyecto: NARSAD Young Investigator Grant de la Brain & Behavior Research Foundation, PICT-FONCyT de la Agencia de Promoción Científica y Tecnológica del Ministerio de Ciencia y Tecnología de la Nación.

Índice

Resumen	6
Abstract.....	7
Introducción.....	8
Objetivo general	15
Objetivos específicos	15
Materiales y métodos.....	16
Resultados	25
Discusión.....	35
Bibliografía.....	40

Resumen

La enfermedad de Parkinson (EP) es un desorden neurodegenerativo caracterizado por la pérdida progresiva de neuronas dopaminérgicas de la substantia nigra. Una de las hipótesis en relación a los mecanismos moleculares que participan en el desarrollo de esta enfermedad, postula que defectos en el transporte intracelular es un evento inicial en la patogénesis. Se conoce que un incremento en la expresión de α -sinucleína, y el polimorfismo de nucleótido único (SNP) rs6265 en el gen de BDNF, están asociados con mayor incidencia de la EP. Sin embargo, los mecanismos celulares y moleculares por los cuales estas proteínas participan en esta enfermedad son desconocidos. Utilizando un sistema de última generación para sincronizar la ruta secretoria, encontramos que la expresión de α -sinucleína induce un retraso en el transporte entre el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi de al menos una proteína, y a su vez demora la salida de vesículas desde este último compartimiento hacia los procesos neuronales. Sin embargo, la administración del péptido resultante del SNP rs6265 (llamado pBDNF Met) no indujo cambios en la dinámica del transporte intracelular. Estos resultados sugieren que la toxicidad de α -sinucleína puede deberse, al menos en parte, a la demora o bloqueo de la ruta exocítica de proteínas de membrana o secreción, y que la mayor incidencia de EP en humanos portadores del SNP rs6265 probablemente sea consecuencia de otro mecanismo neurodegenerativo.

Palabras clave: Enfermedad de Parkinson, tráfico intracelular; BDNF; α sinucleína, aparato de Golgi; retículo endoplásmico; sincronización de la ruta secretoria.

Abstract

Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disorder characterized by the progressive loss of dopaminergic neurons of the substantia nigra. One of the hypotheses regarding the molecular mechanisms involved in the development of this disease postulates that defects in the intracellular transport is an initial event in the pathogenesis. It has been reported that an increase in the expression of α -synuclein, and the single nucleotide polymorphism (SNP) rs6265 in the BDNF gene, are associated with a higher incidence of PD. However, the underlying cellular and molecular mechanisms remains to be elucidated. Using a state-of-the-art system to synchronize the secretory pathway, we found that the expression of α -synuclein induces a delay in the transport of proteins between the endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus, and also a delay of the vesicle exit from the Golgi apparatus towards the neuronal processes. However, the administration of the resulting peptide of the SNP rs6265 (named pBDNF Met) did not affect the intracellular transport dynamics. These results suggest that the toxicity of α -synuclein may be due, at least in part, to the delay or blockage of the exocytic pathway of membrane and secretion proteins, and that the higher incidence of PD in the SNP rs6265 carriers might respond to other neurodegenerative mechanism.

Keywords: Parkinson's disease, Intracellular trafficking; BDNF; α -synuclein, Golgi apparatus, endoplasmic reticulum; biosynthetic pathway synchronization.

Introducción

La enfermedad de Parkinson (EP, Parkinson, 1817) es un desorden neurodegenerativo caracterizado por la pérdida progresiva de neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra (SN) con la consecuente desaferentación del cuerpo estriado (Figura 1). La etiología de la enfermedad es todavía desconocida, y se cree que se debe a una combinación de factores genéticos y ambientales.

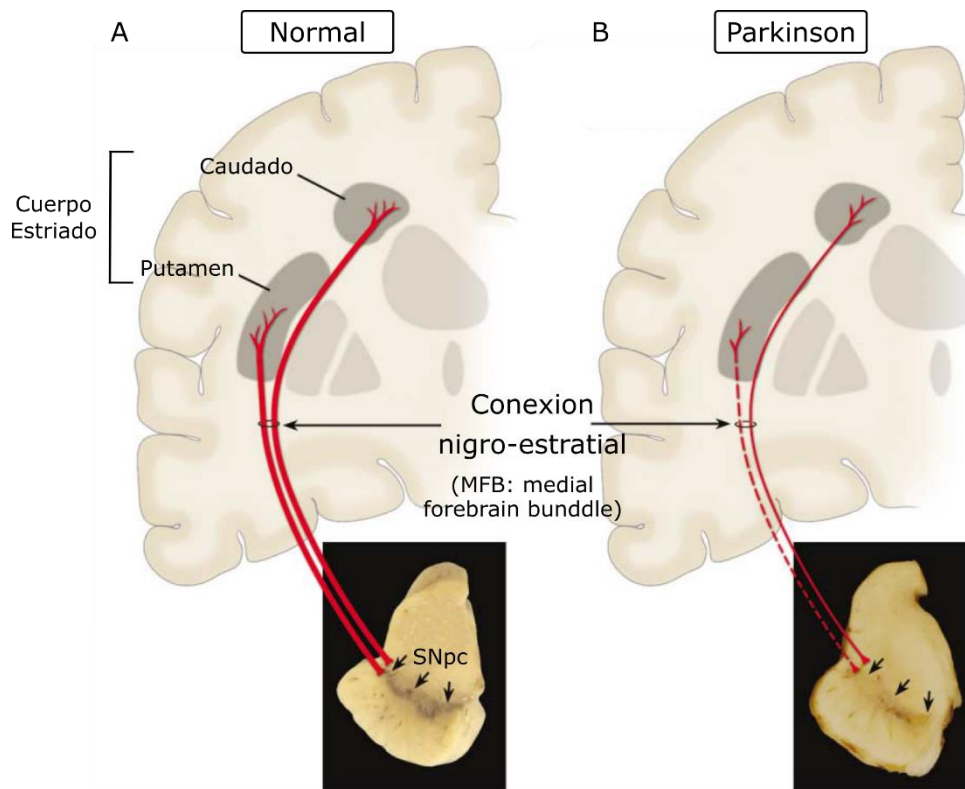


Figura 1. Neuropatología de la enfermedad de Parkinson. A- Representación esquemática del sistema dopaminérgico nigroestriatal en condiciones normales. En rojo se esquematiza la conexión nigroestriatal (MFB, medial forebrain bundle). Esta vía está compuesta de neuronas dopaminérgicas cuyos cuerpos celulares se encuentran en la sustancia nigra (principalmente en la pars compacta (SNpc)) que proyectan hacia los ganglios basales y realizan sinapsis en el cuerpo estriado (putamen y caudado). En la fotografía de la SNpc (panel inferior) se observa la pigmentación normal de la SNpc debido a la neuromelanina presente en los somas de las neuronas dopaminérgicas. B- Representación esquemática de la vía nigroestriatal en pacientes con enfermedad de Parkinson. Hay una marcada pérdida de neuronas dopaminérgicas que se proyectan hacia el estriado. En la fotografía (panel inferior) se puede apreciar la despigmentación de la SNpc debido a la pérdida de neuronas dopaminérgicas y la consecuente desaferentación del estriado. Adaptado de Dauer & Przedborski,

Existen al menos tres hipótesis en relación a los mecanismos moleculares que participan en el desarrollo de esta enfermedad que afecta al 1% de la población mundial de más de 60 años de edad. La primera hipótesis postula que defectos en el plegamiento y agregación de proteínas es la causa de la muerte de las neuronas de la sustancia nigra pars compacta (SNpc, región más propensa a neurodegenerar en EP) (Dauer & Przedborski 2003); en tanto la segunda hipótesis plantea que la disfunción mitocondrial y el consecuente estrés

oxidativo inducido por la exposición a toxinas ambientales y/o especies tóxicas generadas por el metabolismo de la dopamina, son factores desencadenantes de la EP (Cohen 1984; Dauer & Przedborski 2003). La tercera hipótesis propone que defectos en la ruta biosintética y en el transporte intracelular de vesículas son eventos iniciales en la patogénesis de la EP (Morfini 2007; Hunn 2015; Mazzulli 2016; Fang 2017). Estos tres grandes grupos de factores patogénicos no son mutuamente excluyentes, y uno de los mayores objetivos de la investigación en EP es dilucidar la secuencia de eventos que ocurren y las interacciones entre estas tres hipótesis que probablemente oculten la clave de la neurodegeneración del sistema dopaminérgico nigroestriatal (Dauer & Przedborski 2003). Un ejemplo de la interacción entre estas hipótesis es el descubrimiento de que el daño oxidativo incrementa el mal plegamiento y agregación de la proteína α -sinucleína que se convierte en tóxica para las neuronas dopaminérgicas en esta conformación (Giasson 2000). Además, se conoce que la acumulación y multimerización de proteínas altera el tráfico intracelular y vías de señalización (Fang 2017). Interesantemente, se desconocen las causas y los pasos iniciales de la acumulación de proteínas como α -sinucleína. Recientemente se han encontrado varios genes que participan en el tráfico intracelular que podrían modular la ruta exocítica y hacia el lisosoma provocando la acumulación tóxica de proteínas (Abeliovich 2016; Gonçalves 2017). Adicionalmente se ha propuesto que el estrés oxidativo inducido por la droga 1-metil-4-fenilpiridina (MPP+) utilizada para modelar la EP, afecta el tráfico vesicular en axones sugiriendo que este defecto en el transporte podría ser un evento temprano en el desarrollo de esta enfermedad (Morfini 2007). A pesar de estos estudios sobre el tráfico vesicular en la patogénesis de la EP, la contribución de posibles defectos en el tráfico entre el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi, y la salida de vesículas del aparato de Golgi hacia los procesos neuronales han sido escasamente estudiados.

En los últimos años mediante técnicas de genética molecular se han revelado importantes influencias genéticas en el desarrollo de la EP. En pacientes con EP hereditaria, que afecta aproximadamente al 5% de los casos, se han encontrado varios genes mutados asociados con la enfermedad (Schapira 2009). Aunque las mutaciones en estos genes no explican los casos esporádicos (~95% de los afectados), brindan información muy valiosa sobre los posibles mecanismos neurodegenerativos. Entre los genes más estudiados y de los cuales se conoce mejor su participación en la patogénesis de la EP, se encuentran α -sinucleína, parkina (una ubiquitín-ligasa), UCH-L1 (una ubiquitín hidrolasa), PINK1 (una proteína quinasa mitocondrial), y DJ-1 (una chaperona que participa en la respuesta al estrés

oxidativo) (Feany 2004). Además, se conoce que ciertos polimorfismos humanos, como el polimorfismo de nucleótido único (SNP) rs6265 en el gen de BDNF, también están asociados con la incidencia de la EP esporádica. Pero esta correlación solo se observa en algunas poblaciones (Hakansson 2003; Karakasis 2011) sugiriendo que este SNP es un factor de susceptibilidad que requiere la interacción con otras variantes genéticas y/o ambientales para contribuir al desarrollo de la EP. Además, este SNP se encuentra altamente correlacionado con un mayor deterioro cognitivo en pacientes con esta dolencia (Momose 2002; Guerini 2009; Altmann 2016).

El SNP rs6265 en el gen de BDNF está presente en ~25% de la población mundial (según la base de datos SNPedia, www.snpedia.com). BDNF pertenece a la familia de las neurotrofinas, una familia de factores neurotróficos que actúan como reguladores de la supervivencia, diferenciación y función neuronal, además de ser moduladores de la plasticidad sináptica. Esta familia de proteínas tiene un rol esencial en la comunicación parácrina entre neuronas y con otras células de su entorno. BDNF es uno de los factores tróficos más importantes y estudiados, y se traduce como una proteína precursora (llamada proBDNF) que consiste en un prodominio amino-terminal y un dominio maduro carboxiterminal (llamado mBDNF) (Figura 2A). ProBDNF puede escindirse por acción de la enzima furina en la red del trans-Golgi o proconvertasas en vesículas secretoras (Teng 2010) liberando el mBDNF y el prodominio que de ahora en más llamaremos pBDNF (Figura 2A). Anteriormente se creía que una vez que proBDNF se procesaba, el pBDNF liberado se degradaba rápidamente. Sin embargo, resultados de nuestro grupo de investigación demostraron por primera vez que pBDNF se encuentra presente en altos niveles en el sistema nervioso central incluyendo el hipocampo (Anastasia 2013), sistema dopaminérgico nigroestriatal, y líquido cefalorraquídeo humano y murino (resultados no publicados de nuestro laboratorio). Interesantemente, el SNP rs6265 de una valina por una metionina en la posición 66 (Val66Met) en medio de la secuencia del pBDNF (Figura 2A).

Tanto mBDNF, pBDNF, como proBDNF pueden secretarse de neuronas de manera dependiente de la actividad después de la despolarización inducida por cloruro de potasio o estimulación eléctrica (Yang 2009; Nagappan 2009; Anastasia 2013). Resultados recientes sugieren que la isoforma más abundante en el desarrollo embrionario es proBDNF, mientras que en la adultez las isoformas más abundantes son pBDNF y mBDNF (Anastasia 2013; Yang 2014). El mBDNF secretado puede unirse al receptor tirosina quinasa TrkB (tropomyosin receptor kinase B) para promover la supervivencia neuronal, diferenciación, neurogénesis y

plasticidad sináptica (Barbacid 1994; Park 2013), o al receptor p75NTR (p75 neurotrophin receptor) para inducir muerte neuronal (Friedman 2010; Kraemer 2014) (Figura 2B). Por otro lado, proBDNF promueve la apoptosis neuronal y el remodelado de procesos uniéndose a un complejo de receptores no relacionados formado por p75NTR y sortilina, un miembro de la familia de los receptores Vps10p (Vacuolar protein sorting 10 protein; Teng 2005) (Figura 2B).

Nuestro grupo de investigación encontró que pBDNF también puede tener efectos sobre neuronas. En particular, la sustitución Val66Met confiere bioactividad a pBDNF ya que solo la variante Met afecta la estructura de neuronas hipocampales (Anastasia 2013; Giza 2018) y es capaz de inducir apoptosis y cambios estructurales en neuronas dopaminérgicas (datos no publicados de nuestro laboratorio).

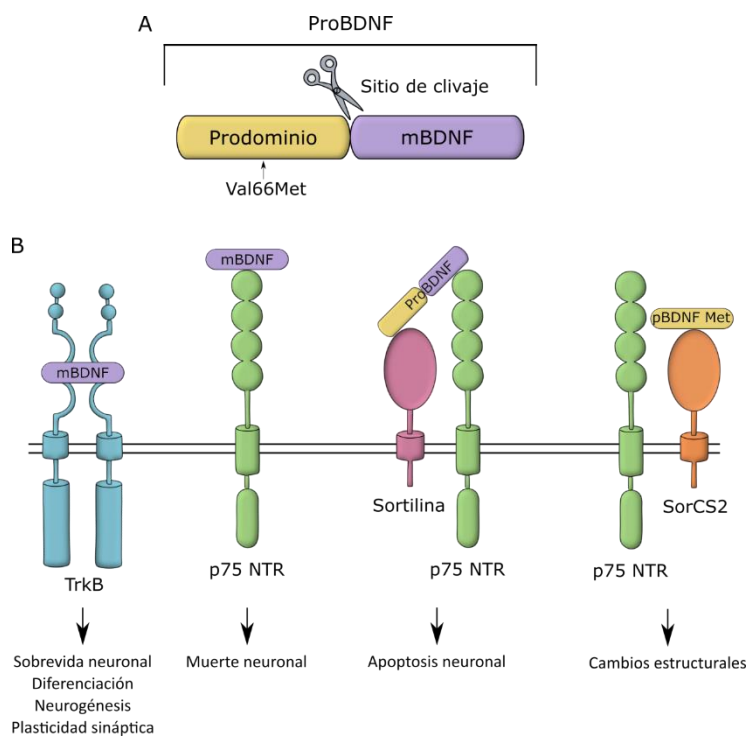


Figura 2. Isoformas de BDNF junto a sus receptores y funciones. A- Estructura de proBDNF en el que se esquematiza el sitio de sustitución Val66Met y el sitio de clivaje enzimático. Luego del procesamiento de proBDNF se libera BDNF maduro (mBDNF, en violeta) y el prodominio de BDNF (pBDNF, en amarillo). B- El mBDNF se puede unir al receptor tirosina quinasa TrkB para promover la supervivencia neuronal, diferenciación, neurogénesis y plasticidad sináptica, o al receptor p75NTR para señalar muerte neuronal. Por otro lado, proBDNF promueve la apoptosis neuronal uniéndose a un complejo de receptores formado por p75NTR y sortilina. Por último, el pBDNF en su variante polimórfica Met se une al receptor SorCS2 (miembro de la familia de sortina) y en cooperación con el receptor p75NTR, afecta la estructura de neuronas hipocampales. Interesantemente, pBDNF Val es inerte y se desconoce su función.

A partir de estas publicaciones, otros grupos independientes han replicado y expandido estos resultados (Mizui 2015; Guo 2016). Los efectos del pBDNF Met son mediados por los receptores SorCS2 (sortilin related Vps10 domain containing receptor 2) y p75NTR (Anastasia 2013). Experimentos de biología estructural (resonancia magnética nuclear y distintas espectroscopias) demostraron que la sustitución conlleva a un cambio en la conformación de pBDNF desde una estructura en lámina β en pBDNF Val, a una conformación helicoidal alrededor de la posición 66 en pBDNF Met (Anastasia 2013). Se ha sugerido que este cambio conformacional promueve una interacción diferencial de ambas variantes con el receptor SorCS2, confiriendo actividad solo a la isoforma Met que de alguna manera desconocida

interactúa con el receptor de manera favorable. Sin embargo, el mecanismo celular y molecular por el cual el complejo de señalización pBDNF-Met/SorCS2/p75NTR afecta la estructura y supervivencia neuronal es desconocido. Una posibilidad es que el prodominio Met esté afectando el tráfico intracelular y de esta manera afectando la estructura y supervivencia de neuronas.

Existe un conjunto de enfermedades causadas por α -sinucleína denominadas sinucleinopatías, entre estas la más estudiada es la EP. La proteína α -sinucleína está compuesta por 140 aminoácidos y posee un rol en la regulación de la liberación de neurotransmisores y en la plasticidad neuronal (Withers 1997; Mouradian 2002; Lee 2008; Zhang 2008). Se caracteriza por un extremo amino rico en lisina anfipático, que tiene un papel crucial en la modulación de sus interacciones con las membranas, y una cola carboxi-terminal ácida desordenada (Ulmer 2005; Eliezer 2001). La acumulación excesiva de α -sinucleína puede darse por duplicación de una copia del gen, por mutaciones puntuales, o por mutaciones de parkina y UCH-L1 que disminuyen la eliminación normal de ésta proteína por la vía ubiquitin-proteosoma. Hasta el momento se han descubierto dos mutaciones poco frecuentes de α -sinucleína, Ala53Thr y Ala30Phe, en familias con una forma autosómica dominante y de aparición temprana de la EP. α -sinucleína puede asumir varias conformaciones desde monomérica, pasando por oligomérica, y hasta fibrilar. Cuando se encuentra fibrilar es insoluble y forma unos agregados intracelulares llamados cuerpos de Lewy (Spillantini 1997) (Figura 3).

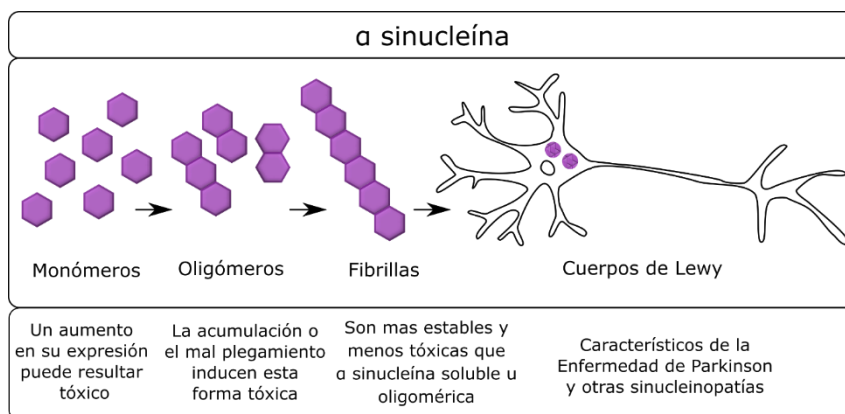


Figura 3. Conformaciones de α -sinucleína y su impacto neuropatológico. α -sinucleína (representada como hexágonos violetas) puede asumir varias conformaciones desde monomérica, pasando por oligomérica, y hasta fibrilar. Cuando se encuentra fibrilar es insoluble y forma unos agregados intracelulares llamados cuerpos de Lewy que son característicos de la enfermedad de Parkinson y de otras enfermedades llamadas sinucleinopatías. Recientemente se ha postulado que la conformación fibrilar es más estable y menos tóxica que la oligomérica.

Estas inclusiones encontradas en el soma de las neuronas dopaminérgicas de la substantia nigra son características de la EP tanto hereditaria como esporádica (Mouradian 2002). Actualmente se postula que las especies más tóxicas son las oligoméricas (Rockenstein 2014; Winner 2011) y que las isoformas fibrilares son estructuras más estables y menos dinámicas que exhiben toxicidad reducida (Lashuel 2013). Aunque α -sinucleína se expresa extensamente en el sistema nervioso central, la muerte neuronal y la formación de cuerpos de Lewy en la EP se limitan principalmente a la substantia nigra (Maries 2003). Una posible explicación a la degeneración selectiva de las neuronas dopaminérgicas es que haya una interacción entre conformaciones tóxicas de α -sinucleína y el metabolismo de la dopamina (Maries 2003). Esta hipótesis se fundamenta en que tanto la dopamina, así como sus precursores y metabolitos de degradación, se oxidan enzimáticamente o por autooxidación generando especies reactivas del oxígeno (ROS) que pueden activar cascadas apoptóticas (Mouradian 2002). A su vez, se ha demostrado que las ROS aceleran la agregación de α -sinucleína en protofibrillas in vitro (Ostrerova-Golts 2000; Kim 2002) lo que podría ser un mecanismo patogénico adicional.

La acumulación de α -sinucleína y/o su mal plegamiento generan estrés de retículo endoplásmico (RE) que resulta en la acumulación de proteínas dentro de dicha organela. Estas proteínas posteriormente se transportan desde el RE al citoplasma para su degradación por el proteosoma a través de un proceso denominado ERAD: degradación asociada al retículo endoplásmico (McCracken & Brodsky 2003). Se ha reportado que ciertos sustratos de ERAD deben ser transportados desde el RE al aparato de Golgi para luego ser degradados. Interesantemente, se ha demostrado que α -sinucleína afecta el tráfico entre estos dos compartimientos en levaduras (Cooper 2006), e induce la detención del crecimiento y la posterior muerte celular (Outeiro & Lindquist 2003). Cabe remarcar que la sobreexpresión de α -sinucleína silvestre (wild type) y de la mutante Ala53Thr afectan de manera similar el tráfico de proteínas entre el RE y el aparato de Golgi, y ambos resultan en efectos citotóxicos comparables en estas células (Cooper 2006). Es importante remarcar que estos experimentos aún no han sido replicados en neuronas. A pesar de las numerosas publicaciones sobre α -sinucleína y EP, los mecanismos por los cuales esta proteína participa en la patogénesis de la enfermedad son debatidos. Además, aun se discute acerca de cuáles son los mecanismos celulares y moleculares por los cuales la sobreexpresión y/o la multimerización de α -sinucleína contribuyen a la neurodegeneración. Una posibilidad es que

α -sinucleína afecte el tráfico de la vía exocítica en neuronas, como lo hace en levaduras, y de esta manera participe en la neurodegeneración.

Como se expuso anteriormente, se postula que una de las posibles causas de la EP son los defectos en el transporte intracelular que podrían resultar en menor tráfico de membrana, menor exposición de receptores, y menor secreción de factores tróficos (FT) entre otras proteínas. Estos defectos podrían deberse a diversas causas genéticas y ambientales (Figura 4). **En este trabajo hipotetizamos que pBDNF Met y α -sinucleína, ambas proteínas asociadas en mayor o menor medida con la EP, impiden o retrasan el tráfico de proteínas del retículo endoplásmico (RE) al aparato de Golgi, y/o del aparato de Golgi a los procesos neuronales (Figura 4).** Para poner a prueba esta hipótesis, se utilizó un sistema de última generación de sincronización de proteínas en la ruta secretoria.

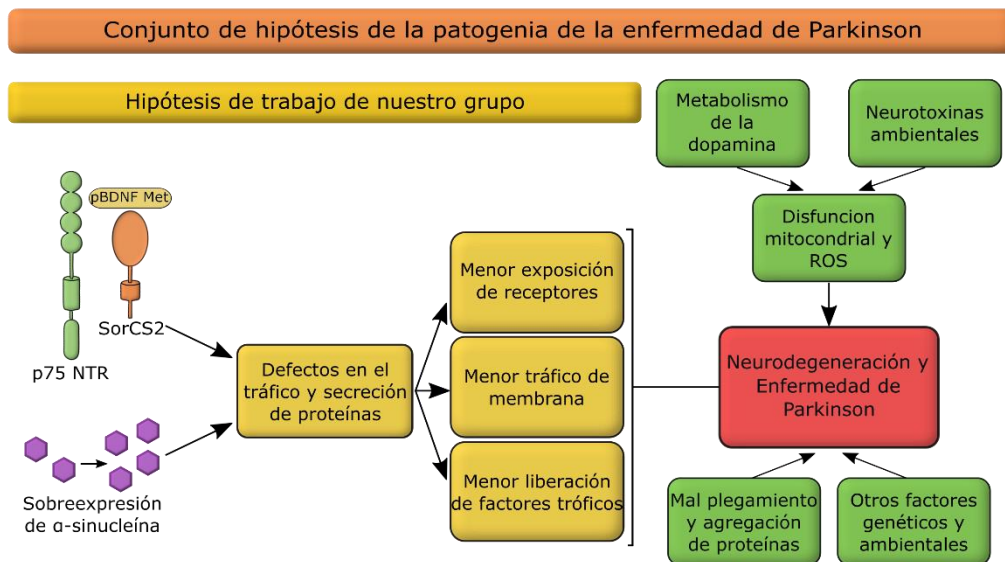


Figura 4. Resumen del conjunto de hipótesis sobre la patogénesis de la enfermedad de Parkinson. Existen al menos tres hipótesis en relación a los mecanismos moleculares que participan en el desarrollo de la enfermedad de Parkinson. La primera hipótesis propone que defectos en el plegamiento y agregación de proteínas es la causa de la muerte de las neuronas de la sustancia nigra, la segunda hipótesis plantea la disfunción mitocondrial y el consecuente estrés oxidativo inducido por la exposición a toxinas ambientales y/o especies tóxicas generadas por el metabolismo de la dopamina, como factores desencadenantes de la EP. Nuestro laboratorio está abocado al estudio de la tercera hipótesis. Esta postula que defectos en el transporte intracelular que pueden resultar en menor tráfico de membrana, menor exposición de receptores, y menor secreción de factores tróficos (entre otras proteínas) podrían ser los responsables de la neurodegeneración. En este trabajo hipotetizamos que pBDNF Met y α -sinucleína, ambas proteínas asociadas en mayor o menor medida con la EP, impiden o retrasan el tráfico de proteínas del retículo endoplásmico (RE) al aparato de Golgi, y/o del aparato de Golgi a los procesos neuronales. Esta hipótesis de trabajo de nuestro grupo de investigación esta resumida y esquematizada en cuadros amarillos.

Objetivo general

Determinar si pBDNF variante Met y α -sinucleína están afectando el tráfico de proteínas desde el retículo endoplásmico al aparato de Golgi y desde el aparato de Golgi a los procesos neuronales. Estos experimentos permitirán proponer un mecanismo celular que podría contribuir al desarrollo de la enfermedad de Parkinson.

Objetivos específicos

- 1- Evaluar si pBDNF Met altera el tráfico intracelular de proteínas entre el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi, y entre el aparato de Golgi y los procesos neuronales, en neuronas en cultivo. Para llevar a cabo este objetivo se utilizó el receptor de transferrina como proteína modelo para estudiar el tráfico intracelular.
- 2- Determinar si la sobreexpresión de α -sinucleína impacta en el tráfico intracelular de proteínas entre el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi, y entre el aparato de Golgi y los procesos neuronales, en neuronas en cultivo. Para llevar a cabo este objetivo se utilizó el receptor p75NTR como proteína modelo para estudiar el tráfico intracelular.

Materiales y métodos

Animales y cultivos neuronales

Se utilizaron ratas Wistar preñadas en estadio gestacional E18,5. Los animales fueron mantenidos en el vivario del Instituto Ferreyra (INIMEC-CONICET-UNC) en condiciones estándares, con ciclo luz y oscuridad de 12hs y con acceso libre a comida y agua. Los experimentos fueron realizados siguiendo los lineamientos de la “Guide for the care and use of laboratory animals” (National Research Council, USA). A pesar de que la enfermedad de Parkinson (EP) ocurre por degeneración de neuronas dopaminérgicas, en este trabajo utilizamos como una primera aproximación cultivos primarios de neuronas hipocampales (de 8 días in vitro (DIV), Kaech 2006) por su facilidad de cultivo, homogeneidad, y porque los constructos transfectados para sincronizar la ruta biosintética han sido validados en este tipo neuronal (resultados no publicados del Dr. Bisbal (Instituto Ferreyra), y de nuestro laboratorio). Experimentos futuros que exceden el presente trabajo, serán realizados en neuronas dopaminérgicas provenientes de cultivos mesencefálicos que son más relevantes para la EP; sin embargo, estos presentan ciertas desventajas como la dificultad de cultivo, que no son homogéneos con solo un 4-6% de neuronas dopaminérgicas, y que el tráfico intracelular no ha sido caracterizado en detalle en este tipo neuronal.

Diseño experimental para los dos objetivos y sistema de sincronización FM de la ruta exocítica:

Para estudiar el tráfico de proteínas dentro del sistema de endomembranas se utilizó un sistema de última generación de sincronización de proteínas en la ruta secretoria. Este sistema consiste en la expresión de proteínas fusionadas a dominios FM que inducen la agregación condicional y por lo tanto una vez que son expresadas por la célula se retienen en el retículo endoplásmico (RE). Los dominios FM son variantes de la proteína FK506 binding protein 12 (FKBP12) que tienen la capacidad de autoagregarse reversiblemente en homooligómeros que se disocian rápidamente después de la adición de la droga permeable a la membrana DD-solubilizer (Thuenauer 2014). Las proteínas que se utilizaron como modelo fueron el receptor p75NTR y el receptor de transferrina (TR), sin interesar en el presente trabajo el rol de estos receptores en la patogenia de la EP. Mediante la adición de una droga específica al medio de cultivo, estas proteínas se pueden desagregar y de manera sincronizada ser transportadas al aparato de Golgi, para luego continuar su ruta vesicular a

los procesos neuronales (Figura 5A). Este sistema permite cuantificar si existe un cambio en la dinámica de transporte entre compartimientos. El constructo para estudiar el tráfico de TR (proteína transmembrana de tipo II) consiste en el receptor flanqueado en el extremo C-terminal por la GFP (green fluorescent protein), un sitio de clivaje por furina y 4 repeticiones de los dominios FM (Figura 5B). Por otro lado, el vector para estudiar el tráfico de p75NTR (proteína transmembrana de tipo I) consiste en el receptor flanqueado en el extremo c-terminal por la GFP (green fluorescent protein), y en el extremo N-terminal por un sitio de clivaje por furina, seguido de 4 repeticiones de los dominios FM, y finalmente un péptido señal (Figura 5B). El péptido señal asegura la inserción en la membrana del ER durante la síntesis. El sitio de clivaje por furina permite que los dominios FM sean escindidos en el aparato de Golgi donde esta enzima se encuentra presente.

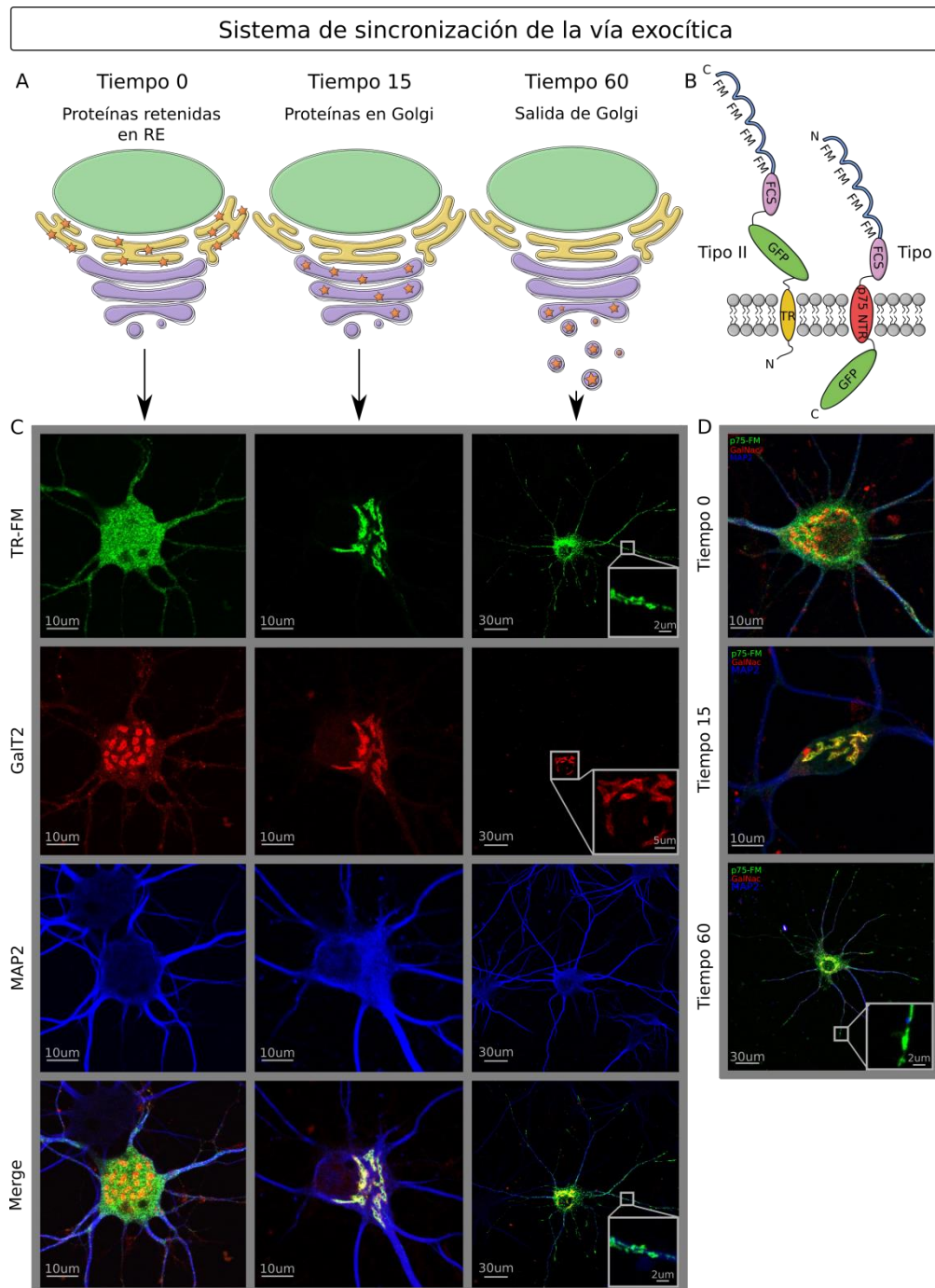


Figura 5. Sistema de sincronización de la ruta biosintética/exocítica. A- Esquema de la ubicación intracelular de las proteínas estudiadas (receptor de transferrina (TR) y el receptor p75NTR) representadas como estrellas anaranjadas. Previo a la adición de la droga desagregante (DD Solubilizer, Tiempo 0) las proteínas se encuentran ancladas en el retículo endoplásmico (RE). 15 minutos luego de la desagregación las proteínas se liberan continuando con la ruta secretoria y se pueden visualizar dentro del aparato de Golgi. A los 60 minutos ya se produjo una salida significativa de vesículas hacia los procesos neuronales, aunque todavía hay una proporción remanente en el aparato de Golgi. B- Diagrama esquemático mostrando la estructura de la proteína de fusión para la sincronización de la vía exocítica. Se observan las cuatro repeticiones de los dominios FM, el sitio para clivaje de furina (FCS: furin cleavage site), el fluoróforo reportero (GFP) y la proteína de interés (TR o p75NTR). C- Imágenes representativas de microscopía confocal de TR-GFP, GalT2 (marcador del aparato de Golgi) y MAP2 (marcador de dendritas) a tiempo 0, 15 y 60 luego de la desagregación y salida del RE. D- Imágenes representativas de microscopía confocal de p75NTR-GFP, GalNac (marcador del aparato de Golgi) y MAP2.

Actividades específicas objetivo 1:

Para estudiar la dinámica de tráfico del receptor de transferrina (TR), neuronas hipocampales DIV8 se transfectaron con el plásmido de sincronización TR-GFP-FM y con un plásmido que codifica para la glicosil-transferasa residente del aparato de Golgi GalT2 unida al fluoróforo mCherry (proteína roja fluorescente) para marcar esta organela. Estas proteínas se expresaron por 16hs, y durante todo este periodo los cultivos estuvieron en presencia de pBDNF Met, pBDNF Val, o de vehículo (PBS). Ambos pBDNFs fueron generados recombinantes en cultivos de bacterias y purificados en columnas de afinidad (detalles debajo) y se administraron solubles al medio de cultivo. Las concentraciones de pBDNF elegidas para el tratamiento fueron de 20 ng/ml que están dentro del rango fisiológico encontrado en el líquido cefalorraquídeo humano y murino (resultados no publicados de nuestro laboratorio). Luego de 16 hs de expresión y tratamiento, se administró cicloheximida (100 µg/ml, Sigma) por 1 hora para inhibir la síntesis de proteínas, y luego se administró el agente desagregante DD-solubilizer (250 nM, Clontech) (Figura 6). Los cultivos se fijaron a T0 (previo a la administración de la droga), 15 y 60 minutos posteriores a la adición de esta droga (Figura 6). Se identificaron las dendritas mediante la inmunomarcación con anticuerpos anti-MAP2 (microtubule-associated protein 2) que se localiza específicamente en este compartimiento neuronal. Las imágenes de todos los canales (TR-GFP, GalT2-RFP, y MAP2 marcados con secundarios conjugados con Alexa 633) se observaron y digitalizaron utilizando un microscopio confocal (Zeiss LSM 800). Posteriormente, se analizaron los siguientes parámetros calibrados: intensidad de TR-GFP en el RE, intensidad de TR-GFP en el aparato de Golgi, e intensidad de TR-GFP en los procesos en las tres condiciones experimentales (pBDNF Met, pBDNF Val, vehículo) a T0, T15 y T60 luego de la adición del

agente desagregante. Todas estas cuantificaciones fueron llevadas a cabo con el software FIJI is just ImageJ (<https://fiji.sc>).

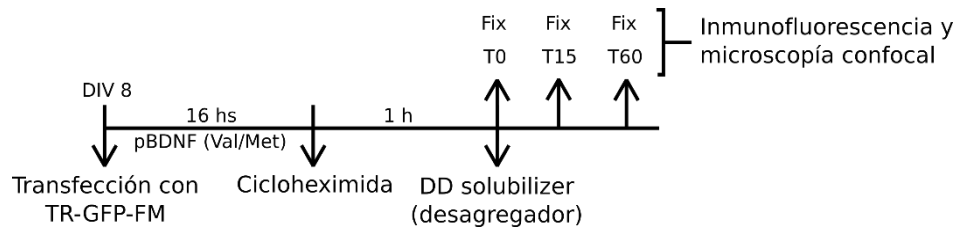


Figura 6. Diseño experimental correspondiente al objetivo 1. Neuronas hipocampales de 8DIV fueron transfectadas con TR-GFP-FM y GalT2 (para marcar el aparato de Golgi). Durante las siguientes 16hs de expresión, estuvieron en presencia de pBDNF Val y pBDNF Met (20 ng/ml). Se adicionó cicloheximida para detener la síntesis proteica, y una hora después las células se fijaron (Fix) antes de administrar la droga desagregante (T0). Otras replicas fueron fijadas a los 15 y 60 minutos después de la desagregación. Finalmente se realizó una inmunofluorescencia para marcar la proteína dendrítica MAP2 y se tomaron las imágenes utilizando un microscopio confocal. La línea temporal no está representada a escala.

Actividades específicas objetivo 2:

Para estudiar la dinámica de tráfico del receptor p75NTR, neuronas hipocampales DIV8 fueron transfectadas con el plásmido de sincronización p75NTR-GFP-FM y con un plásmido que codifica para la glicosil-transferasa residente del aparato de Golgi GalNac unida al fluoróforo CFP (cyan fluorescent protein) para marcar esta organela. Además, se expresó α -sinucleína fusionada al fluoróforo mCherry, o el mismo plásmido vacío (empty vector) como control (Figura 7).

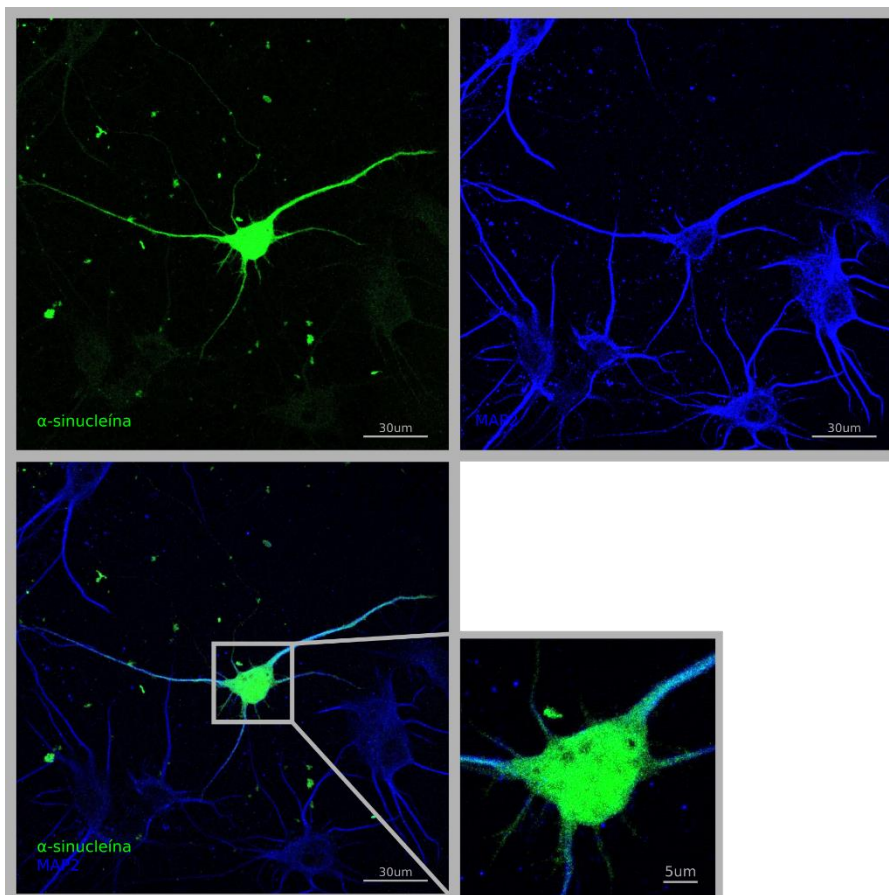


Figura 7. Expresión del constructo de α -sinucleína. Micrografía de neuronas hipocampales expresando α -sinucleína-mCherry 7 horas luego de la transfección. α -sinucleína se distribuye homogéneamente por el soma neuronal y los procesos corroborando su distribución soluble en el citosol. α -sinucleína se visualiza en verde, mientras que MAP2 (para marcar dendritas) se puede visualizar en azul.

Las proteínas fueron expresadas por 8hs. Luego de este tiempo, se administró cicloheximida (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Sigma) por 1 hora para inhibir la síntesis de proteínas, y luego se administró el agente desagregante DD-solubilizer (250nM, Clontech) (Figura 8). Los cultivos se fijaron a T0 (previo administración de la droga), 15 y 60 minutos posteriores a la adición de esta droga (Figura 8). Finalmente se identificaron las dendritas mediante la inmunomarcación con anticuerpos anti-MAP2. Las imágenes de todos los canales (p75NTR-GFP, GalNac-CFP, α -sinucleína-mCherry y MAP2 marcados con secundarios conjugados con Alexa 633) se observaron y digitalizaron utilizando un microscopio confocal (Zeiss LSM 800). Posteriormente, se analizaron los siguientes parámetros calibrados: intensidad de p75NTR-GFP en el RE, intensidad de p75NTR-GFP en el aparato de Golgi, e intensidad de p75NTR-GFP en los procesos en las dos condiciones experimentales (con y sin α -sinucleína) a T0 (previo a la adición del agente desagregante), T15 y T60 luego de la adición del agente desagregante. Todas estas cuantificaciones fueron llevadas a cabo utilizando el software FIJI.

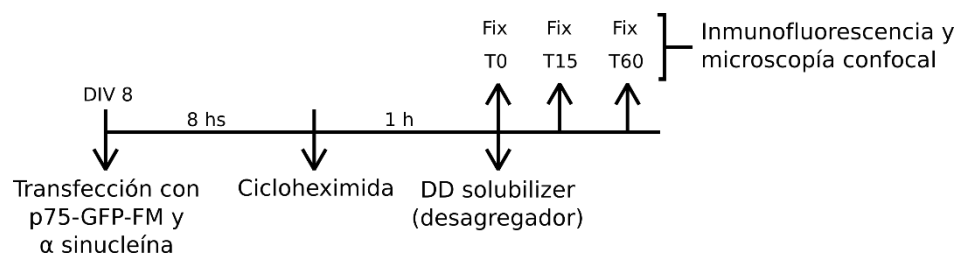


Figura 8. Diseño experimental correspondiente al objetivo 2. Neuronas hipocámpicas de 8DIV fueron transfectadas con p75NTR-GFP-FM y GalNac (para marcar el aparato de Golgi). Se co-transfectó α -sinucleína o el mismo vector vacío como control, y se permitió la expresión de las proteínas por 8 horas. Se adicionó cicloheximida para detener la síntesis proteica, y una hora después las células se fijaron (Fix) antes de administrar la droga desagregante (T0). Otras replicas fueron fijadas a los 15 y 60 minutos después de la desagregación. Finalmente se realizó una inmunofluorescencia para marcar la proteína dendrítica MAP2 y se tomaron las imágenes utilizando un microscopio confocal. La línea temporal no está representada a escala.

Metodología general

-Cultivo de hipocampo.

Se realizó mediante la técnica estándar (Kaech 2006). Brevemente, a partir de embriones de rata en estadio embrionario 18,5 (E18,5) se disecó el hipocampo y las neuronas se disociaron con tripsina (Gibco). Las neuronas fueron sembradas en cubreobjetos previamente tratados con polietilenimina (PEI, Sigma) y en medio de siembra (MEM + 10% suero de caballo + glutamax + penicilina/estreptomicina, todos de

la marca Gibco) por 3hs. Posteriormente se reemplazó el medio por neurobasal (Gibco) con suplementos estándares (B27/GS21/B27+, glutamax, penicilina/estreptomicina, todos de la marca Gibco) sin suero. El medio se reemplazó parcialmente cada 3 días.

-Transfección.

Se realizó en neuronas de 8 DIV utilizando Lipofectamina 2000 (Invitrogen) y OptiMEM (Invitrogen) siguiendo las indicaciones del fabricante.

-Producción y purificación de los pBDNF recombinantes.

Se utilizó el plásmido pET28 (Novagen) que contiene el gen de pBDNF humano Val o Met (aminoácidos 19-128 del pBDNF precedidos por un tag N-terminal de 6 histidinas y Small Ubiquitin-like Modifier (SUMO)) (Anastasia 2013). Este plásmido fue transformado en células competentes *E. coli* (BL21(DE3)pLysS) (Invitrogen). Las muestras de pBDNF fueron purificadas usando columnas cargadas con resina de níquel (Ni-NTA, Invitrogen). Luego, el tag de 6 histidinas y SUMO fue clivado por proteólisis con la enzima Ulp-1 que también contenía un tag de 6 histidinas. Para la purificación final de los pBDNF, la muestra fue seleccionada negativamente en una segunda columna con resina de níquel, donde el pBDNF ya sin tags fue obtenido en la fracción eluída (flow through). En esta segunda columna el tag de 6 histidinas + sumo y la proteína Ulp-1 fueron retenidas en la columna. La proteína resultante fue precipitada usando acetona, resuspendida y dializada en 50mM NaH₂PO₄ 100mM NaCl pH 7.0. La pureza de los pBDNF fue evaluada por SDS-PAGE utilizando Coomassie blue y métodos de tinción de plata. La concentración de prodominios fue calculada usando el coeficiente de absorción UV para una proteína desordenada en agua ($\epsilon(280)=4,470 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), y confirmada usando el método de Bradford.

-Inmunofluorescencia.

Los cultivos fueron fijados con 4% paraformaldehído (Aldrich) en PBS + 4% de sucrosa (Anedra). Se permeabilizaron las membranas con Tritón X100 (Biorad) 0,1% en PBS. Posteriormente se trató con Tween (Biopack) 0,1% en PBS y luego se utilizó el anticuerpo anti MAP2 hecho en ratón (Sigma, 1:1000, 1h a temperatura ambiente) en la misma solución, seguido de anticuerpo secundario anti IgG de ratón conjugado con Alexa 633 (ThermoFisher, 1:1000, 1 h a temperatura ambiente) en la misma solución.

-Microscopia.

Para controlar las inmunodetecciones se utilizó un microscopio de epifluorescencia (Nikon, Eclipse TE-2000E). Para adquirir las imágenes se utilizó el microscopio confocal

ZEISS LSM 800 ya que se requiere una mayor resolución espacial en el plano z para poder colocalizar precisamente las distintas marcas.

-Análisis de imágenes.

Se realizó con el software FIJI is just ImageJ (<https://fiji.sc>). Para cada uno de los tiempos se utilizaron metodologías de cuantificación diferentes. Para el tiempo 0, en el cual las proteínas se encuentran ancladas en el RE, se midió la intensidad de fluorescencia de p75NTR-GFP o de TR-GFP en el soma neuronal donde este compartimiento se encuentra distribuido. Para realizar esto se hizo una selección (ROI) del soma, excluyendo la zona del núcleo y luego se cuantificó la intensidad promedio de GFP en toda la selección (Figura 9A). Para el tiempo 15, en el cual las proteínas se encuentran en el aparato de Golgi, se realizó una máscara del aparato de Golgi en el canal de GalT2 o GalNac según corresponda, y una vez realizada se procedió a aplicarla sobre el canal de p75NTR-GFP o TR-GFP y se cuantificó la intensidad de GFP en dicha selección (Figura 9B). Finalmente para el tiempo 60 se realizó una selección del aparato de Golgi en el canal de GalT2 o GalNac según corresponda. Una vez realizada esta máscara se procedió a superponerla sobre el canal de p75NTR-GFP o TR-GFP y se cuantificó la intensidad de GFP en el aparato de Golgi. Finalmente, para cuantificar la intensidad de fluorescencia de p75NTR-GFP o TR-GFP en los procesos se trazó una línea de 3 píxeles de ancho sobre los procesos neuronales, y se cuantificó la intensidad de GFP promedio en todo el trayecto. Además se utilizó la herramienta de FIJI plot profile que permite medir la intensidad de GFP en función de la distancia del soma o del aparato de Golgi (Figura 9C). Para los dos objetivos y a los tres tiempos estudiados (T0, T15 y T60) se realizó un análisis poblacional de todas las neuronas transfectadas que se encuentran en el vidrio para conocer la localización subcelular de p75NTR-GFP o TR-GFP según corresponda. Este estudio permite analizar si hay retrasos en el tráfico de estas proteínas inducido por los tratamientos (pBDNF Met, pBDNF Val, o α -sinucleína). Para este método se utilizó microscopia de Epi-fluorescencia (Nikon, Eclipse TE-2000E) y se cuantificó, con criterios arbitrarios pero mantenidos rigurosamente para todas las condiciones experimentales, las neuronas que tenían p75NTR-GFP o TR-GFP en los siguientes compartimientos intracelulares: RE, entre RE y aparato de Golgi, aparato de Golgi, entre aparato de Golgi y procesos neuronales, o solo en los procesos neuronales. Luego se realizó un gráfico de

barras apiladas con las proporciones de neuronas con proteína en cada compartimiento para cada uno de los tiempos y condiciones experimentales.

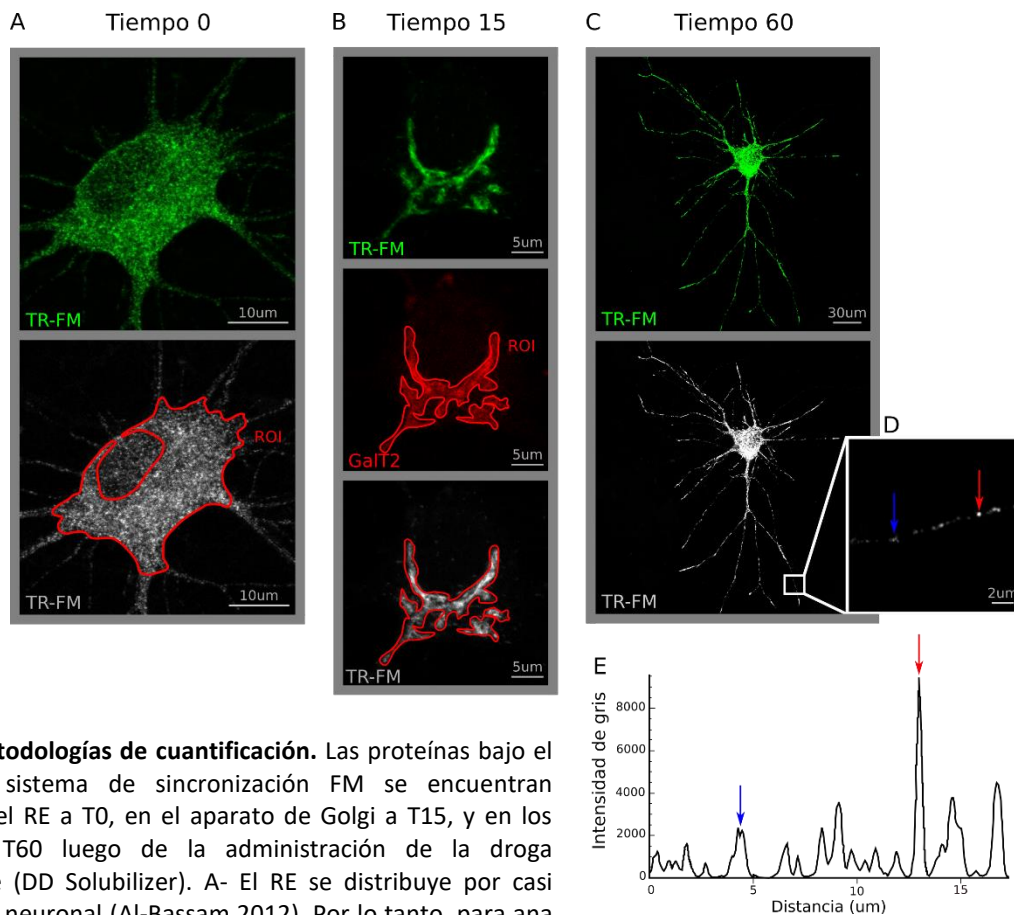


Figura 9. Metodologías de cuantificación. Las proteínas bajo el control del sistema de sincronización FM se encuentran ancladas en el RE a T0, en el aparato de Golgi a T15, y en los procesos a T60 luego de la administración de la droga desagregante (DD Solubilizer). A- El RE se distribuye por casi todo el soma neuronal (Al-Bassam 2012). Por lo tanto, para ana TR-GFP-FM o p75NTR-GFP-FM en este compartimiento, se realizó una selección (ROI, región of interest) del soma (excluyendo la zona del núcleo) y luego se cuantificó la intensidad promedio de GFP en toda la selección. B- Para analizar la intensidad de TR-GFP-FM o p75NTR-GFP-FM a T15, se realizó una máscara (ROI) en el canal de GalT2 o GalNac (ambas proteínas residentes del aparato de Golgi transfectadas). Esta selección se superpuso sobre el canal de TR-GFP-FM o p75NTR-GFP-FM para cuantificar la intensidad de GFP en esa región. Esta misma metodología se utilizó para cuantificar TR-GFP-FM o p75NTR-GFP-FM en el aparato de Golgi a T60. C- Para analizar la intensidad de TR-GFP-FM o p75NTR-GFP-FM a T60 en los procesos neuronales se trazó una línea de 3 pixeles de ancho sobre estos, y se cuantificó la intensidad de GFP utilizando la herramienta de FIJI Plot Profile que permite medir intensidad en función de la distancia. D- Magnificación un proceso neuronal a T60 en que se aprecian las vesículas con la proteína de interés (en este caso TR-GFP-FM). E- Grafico ejemplificando la medición de la intensidad de gris en el canal de GFP del panel D en función de la distancia utilizando Plot Profile de FIJI. Con una flecha azul y una flecha roja se pueden distinguir dos vesículas individuales en el panel D y su correspondiente cuantificación en el panel E. Se destacan dos picos de intensidad correspondientes a las vesículas marcadas con flechas.

-Análisis estadístico.

Se realizó mediante el software Infostat (Facultad de Agronomía, UNC). Se cuantificaron al menos tres experimentos independientes por cada objetivo. A su vez, de cada condición experimental (Objetivo 1: pBDNF Val, pBDNF Met y PBS; Objetivo 2: con o sin α -sinucleína) se analizaron entre 4 a 7 neuronas elegidas al azar en distintos lugares del cubreobjetos. Se analizaron los datos y los errores para determinar si se distribuían

ajustándose a una normal en cuyo caso se utilizó ANOVA. Alternativamente, se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis en las comparaciones de los tratamientos según correspondía. Las diferencias fueron consideradas significativas con $p < 0,05$.

Resultados

Utilización del sistema de sincronización de la vía exocítica del receptor de transferrina (TR) en neuronas hipocampales

El sistema de sincronización del tráfico de proteínas fue diseñado para estudiar la ruta biosintética en células epiteliales como las células MDCKs (Madin-Darby canine kidney cells) (Thuenauer 2014). Un sistema similar de sincronización también ha sido utilizado en neuronas (Al-Bassam 2012). El constructo TR-GFP-FM para sincronizar el tráfico de este receptor fue clonado y donado generosamente para este proyecto por el laboratorio del Dr. Cáceres (Instituto Ferreyra). Debido a que el funcionamiento de este constructo particular no se ha caracterizado exhaustivamente; se estudiaron los niveles basales de expresión de esta proteína de fusión previo a la administración del agente desagregante DD-Solubilizer (T0, Figura 10). Luego de 16 horas de expresión, la distribución de TR-GFP-FM es de difusa a punteada en el citoplasma, compatible con una marca de retículo endoplásmico (RE). Esta marca es intensa en el soma aunque también se extiende en los procesos neuronales siguiendo un patrón similar a la localización del RE (Figura 10A). La marca de TR-GFP-FM a este tiempo es variable en distintas neuronas de las mismas condiciones experimentales (datos no mostrados).

Los tratamientos con pBDNF Val (20ng/ml), pBDNF Met (20ng/ml), o vehículo (PBS) durante las 16 horas post-transfección, no afectaron significativamente los niveles de expresión basales de TR-GFP-FM (Figura 10A, B). Adicionalmente, se realizó un análisis poblacional (descrito en materiales y métodos) en el que se cuantificó la proporción de neuronas que presentan la proteína TR-GFP-FM anclada en el RE a T0. Como era de esperar, antes de la administración de la droga desagregante virtualmente todas las neuronas transfectadas tienen TR-GFP-FM retenido en el RE y la proteína no ha sido aún liberada a la ruta biosintética (Figura 10C). La administración de pBDNF Val o pBDNF Met no afectó esta proporción (Figura 10C).

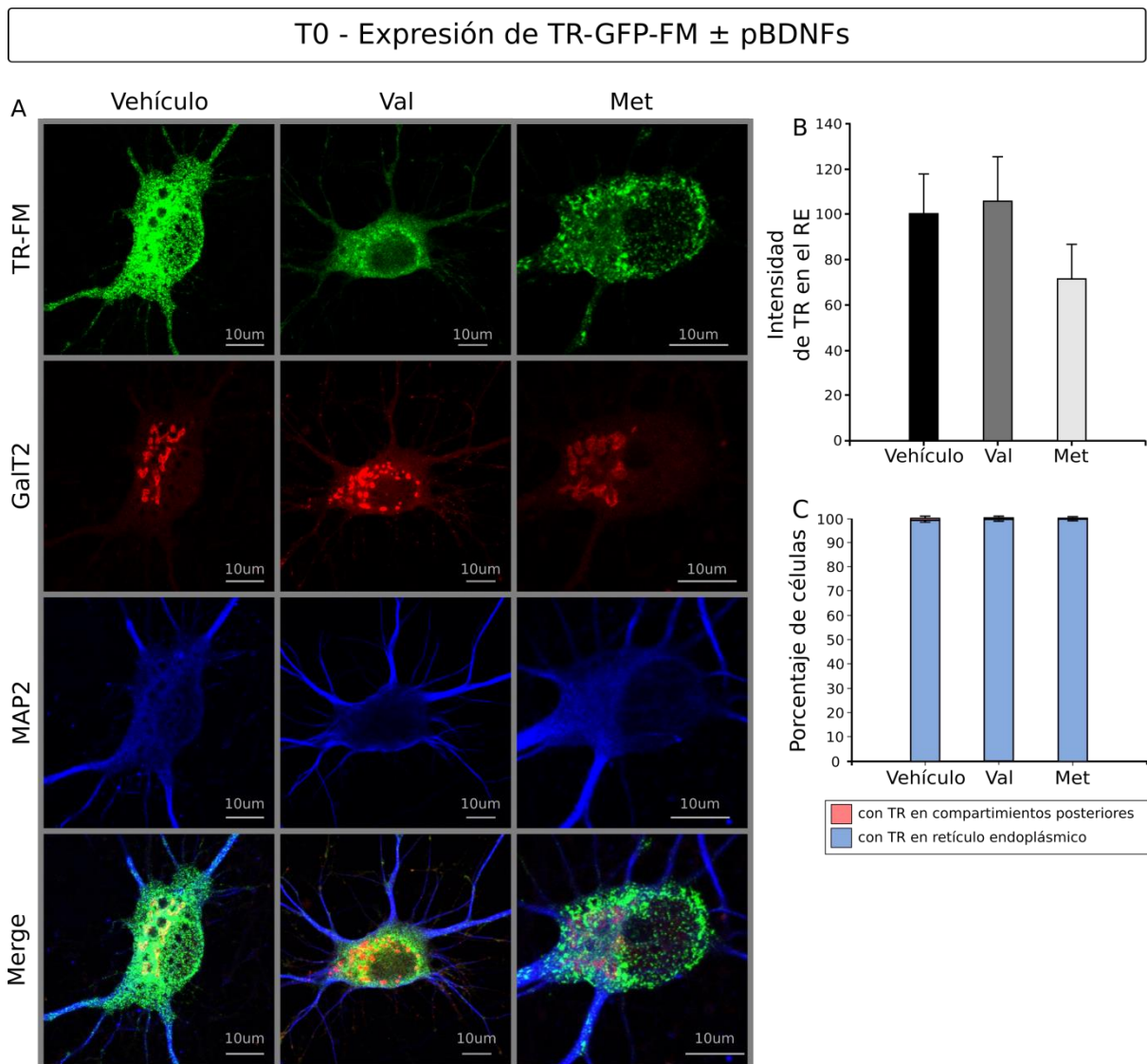


Figura 10. Utilización del sistema de sincronización de la vía exocítica del receptor de transferrina (TR) en neuronas hipocámpales. A- Imágenes representativas de microscopía confocal en las que se puede observar la marca para TR-GFP-FM, GalT2 (proteína residente del aparato de Golgi) y MAP2 (marcador de dendritas) en los distintos tratamientos (pBDNF Val, pBDNF Met y vehículo como control) antes de la administración de la droga desagregante DD Solubilizer (T0). B- Cuantificación de la intensidad de TR-GFP-FM en el retículo endoplásmico (RE) a T0. C- Análisis poblacional de la proporción de neuronas con TR-GFP-FM en el RE o en compartimientos posteriores a T0.

pBDNF Met no afecta el transporte del receptor de transferrina (TR) entre el retículo endoplásmico (RE) y el aparato de Golgi

Nuestro grupo ha reportado que la administración de pBDNF Met genera cambios estructurales en neuronas (Anastasia 2013; Giza 2018), sin embargo los mecanismos subyacentes son desconocidos. Alteraciones en el tráfico de proteínas pueden resultar en cambios de la citoarquitectura neuronal. Por lo tanto, como una primera aproximación, decidimos estudiar si pBDNF Met altera el tráfico de proteínas entre el RE y el aparato de Golgi. Neuronas hipocámpales de 8DIV fueron transfectadas con TR-GFP-FM, la proteína se expresó por 16hs, y durante todo ese periodo las células estuvieron en presencia de pBDNF

Val (20ng/ml), pBDNF Met (20ng/ml) o vehículo (PBS). La proteína GalT2-mCherry fue co-transfectada para marcar el aparato de Golgi. Las neuronas fueron fijadas 15 minutos luego de la administración del agente desagregante DD-Solubilizer. A este tiempo luego de la liberación de la ruta biosintética, TR-GFP colocaliza ampliamente con GalT2-mCherry demostrando que la proteína se encuentra en este compartimiento celular. La administración de pBDNF Val o pBDNF Met no afectó la intensidad de TR-GFP en el aparato de Golgi (Figura 11), ni la proporción de neuronas con TR-GFP en este compartimiento (Figura 11).

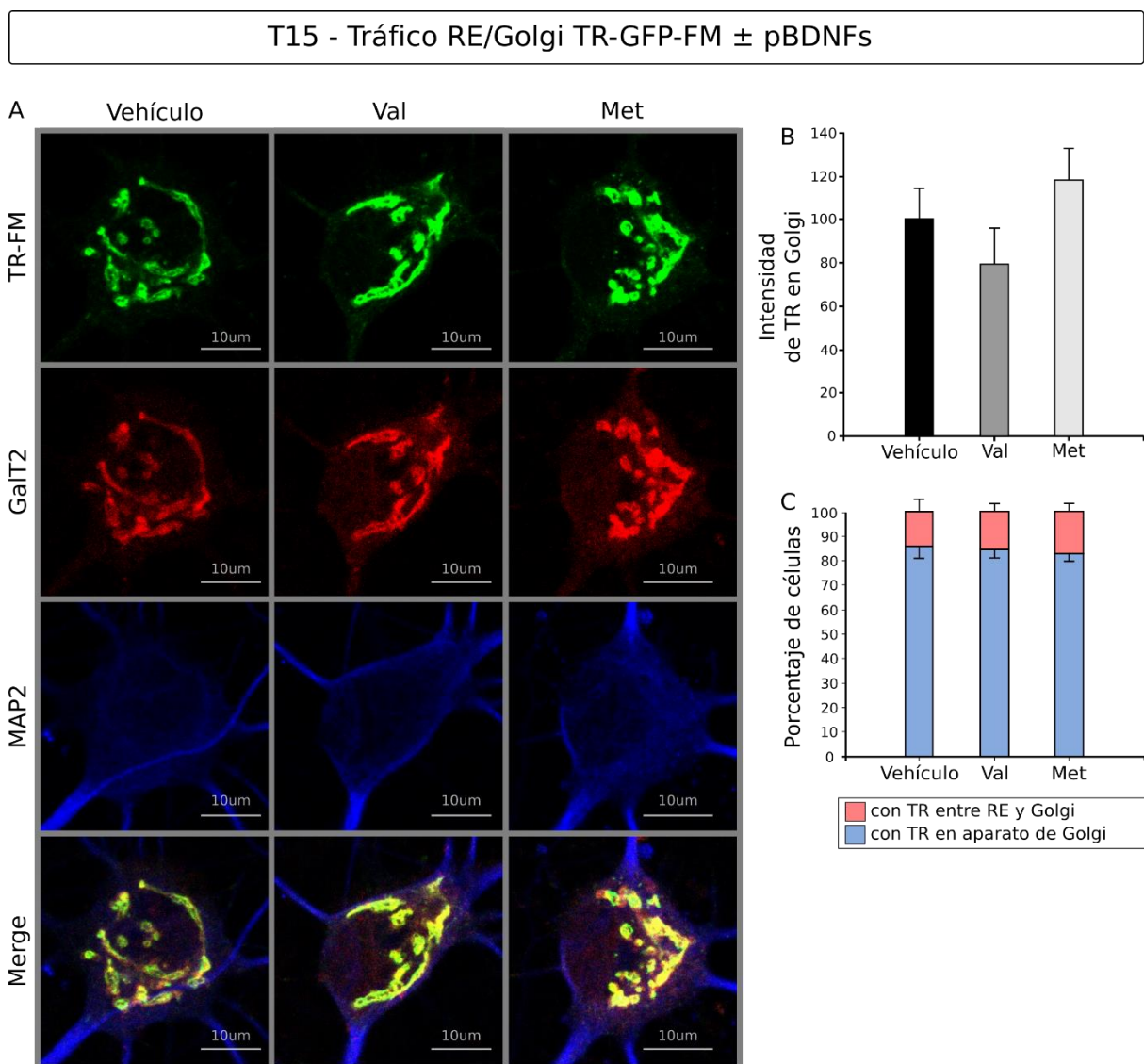


Figura 11. pBDNF Met no afectan el transporte del receptor de transferrina (TR) entre el retículo endoplásmico (RE) y el aparato de Golgi. A- Imágenes representativas de microscopía confocal en las que se puede observar la marca para TR-GFP-FM, GalT2 (proteína residente del aparato de Golgi) y MAP2 (marcador de dendritas) en los distintos tratamientos (pBDNF Val, pBDNF Met y vehículo como control) 15 minutos después de la administración de la droga desagregante DD Solubilizer (T15). B- Cuantificación de la intensidad de TR-GFP-FM en el aparato de Golgi a T15. C- Análisis poblacional de la proporción de neuronas con TR-GFP-FM entre el RE y aparato de Golgi (o en otras palabras, neuronas que todavía no han vaciado del todo su RE), o con toda la proteína en el Golgi.

pBDNF Met no afectan la salida del receptor de transferrina (TR) del aparato de Golgi

Como se mencionó previamente, se ha reportado que el polimorfismo Val66Met afecta el tráfico intracelular y la secreción regulada de mBDNF. Se ha propuesto que estos efectos se deben a una menor interacción de proBDNF Met con la chaperona sortilina (comparado con la variante Val) y que resultan en menor transporte de esta proteína desde el aparato de Golgi. Sin embargo, se desconoce si el pBDNF Met secretado por estas neuronas es un mecanismo adicional que puede estar afectando la ruta exocítica y la salida de proteínas del aparato de Golgi. Para poner a prueba esta hipótesis se estudió si pBDNF Met altera la salida de proteínas del aparato de Golgi a los procesos neuronales. Neuronas hipocampales de 8DIV fueron transfectadas con TR-GFP-FM, la proteína se expresó por 16hs, y durante todo ese tiempo estuvieron en presencia de pBDNF Val (20ng/ml), pBDNF Met (20ng/ml) o vehículo (PBS). La proteína GalT2-mCherry fue co-transfectada para marcar el aparato de Golgi y se inmunodetectó MAP2 para visualizar las dendritas. Las neuronas fueron fijadas 60 minutos luego de la administración del agente desagregante DD-Solubilizer. A este tiempo se pueden detectar vesículas conteniendo TR-GFP que se han desprendido del aparato de Golgi y que se distribuyen por todos los procesos. Cabe aclarar que en T60, el aparato de Golgi aún no se ha vaciado y muestra una cantidad significativa de proteína remanente. Se cuantificó la intensidad de TR-GFP en el aparato de Golgi (seleccionado con una máscara de GalT2-mCherry), y mediante el plugin Plot Profile de FIJI se cuantificó la intensidad de TR-GFP-FM promedio de las primeras 50 μm de diferentes dendritas seleccionadas al azar de cada neurona (Figura 12). Además, se realizó un análisis poblacional para estudiar la proporción de neuronas en las cuales TR-GFP fue retenido en el Golgi y las que tienen vesículas con la proteína de fusión en los procesos a T60. Contrario a lo esperado, pBDNF Met no afecta la intensidad de TR-GFP en el Golgi a este tiempo, y tampoco altera la salida de vesículas desde el aparato de Golgi a los procesos (Figura 12).

T60 - Tráfico Golgi/procesos TR-GFP-FM ± pBDNFs

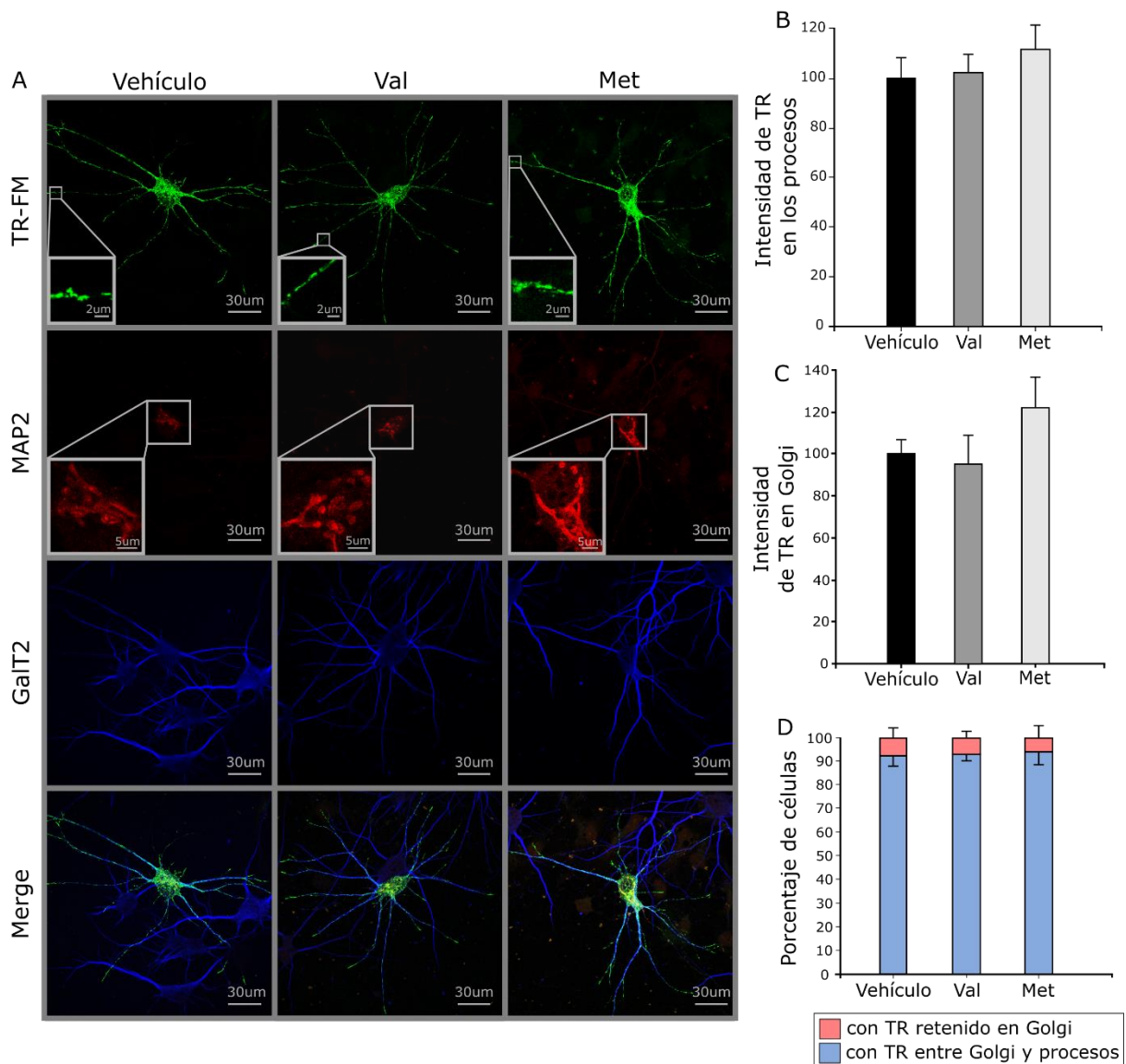


Figura 12. pBDNF Met no afectan la salida del receptor de transferrina (TR) del aparato de Golgi. A- Imágenes representativas de microscopía confocal en las que se puede observar la marca para TR-GFP-FM, GalT2 (proteína residente del aparato de Golgi) y MAP2 (marcador de dendritas) en los distintos tratamientos (pBDNF Val, pBDNF Met y vehículo como control) 60 minutos después de la administración de la droga desagregante DD-Solubilizer (T60). B- Cuantificación de la intensidad de TR-GFP-FM en los procesos neuronales utilizando el plug in Plot Profile (FIJI) a T60. Se cuantificó la intensidad de GFP en las primeras 50µm de los procesos comenzando desde el soma. C- Cuantificación de la intensidad de TR-GFP-FM en el aparato de Golgi a T60. D- Análisis poblacional de la proporción de neuronas con TR-GFP-FM retenido o demorado en el aparato de Golgi (o en otras palabras, neuronas en las que la proteína aún no ha comenzado a salir del Golgi), o con la proteína en vesículas emergiendo del aparato de Golgi y cubriendo los procesos.

Utilización del sistema de sincronización de la vía exocítica del receptor p75NTR en neuronas hipocampales

Para estudiar el posible impacto de α -sinucleína en el tráfico intracelular, se estudió como proteína modelo en el presente trabajo a al receptor p75NTR. El constructo p75NTR-GFP-FM fue clonado y donado generosamente para este proyecto por el laboratorio del Dr. Cáceres (Instituto Ferreyra). Al igual que el constructo TR-GFP-FM, la expresión del vector p75NTR-GFP-FM aún no ha sido caracterizada exhaustivamente en neuronas. Como primer análisis, se estudiaron los niveles basales de expresión de esta proteína de fusión previo a la administración del agente desagregante DD-Solubilizer (T0, Figura 13). Luego de 8 horas de expresión en neuronas hipocampales de 8DIV, la distribución de p75NTR-GFP-FM se observa punteada en el citoplasma, compatible con una marca de retículo endoplásmico (RE). Esta marca es intensa en el soma aunque también se extiende en los procesos neuronales siguiendo un patrón similar a la localización del RE (Figura 13). Se eligió este tiempo de expresión debido a que tiempos más largos (16 horas) resultan en unos pocos agregados extremadamente intensos en el citoplasma que no se corresponden con una marca de RE (datos no mostrados). Como se puede apreciar en las micrografías (Figura 13) la marca de p75NTR-GFP-FM a este tiempo es variable en distintas neuronas.

Para determinar si α -sinucleína afecta la expresión basal de p75NTR-GFP-FM en neuronas, se co-expresó el vector de sincronización junto a un vector que codifica para esta proteína (o un plásmido vacío como control, tiempo de expresión 8 horas). La expresión de α -sinucleína, que fue significativa a las 8hs post-transfección (Figura 7), no modifica los niveles de expresión basales de p75NTR-GFP-FM (Figura 13A, B). Adicionalmente se realizó un análisis poblacional (descrito en materiales y métodos) en el que se cuantificó la proporción de neuronas que presentan la proteína p75NTR-GFP-FM anclada en el RE a T0. Como era de esperar, antes de la administración de la droga desagregante virtualmente todas las neuronas transfectadas tienen p75NTR-GFP-FM retenido en el RE y la proteína no ha sido liberado a la ruta biosintética (Figura 13C). La expresión de α -sinucleína no afecta los resultados de este análisis poblacional (Figura 13C).

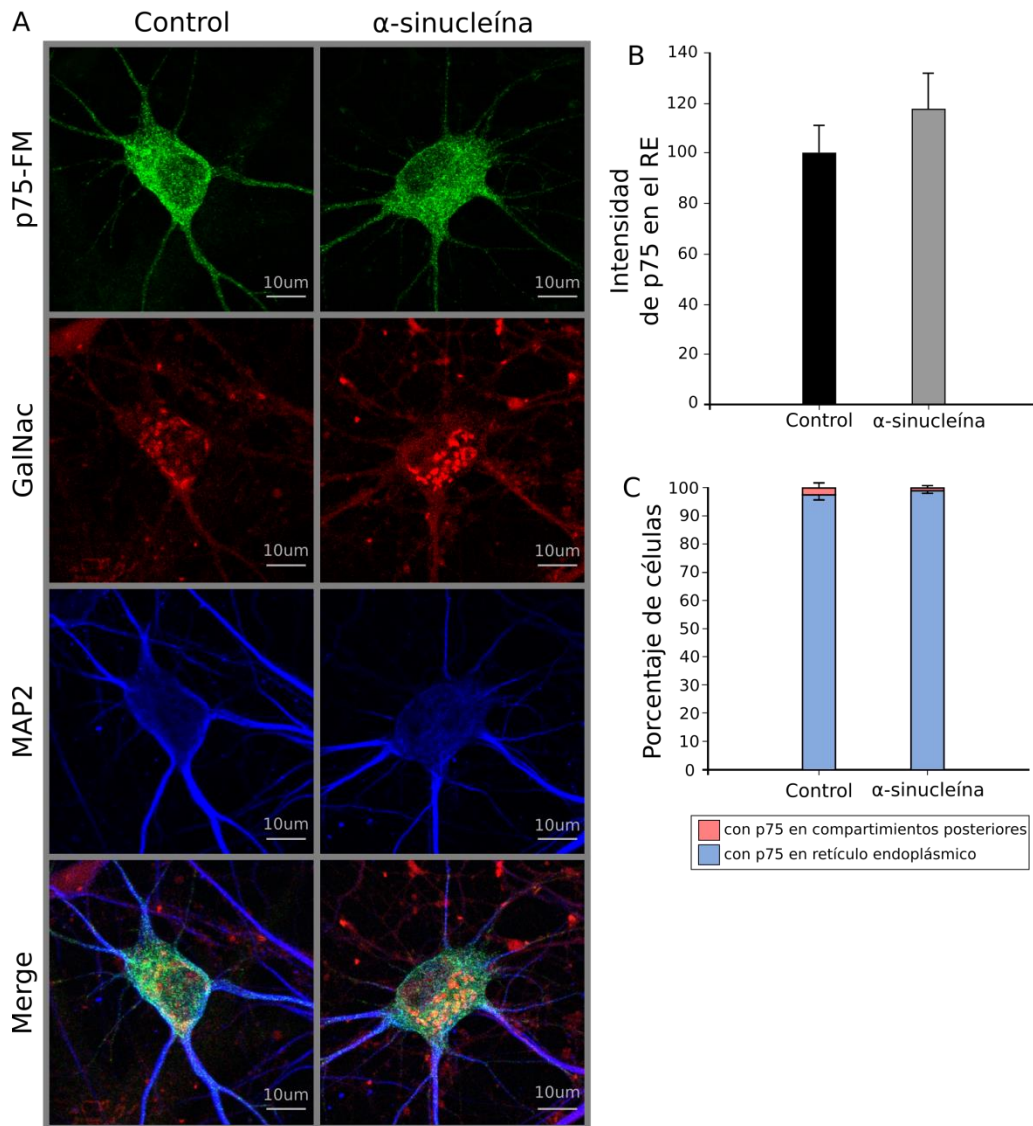


Figura 13. Utilización del sistema de sincronización de la vía exocítica del receptor p75NTR en neuronas hipocampales. A- Imágenes representativas de microscopía confocal en las que se puede observar la marca para p75NTR-GFP-FM, GalNac (proteína residente del aparato de Golgi) y MAP2 (marcador de dendritas) en los distintos tratamientos (expresión de α -sinucleína o el vector vacío como control) antes de la administración de la droga desagregante DD-Solubilizer (T0). B- Cuantificación de la intensidad de p75NTR-GFP-FM en el retículo endoplásmico (RE) a T0. C- Análisis poblacional de la proporción de neuronas con p75NTR-GFP-FM en el RE o en compartimientos posteriores a T0.

α -sinucleína induce un retraso en el transporte de p75NTR entre retículo endoplásmico (RE) y el aparato de Golgi

Una de las hipótesis de la patogénesis de la enfermedad de Parkinson postula que defectos en el transporte intracelular conllevan a la muerte de neuronas dopaminérgicas. De acuerdo con esta hipótesis, se ha reportado que α sinucleína bloquea el tráfico vesicular entre ER y el aparato de Golgi en levaduras (Cooper 2006). Sin embargo, estos resultados no han sido replicados en neuronas. Por lo tanto, estudiamos utilizando el sistema de

sincronización y la proteína p75NTR como modelo, si la expresión de α -sinucleína afecta el tráfico entre estas dos organelas en neuronas hipocampales. Para este objetivo se transfectaron neuronas hipocampales de 8DIV con el constructo p75NTR-GFP-FM, un vector que expresa la proteína residente del Golgi GalNac (unida al fluoróforo CFP), y α -sinucleína (o el vector vacío como control). Como se determinó para TR-GFP-FM, a los 15 minutos luego de la adición de la droga desagregante, p75NTR-GFP-FM se encuentra ampliamente colocalizado con GalNac demostrando que fue transportado a este compartimiento. La expresión de α -sinucleína no afectó la intensidad de p75NTR-GFP en el aparato de Golgi (Figura 14A, B). Posteriormente se realizó un análisis poblacional de la proporción de neuronas con p75NTR-GFP en el aparato de Golgi, e interesantemente se encontró que en los cultivos que expresan α -sinucleína hay una mayor proporción de neuronas con p75NTR-GFP aun en retículo endoplásmico comparadas con el control, sugiriendo que en estas células hay un retraso en el transporte vesicular al aparato de Golgi.

T15 - Tráfico RE/Golgi p75NTR-GFP-FM \pm α -sinucleína

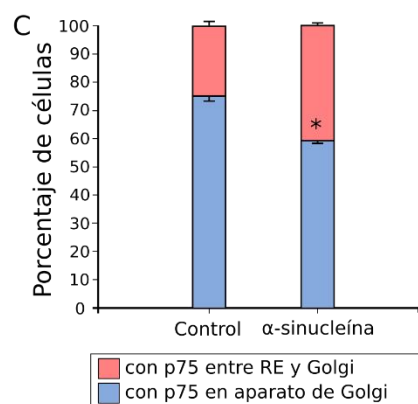
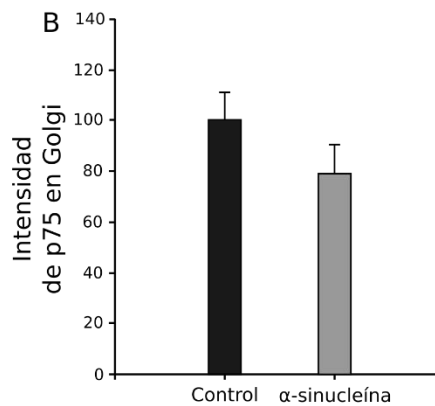
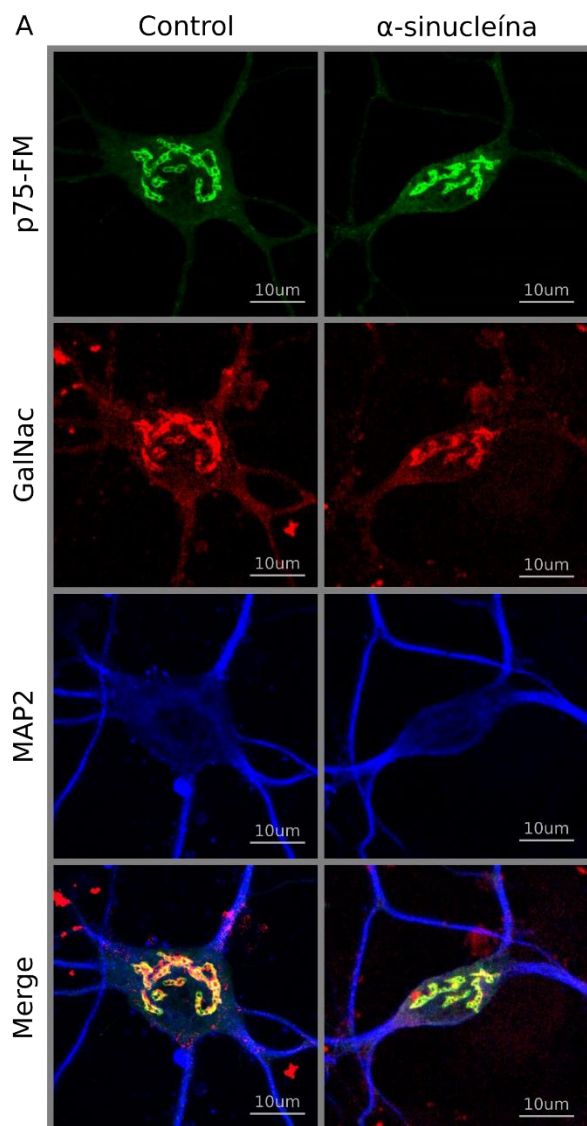


Figura 14. α -sinucleína induce un retraso en el transporte de p75NTR entre retículo endoplásmico (RE) y el aparato de Golgi. A- Imágenes representativas de microscopía confocal en las que se puede observar la marca para p75NTR-GFP-FM, GalNac (proteína residente del aparato de Golgi) y MAP2 (marcador de dendritas) en los distintos tratamientos (expresión de α -sinucleína o el vector vacío como control) 15 minutos después de la administración de la droga desagregante DD Solubilizer (T15). B- Cuantificación de la intensidad de p75NTR-GFP-FM en el aparato de Golgi a T15. C- Análisis poblacional de la proporción de neuronas con p75NTR-GFP-FM entre el RE y aparato de Golgi (o en otras palabras, neuronas que todavía no han vaciado del todo su RE), o con toda la proteína en el Golgi. Se observa una diferencia significativa (*p=0,0006)

α -sinucleína induce un retraso en salida de vesículas del aparato de Golgi a los procesos neuronales

Para estudiar si la sobreexpresión de α -sinucleína altera la salida de vesículas desde el aparato de Golgi a los procesos neuronales, se transfectaron neuronas de 8DIV con p75NTR-GFP-FM, la proteína GalNac-CFP para marcar el aparato de Golgi, y posteriormente se inmunodetectó MAP2 para visualizar las dendritas. Luego de 8 horas de expresión y de 60 minutos de liberada la ruta secretoria mediante la adición de la droga desagregante DD-Solubilizer, se distinguen vesículas un tanto tubulares que emergen del aparato de Golgi y cubren una gran parte de los procesos neuronales. Cabe aclarar que en T60, el aparato de Golgi aún no se ha vaciado y muestra una cantidad significativa de proteína. Se cuantificó la intensidad de p75NTR-GFP en el aparato de Golgi (seleccionado con una máscara de GalNac-CFP), y mediante el plugin Plot Profile de FIJI se cuantificó la intensidad de p75NTR-GFP promedio de las primeras 50 μm de diferentes dendritas seleccionadas al azar de cada neurona (Figura 15). Interesantemente, la expresión de α -sinucleína indujo una marcada disminución en la intensidad de p75NTR-GFP en los procesos (Figura 15A, B). Este resultado se puede interpretar como una disminución o retraso en la salida de vesículas del aparato de Golgi. También se observó en este tiempo (T60) que hay una disminución significativa de la intensidad de p75NTR-GFP en el aparato de Golgi (Figura 15A, C) que puede deberse al retraso o bloqueo parcial que hubo en el transporte entre el RE y el aparato de Golgi (Figura 14C).

Además, se realizó un análisis poblacional para estudiar la proporción de neuronas en las cuales p75NTR-GFP fue retenido en el aparato de Golgi en T60, y la proporción de neuronas que tienen vesículas con la proteína de fusión en los procesos a este tiempo luego de la liberación de la vía exocítica. No se observaron cambios significativos inducidos por α -sinucleína en estas proporciones (Figura 15D).

T60 - Tráfico Golgi/procesos p75NTR-GFP-FM ± α -sinucleína

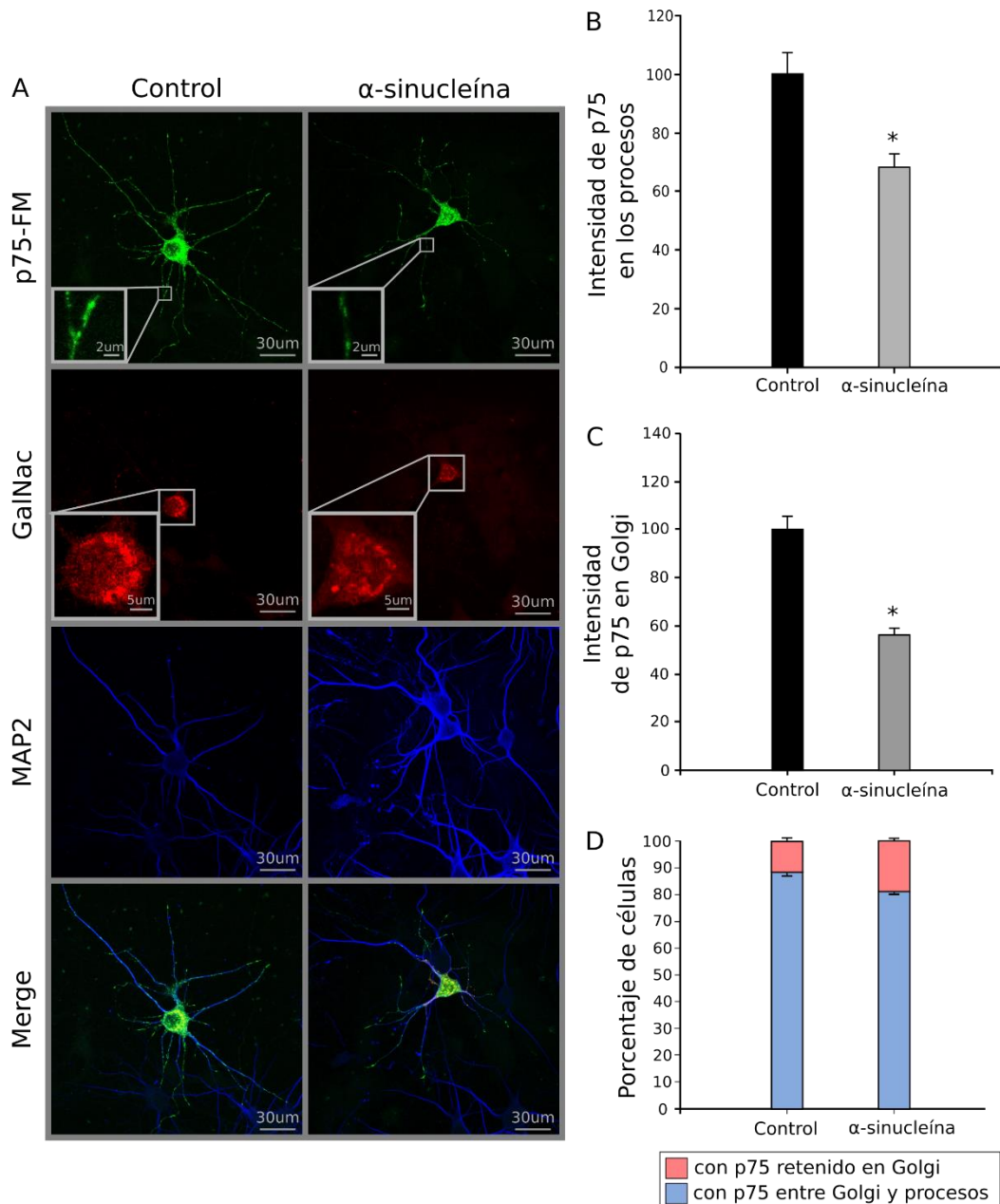


Figura 15. α -sinucleína induce un retraso en salida de vesículas del aparato de Golgi a los procesos neuronales. A- Imágenes representativas de microscopía confocal en las que se puede observar la marca para p75NTR-GFP-FM, GalNac (proteína residente del aparato de Golgi) y MAP2 (marcador de dendritas) en los distintos tratamientos (expresión de α -sinucleína o el vector vacío como control) 60 minutos después de la administración de la droga desagregante DD-Solubilizer (T60). B- Cuantificación de la intensidad de p75NTR-GFP-FM en los procesos neuronales utilizando el plug in Plot Profile (FIJI) a T60 donde se observa una diferencia significativa (* $p= 0,0005$). Se cuantificó la intensidad de GFP en las primeras 50 μ m de los procesos comenzando desde el soma. C- Cuantificación de la intensidad de p75NTR-GFP-FM en el aparato de Golgi a T60 donde también se observa una diferencia significativa (* $p<0,0001$). D- Análisis poblacional de la proporción de neuronas con p75NTR-GFP-FM retenido o demorado en el aparato de Golgi (o en otras palabras, neuronas en las que la proteína aún no ha comenzado a salir del Golgi), o con la proteína en vesículas emergiendo del aparato de Golgi y cubriendo los procesos. No se detectaron diferencias significativas.

Discusión

Una de las hipótesis sobre las causas de la enfermedad de Parkinson (EP) postula que defectos en el transporte intracelular debidos a causas genéticas y/o ambientales podrían ser eventos iniciales en la degeneración de las neuronas dopaminérgicas del sistema nigroestriatal. En este trabajo estudiamos si dos proteínas que se encuentran en mayor o menor medida asociadas a la EP, pBDNF Met y α -sinucleína, afectan el tráfico de proteínas en la ruta biosintética y de esta manera participan en la patogénesis de esta enfermedad. Para ello, hemos utilizado un sistema de última generación de sincronización de vesículas de transporte en neuronas en cultivo. Utilizando esta tecnología, no se detectó evidencia de que el pBDNF Met suministrado al medio de cultivo como un ligando, genere alteraciones en el transporte intracelular. Sin embargo, encontramos que la expresión de α -sinucleína altera la dinámica de la ruta secretoria retrasando el transporte de proteínas entre el retículo endoplásmico (RE) y el aparato de Golgi, y entre éste último y los procesos neuronales.

A pesar de que la EP ocurre por degeneración de neuronas dopaminérgicas, en este trabajo utilizamos como una primera aproximación cultivos primarios de neuronas hipocampales por su facilidad de cultivo y porque los constructos transfectados para sincronizar la ruta biosintética han sido validados en este tipo neuronal (resultados no publicados del Dr. Bisbal (Instituto Ferreyra), y de nuestro laboratorio). Esta aproximación presenta obvias limitaciones ya que, como se mencionó con anterioridad, dentro de las neuronas dopaminérgicas se llevan a cabo vías metabólicas únicas que no se encuentran en otros tipos neuronales como las hipocampales. Por ejemplo, el metabolismo de la dopamina genera especies tóxicas que podrían susceptibilizar a estas neuronas que, interactuando con los efectos de α -sinucleína y/o pBDNF Met, pueden exacerbar los defectos en el transporte de vesículas y la toxicidad. Por estas razones, experimentos futuros que exceden el presente trabajo, serán realizados en neuronas dopaminérgicas provenientes de cultivos mesencefálicos que son más relevantes para la EP; sin embargo, estos presentan ciertas desventajas como la dificultad de cultivo, que son heterogéneos con solo un 4-6% de neuronas dopaminérgicas, y que el tráfico intracelular no ha sido caracterizado en detalle en este tipo neuronal. Para poder expresar α -sinucleína, pBDNF Met, y los constructos de sincronización de proteínas en esta subpoblación de neuronas dopaminérgicas en dicho cultivo primario, estamos clonando estas proteínas en vectores lentivirales para poder

infectar la mayoría de las neuronas del cultivo de mesencéfalo ventral y así alcanzar a la subpoblación dopaminérgica. De esta manera, lograremos repetir nuestros experimentos en un modelo con mucha mayor relevancia para la enfermedad de Parkinson.

Se conoce que el polimorfismo Val66Met en el gen de BDNF afecta la liberación regulada por actividad de mBDNF (Chen 2005; Chen 2006). Se ha publicado que esta disminución en la secreción de este factor trófico se debe a que proBDNF Met (variante polimórfica de la proteína precursora de mBDNF y pBDNF) muestra una interacción diferencial con la chaperona sortilina que participa de su tráfico intracelular (Chen 2005; Chen 2006). Por lo tanto, se ha sugerido que al menos parte del mecanismo molecular por el cual los pacientes portadores del polimorfismo tienen mayor incidencia de enfermedades psiquiátricas y neurodegenerativas, pueden deberse a una menor secreción de mBDNF. Esto podría resultar en una menor activación del receptor TrkB, y de esta manera afectaría la supervivencia y plasticidad neuronal. Además de este mecanismo patogénico propuesto de pérdida de función de mBDNF-TrkB, desde el descubrimiento de pBDNF en el cerebro como un ligando independiente (Anastasia 2013), se ha planteado a esta molécula de señalización como un mecanismo adicional que altera la plasticidad neuronal. Sin embargo, en nuestros experimentos no pudimos detectar alteraciones en el tráfico intracelular inducidos por la administración de pBDNF Met en dosis fisiológicas al medio de cultivo.

Recientemente hemos encontrado que pBDNF Met multimeriza en presencia de zinc formando agregados que son de mayores dimensiones y más estables que los de pBDNF Val (manuscrito en preparación de nuestro laboratorio). Este ion está presente en distintas cantidades en distintos compartimientos de la ruta secretoria. Por lo tanto, una posibilidad es que el polimorfismo Val66Met esté afectando la ruta biosintética mediante un incremento de la agregación de la variante Met con zinc y de esta manera esté impidiendo la salida normal de vesículas del aparato de Golgi. Además, estos agregados podrían estar secuestrando otras proteínas y consecuentemente afectando la homeostasis neuronal. Por estas razones, estamos interesados en estudiar los efectos del polimorfismo Val66Met en el tráfico intracelular de proteínas cuando el mismo pBDNF Met se encuentra presente en los compartimientos de la vía exocítica (ya sea endógeno o sobreexpresado), y no sólo como un ligando suministrado al medio de cultivo como hemos experimentado en el presente trabajo. Para estos estudios, tenemos en el bioterio del Instituto Ferreyra (INIMEC-CONICET-UNC) ratones knock-in que expresan la variante Met o Val de pBDNF bajo el control de los

promotores endógenos de BDNF (donados generosamente por el Dr. Francis S. Lee, Cornell University, Nueva York, USA), a partir de los cuales vamos a realizar cultivos primarios de neuronas hipocampales y dopaminérgicas y transfectar con los constructos de sincronización de la ruta biosintética. En estas neuronas estudiaremos la dinámica del tráfico intracelular. Además, actualmente estamos realizando el clonado de los vectores necesarios para poder sobreexpresar (mediante infección y transfección) pBDNF Val y Met, y también estudiar la dinámica de transporte de vesículas en cultivos neuronales.

La acumulación de α -sinucleína y/o su mal plegamiento están altamente asociadas al desarrollo de la EP. Se han propuesto varios mecanismos patogénicos para α -sinucleína, sin embargo, no se ha estudiado en detalle cómo el incremento de niveles de esta proteína puede afectar la ruta biosintética en neuronas. En este trabajo hemos detectado que α -sinucleína induce un retraso significativo en el transporte del receptor p75NTR entre el RE y el aparato de Golgi, y entre este último compartimiento y los procesos neuronales. Por ahora, solo hemos estudiado los efectos de α -sinucleína en el transporte de este receptor como proteína modelo, pero actualmente estamos realizando experimentos para estudiar los efectos de α -sinucleína en el tráfico del receptor de transferrina para corroborar si es un efecto generalizado en el transporte de vesículas o dependiente del receptor.

Entre las posibles explicaciones a este retraso en el tráfico intracelular mediado por α -sinucleína se puede mencionar: (1) una disminución en la salida de vesículas del RE, (2) menor fusión de vesículas provenientes del RE al aparato de Golgi, (3) una menor salida de vesículas del aparato de Golgi, (4) que α -sinucleína interactúe con membranas lipídicas y afecte su fisiología, y (5) que α -sinucleína promueva estrés de RE. A continuación se discutirán estas posibilidades junto con evidencia reportada por otros grupos de investigación.

Lindquist y colaboradores encontraron en levaduras que α -sinucleína induce un retraso en el tráfico de proteínas entre el RE y el aparato de Golgi (Cooper 2006). Estos investigadores propusieron que esta demora es producto de que la expresión de α -sinucleína induce una reducción de la fusión entre las vesículas que salen del RE con la membrana del aparato de Golgi. Además, encontraron, de nuevo en levaduras, que este efecto puede ser revertido por ciertas proteínas de tráfico de membrana que actúan en este paso de la ruta exocítica como Rab1, que coordina el anclaje de las vesículas entre el RE y el aparato de Golgi, y Ykt6p, una proteína SNARE que media la fusión de vesículas también

entre estos dos compartimientos (Cooper 2006). Simultáneamente, observaron que Rab1 y Ykt6p disminuyen la toxicidad de α -sinucleína sugiriendo que los defectos en el transporte de vesículas entre el RE y el aparato de Golgi están involucrados en los mecanismos neurodegenerativos inducidos por esta proteína. Nuestros resultados confirman, por primera vez en neuronas, que α -sinucleína afecta el transporte RE-Golgi (Figura 14). Interesantemente, en los estudios poblacionales que se realizaron a los 15 minutos luego de liberada la ruta biosintética y luego de la expresión de α -sinucleína (T15, Figura 14), se observó una menor proporción de neuronas con p75-GFP-FM en el aparato de Golgi. Este resultado sugiere que los cultivos primarios de neuronas hipocampales pueden tener subpoblaciones que se vean más afectadas por α -sinucleína que otras. Se desconoce el origen de esta variabilidad.

También encontramos que α -sinucleína induce un retraso en la salida de vesículas desde el aparato de Golgi hacia los procesos neuronales (a T60 luego de la desagregación, Figura 15). Esta demora podría estar relacionada al retraso en el paso previo de la vía (RE-Golgi), o deberse a algún mecanismo adicional de bloqueo o demora de la salida de vesículas del aparato de Golgi a los procesos. Publicaciones recientes aportan a este interrogante: la toxicidad inducida por la expresión de α -sinucleína puede ser prevenida por proteínas cuyas funciones están en pasos posteriores al transporte entre el RE y el aparato de Golgi. Entre estas se puede mencionar a Rab8 y Rab3A, GTPasas involucradas en la salida de vesículas del Golgi a los procesos, y Rab11, GTPasa que participa en el reciclado de endosomas (Gitler 2008; Yin 2014; Breda 2015). Por lo tanto, una posibilidad es que α -sinucleína afecte el tráfico de vesículas entre el RE-Golgi y desde el Golgi a los procesos neuronales por distintos mecanismos. Adicionalmente, se ha reportado que α -sinucleína podría interferir con la ruta de transporte de proteínas modificando la curvatura de las membranas (Westphal 2013). Esta regulación en la curvatura de membranas resulta de la inserción asimétrica de su hélice anfipática del extremo amino terminal en la bicapa lipídica. De este modo, incrementos y/o mutaciones en α -sinucleína podrían resultar tóxicos afectando todos los eventos del tráfico vesicular.

Curiosamente a los 60 minutos luego de la desagregación de las proteínas del RE, no se detectaron diferencias significativas en el número de neuronas con p75NTR-GFP-FM retenido en el aparato de Golgi y la cantidad de neuronas que tienen vesículas navegando por sus procesos (Figura 15D). Una posible explicación para esta observación es que en este último grupo (neuronas con vesículas en los procesos) se incluyeron en la cuantificación a

células que tienen pocas vesículas recién saliendo del aparato de Golgi y células en las cuales las vesículas ya llegaron a los extremos de los procesos y cubren casi toda la superficie de los mismos.

Otra posible causa de los efectos de α -sinucleína sobre la ruta biosintética, es que esta proteína este provocando estrés de RE. El estrés de retículo puede inducir un proceso denominado ERAD (degradación asociada al retículo endoplásmico, McCracken & Brodsky 2003). El ERAD resulta en el transporte de proteínas del RE al citoplasma para su eliminación por el sistema de ubiquitinación y posteriormente por proteólisis en el proteosoma. Los efectos que se observan en este trabajo sobre el impacto de α -sinucleína sobre el transporte de vesículas, podría deberse a que las proteínas sean eliminadas antes de continuar su ruta en la vía exocítica y alcanzar el aparato de Golgi o los procesos neuronales.

Una consecuencia de los defectos en el tráfico intracelular generados por la expresión de α -sinucleína podría ser que no se transporten correctamente ciertas enzimas a los lisosomas. Recientemente, Mazzulli y colaboradores (2016) encontraron que α -sinucleína afecta el tráfico de hidrolasas lisosomales. De esta manera, podría ocurrir una retroalimentación positiva entre el incremento de α -sinucleína y la imposibilidad de que el lisosoma pueda eliminarla correctamente. Esta retroalimentación podría facilitar la multimerización y la toxicidad de esta proteína.

En el presente trabajo se estudiaron los efectos de α -sinucleína silvestre (wild type) en el tráfico intracelular. Sin embargo, existen mutaciones en α -sinucleína asociadas a la EP como la Ala53Thr. En la publicación de Lindquist y colaboradores (Cooper 2006) los autores encontraron que la expresión de α -sinucleína silvestre y la mutante Ala53Thr afectan de manera similar la ruta biosintética en levaduras, sin embargo se desconoce si ambas variantes tienen el mismo efecto en neuronas. Realizaremos experimentos para comparar el impacto de estas dos versiones de α -sinucleína en el tráfico intracelular en neuronas.

Los experimentos presentados en este trabajo y los propuestos para estudios futuros permitirán proponer un mecanismo celular que podría contribuir al desarrollo de la enfermedad de Parkinson que afecta a un porcentaje significativo de la población mundial.

Bibliografía

- Abeliovich, A., & Gitler, A. D. (2016). Defects in trafficking bridge Parkinson's disease pathology and genetics. *Nature*, 539(7628), 207.
- Al-Bassam, S., Xu, M., Wandless, T. J., & Arnold, D. B. (2012). Differential trafficking of transport vesicles contributes to the localization of dendritic proteins. *Cell reports*, 2(1), 89-100.
- Altmann, V., Schumacher-Schuh, A. F., Rieck, M., Callegari-Jacques, S. M., Rieder, C. R., & Hutz, M. H. (2016). Val66Met BDNF polymorphism is associated with Parkinson's disease cognitive impairment. *Neuroscience letters*, 615, 88-91.
- Anastasia, A., Deinhardt, K., Chao, M. V., Will, N. E., Irmady, K., Lee, F. S., ... & Bracken, C. (2013). Val66Met polymorphism of BDNF alters prodomain structure to induce neuronal growth cone retraction. *Nature communications*, 4, 2490.
- Barbacid, M. (1994). The Trk family of neurotrophin receptors. *Developmental Neurobiology*, 25(11), 1386-1403.
- Breda, C., Nugent, M. L., Estranero, J. G., Kyriacou, C. P., Outeiro, T. F., Steinert, J. R., & Giorgini, F. (2014). Rab11 modulates α -synuclein-mediated defects in synaptic transmission and behaviour. *Human molecular genetics*, 24(4), 1077-1091.
- Chen, Z. Y., Patel, P. D., Sant, G., Meng, C. X., Teng, K. K., Hempstead, B. L., & Lee, F. S. (2004). Variant brain-derived neurotrophic factor (BDNF)(Met66) alters the intracellular trafficking and activity-dependent secretion of wild-type BDNF in neurosecretory cells and cortical neurons. *Journal of Neuroscience*, 24(18), 4401-4411.
- Chen, Z. Y., Ieraci, A., Teng, H., Dall, H., Meng, C. X., Herrera, D. G., ... & Lee, F. S. (2005). Sortilin controls intracellular sorting of brain-derived neurotrophic factor to the regulated secretory pathway. *Journal of Neuroscience*, 25(26), 6156-6166.
- Cohen, G. (1984). Oxy-radical toxicity in catecholamine neurons. *Neurotoxicology*, 5(1), 77-82.
- Cooper, A. A., Gitler, A. D., Cashikar, A., Haynes, C. M., Hill, K. J., Bhullar, B., ... & Cao, S. (2006). α -Synuclein blocks ER-Golgi traffic and Rab1 rescues neuron loss in Parkinson's models. *Science*, 313(5785), 324-328.
- Dauer, W., & Przedborski, S. (2003). Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron*, 39(6), 889-909.
- Eliezer, D., Kutluay, E., Bussell Jr, R., & Browne, G. (2001). Conformational properties of α -synuclein in its free and lipid-associated states1. *Journal of molecular biology*, 307(4), 1061-1073.
- Fang, F., Yang, W., Florio, J. B., Rockenstein, E., Spencer, B., Orain, X. M., ... & Rissman, R. A. (2017). Synuclein impairs trafficking and signaling of BDNF in a mouse model of Parkinson's disease. *Scientific reports*, 7(1), 3868.
- Feany, M. B. (2004). New genetic insights into Parkinson's disease. *New England Journal of Medicine*, 351(19), 1937-1940.
- Friedman, W. J. (2010). Proneurotrophins, seizures, and neuronal apoptosis. *The Neuroscientist*, 16(3), 244-252.
- Giasson, B. I., Duda, J. E., Murray, I. V., Chen, Q., Souza, J. M., Hurtig, H. I., ... & Lee, V. M. Y. (2000). Oxidative damage linked to neurodegeneration by selective α -synuclein nitration in synucleinopathy lesions. *Science*, 290(5493), 985-989.
- Gitler, A. D., Bevis, B. J., Shorter, J., Strathearn, K. E., Hamamichi, S., Su, L. J., ... & Barlowe, C. (2008). The Parkinson's disease protein α -synuclein disrupts cellular Rab homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(1), 145-150.
- Joanna I. Giza, Jihye Kim, Heidi C. Meyer, Agustin Anastasia, Iva Dincheva, Crystal I. Zheng, Katherine Lopez, Henrietta Bains, Jianmin Yang, Clay Bracken, Conor Liston, Deqiang Jing, Barbara L. Hempstead, and Francis S. Lee. The BDNF Val66Met prodomain disassembles dendritic spines altering fear extinction circuitry and behavior. (2018). Paper aceptado en *Neuron*. En prensa.
- Gonçalves, S. A., & Outeiro, T. F. (2017). Traffic jams and the complex role of α -Synuclein aggregation in Parkinson disease. *Small GTPases*, 8(2), 78-84.

- Guerini, F. R., Beghi, E., Riboldazzi, G., Zangaglia, R., Pianezzola, C., Bono, G., ... & Clerici, M. (2009). BDNF Val66Met polymorphism is associated with cognitive impairment in Italian patients with Parkinson's disease. *European journal of neurology*, 16(11), 1240-1245.
- Guo, J., Ji, Y., Ding, Y., Jiang, W., Sun, Y., Lu, B., & Nagappan, G. (2016). BDNF pro-peptide regulates dendritic spines via caspase-3. *Cell death & disease*, 7(6), e2264.
- Håkansson, A., Melke, J., Westberg, L., Shahabi, H. N., Buervenich, S., Carmine, A., ... & Ahlberg, J. (2003). Lack of association between the BDNF Val66Met polymorphism and Parkinson's disease in a Swedish population. *Annals of neurology*, 53(6), 823-823.
- Hunn, B. H., Cragg, S. J., Bolam, J. P., Spillantini, M. G., & Wade-Martins, R. (2015). Impaired intracellular trafficking defines early Parkinson's disease. *Trends in neurosciences*, 38(3), 178-188.
- Junn, E., & Mouradian, M. M. (2002). Human α -synuclein over-expression increases intracellular reactive oxygen species levels and susceptibility to dopamine. *Neuroscience letters*, 320(3), 146-150.
- Kaech, S., & Banker, G. (2006). Culturing hippocampal neurons. *Nature protocols*, 1(5), 2406-2415.
- Karakasis, C., Kalinderi, K., Katsarou, Z., Fidani, L., & Bostantjopoulou, S. (2011). Association of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) Val66Met polymorphism with Parkinson's disease in a Greek population. *Journal of Clinical Neuroscience*, 18(12), 1744-1745.
- Kim, K. S., Choi, S. Y., Kwon, H. Y., Won, M. H., Kang, T. C., & Kang, J. H. (2002). The ceruloplasmin and hydrogen peroxide system induces α -synuclein aggregation in vitro. *Biochimie*, 84(7), 625-631.
- Kraemer, B. R., Yoon, S. O., & Carter, B. D. (2014). The biological functions and signaling mechanisms of the p75 neurotrophin receptor. In *Neurotrophic Factors* (pp. 121-164). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Lashuel, H. A., Overk, C. R., Oueslati, A., & Masliah, E. (2013). The many faces of α -synuclein: from structure and toxicity to therapeutic target. *Nature Reviews Neuroscience*, 14(1), 38.
- Lee, S. J., Jeon, H., & Kandrор, K. V. (2008). Alpha-synuclein is localized in a subpopulation of rat brain synaptic vesicles. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, 68(4), 509-515.
- Maries, E., Dass, B., Collier, T. J., Kordower, J. H., & Steece-Collier, K. (2003). The role of α -synuclein in Parkinson's disease: insights from animal models. *Nature Reviews Neuroscience*, 4(9), 727.
- Mazzulli, J. R., Zunke, F., Isacson, O., Studer, L., & Krainc, D. (2016). α -Synuclein-induced lysosomal dysfunction occurs through disruptions in protein trafficking in human midbrain synucleinopathy models. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(7), 1931-1936.
- McCracken, A. A., & Brodsky, J. L. (2003). Evolving questions and paradigm shifts in endoplasmic-reticulum-associated degradation (ERAD). *Bioessays*, 25(9), 868-877.
- Mizui, T., Ishikawa, Y., Kumanogoh, H., Lume, M., Matsumoto, T., Hara, T., ... & Uegaki, K. (2015). BDNF pro-peptide actions facilitate hippocampal LTD and are altered by the common BDNF polymorphism Val66Met. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(23), E3067-E3074.
- Momose Y, Murata M, Kobayashi K, Tachikawa M, Nakabayashi Y, Kanazawa I, Toda T (2002) Association studies of multiple candidate genes for Parkinson's disease using single nucleotide polymorphisms. *Annals of neurology* 51:133-136.
- Morfini, G., Pigino, G., Opalach, K., Serulle, Y., Moreira, J. E., Sugimori, M., ... & Brady, S. T. (2007). 1-Methyl-4-phenylpyridinium affects fast axonal transport by activation of caspase and protein kinase C. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(7), 2442-2447.
- Mouradian, M. M. (2002). Recent advances in the genetics and pathogenesis of Parkinson disease. *Neurology*, 58(2), 179-185.
- Nagappan, G., Zaitsev, E., Senatorov, V. V., Yang, J., Hempstead, B. L., & Lu, B. (2009). Control of extracellular cleavage of ProBDNF by high frequency neuronal activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(4), 1267-1272.
- Ostrerova-Golts, N., Petrucelli, L., Hardy, J., Lee, J. M., Farer, M., & Wolozin, B. (2000). The A53T α -synuclein mutation increases iron-dependent aggregation and toxicity. *Journal of Neuroscience*, 20(16), 6048-6054.

- Outeiro, T. F., & Lindquist, S. (2003). Yeast cells provide insight into alpha-synuclein biology and pathobiology. *Science*, 302(5651), 1772-1775.
- Park, H., & Poo, M. M. (2013). Neurotrophin regulation of neural circuit development and function. *Nature Reviews Neuroscience*, 14(1), 7.
- Parkinson, James. *Essay on the Shaking Palsy*. 1817. Serial (Book, Monograph)
- Rockenstein, E., Nuber, S., Overk, C. R., Ubhi, K., Mante, M., Patrick, C., ... & Jensen, P. H. (2014). Accumulation of oligomer-prone α -synuclein exacerbates synaptic and neuronal degeneration in vivo. *Brain*, 137(5), 1496-1513.
- Schapira, A. H. (2009). Etiology and pathogenesis of Parkinson disease. *Neurologic clinics*, 27(3), 583-603.
- Spillantini, M. G., Schmidt, M. L., Lee, V. M. Y., Trojanowski, J. Q., Jakes, R., & Goedert, M. (1997). α -Synuclein in Lewy bodies. *Nature*, 388(6645), 839-840.
- Tabner, B. J., Turnbull, S., El-Agnaf, O. M., & Allsop, D. (2002). Formation of hydrogen peroxide and hydroxyl radicals from A β and α -synuclein as a possible mechanism of cell death in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Free Radical Biology and Medicine*, 32(11), 1076-1083.
- Teng, H. K., Teng, K. K., Lee, R., Wright, S., Tevar, S., Almeida, R. D., ... & Kraemer, R. T. (2005). ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75NTR and sortilin. *Journal of Neuroscience*, 25(22), 5455-5463.
- Teng, K. K., Felice, S., Kim, T., & Hempstead, B. L. (2010). Understanding proneurotrophin actions: Recent advances and challenges. *Developmental neurobiology*, 70(5), 350-359.
- Thuenauer, R., Hsu, Y. C., Carvajal-Gonzalez, J. M., Deborde, S., Chuang, J. Z., Römer, W., ... & Sung, C. H. (2014). Four-dimensional live imaging of apical biosynthetic trafficking reveals a post-Golgi sorting role of apical endosomal intermediates. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(11), 4127-4132.
- Ulmer, T. S., Bax, A., Cole, N. B., & Nussbaum, R. L. (2005). Structure and dynamics of micelle-bound human α -synuclein. *Journal of Biological Chemistry*, 280(10), 9595-9603.
- Westphal CH, Chandra SS. Monomeric synucleins generate membrane curvature. (2013). *Journal of Biological Chemistry* 18;288(3):1829-40.
- Winner, B., Jappelli, R., Maji, S. K., Desplats, P. A., Boyer, L., Aigner, S., ... & Tzitzilonis, C. (2011). In vivo demonstration that α -synuclein oligomers are toxic. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(10), 4194-4199.
- Withers, G. S., George, J. M., Banker, G. A., & Clayton, D. F. (1997). Delayed localization of synelfin (synuclein, NACP) to presynaptic terminals in cultured rat hippocampal neurons. *Developmental brain research*, 99(1), 87-94.
- Yang, J., Siao, C. J., Nagappan, G., Marinic, T., Jing, D., McGrath, K., ... & Lu, B. (2009). Neuronal release of proBDNF. *Nature neuroscience*, 12(2), 113.
- Yang J, Harte-Hargrove LC, Siao CJ, Marinic T, Clarke R, Ma Q, Jing D, Lafrancois JJ, Bath KG, Mark W, Ballon D, Lee FS, Scharfman HE, Hempstead BL. (2014). proBDNF negatively regulates neuronal remodeling, synaptic transmission, and synaptic plasticity in hippocampus. *Cell Reports*, 7(3):796-806.
- Yin, G., Da Fonseca, T. L., Eisbach, S. E., Anduaga, A. M., Breda, C., Orcellet, M. L., ... & Fernandez, C. O. (2014). α -Synuclein interacts with the switch region of Rab8a in a Ser129 phosphorylation-dependent manner. *Neurobiology of disease*, 70, 149-161.
- 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.