



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

# **Efecto del silenciamiento de los genes *PINK1* y *Parkin* sobre la dinámica y autofagia mitocondrial en un modelo de neuronas dopaminérgicas**

**María José Contreras Zárate**

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Medicina, Doctorado en Ciencias Biomédicas

Bogotá, Colombia

2016



# **Efecto del silenciamiento de los genes *PINK1* y *Parkin* sobre la dinámica y autofagia mitocondrial en un modelo de neuronas dopaminérgicas**

**María José Contreras Zárate**

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:  
Doctor en Ciencias Biomédicas

Director:

Gonzalo Humberto Arboleda Bustos MD, MSc, PhD

Línea de Investigación:

Enfermedades Neurodegenerativas

Grupo de Investigación:

Muerte Celular, Universidad Nacional de Colombia

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Medicina, Doctorado en Ciencias Biomédicas  
Ciudad, Colombia

2016



*A mis padres  
José Contreras y  
María Luisa Zárate  
Ustedes son mi mayor  
ejemplo de amor  
e integridad.*



## Agradecimientos

Quiero empezar agradeciendo a COLCIENCIAS y su programa de fortalecimiento en ciencia y tecnología del país, así como a la Universidad Nacional y su convocatoria de apoyo para el fortalecimiento de grupos de investigación, los cuales han permitido el financiamiento de esta tesis de doctorado. Agradezco a Gonzalo Arboleda por su constante apoyo a lo largo de estos años de trabajo, por haber confiado en mí cuando dimos inicio a este proyecto y proporcionarme lo necesario para cumplir con los objetivos de esta tesis.

A los doctores Humberto Arboleda y Juan José Yunis por compartirme y contagiarme de su pasión por la investigación. Asimismo quisiera agradecer a todos mis compañeros y amigos del Instituto de Genética de la Universidad Nacional, en especial a aquellos del grupo de Muerte Celular, grupo de Neurociencias y grupo de Patología Molecular. A Andrea Niño, Liliana Rojas, Alejandro Restrepo, Cesar Hernández, Estefanía Valencia, Diana Gallego, Keydy Vázquez, Tatiana Báez, Claudia Corredor, Jorge Amórtegui y Adriana Ortiz

Agradezco a Marckus Glatzel y Diego Sepúlveda por la oportunidad de trabajar junto a ellos y su equipo en el Institut für Neuropathologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf.

A los profesores Jhon Jairo Sutachán, Ismael Samudio y Carlos Clavijo, por todo el tiempo dedicado en la discusión del proyecto, así como por sus enseñanzas y valiosos consejos.

A mis amigos Jenny Jaramillo, Catalina Palacios, Manuel Hoyos, Jenny Ortega, Adrián Sandoval, Adriana Arango, Karla Romero, Iván Páez, Magda López, Lina Pedraza, Martín Pilonieta, Helena Hernández, María Fernanda Mahecha, Alejandra Carreño, Blanquita, Rita Baldrich, Jairo Alfonso Tovar, Luis Carlos Morales y María José Valencia en Hamburgo. Sin ustedes esto hubiese sido más difícil y no tan divertido, gracias por su apoyo incondicional y compañía.

Finalmente, mis más grandes agradecimientos a mis padres, José Contreras y María Luisa Zárate y a mi hermano Joseluis Contreras quienes me ayudaron de maneras inimaginables durante estos años e hicieron de la distancia algo insignificante.

A Dios por jamás abandonarme en cualquier proyecto de mi vida.

## Resumen

**Introducción:** La etiología de la Enfermedad de Parkinson (EP) aun es desconocida, la evidencia aportada por mutaciones en PINK1 y Parkin, así como modelos neurotóxicos sugiere que la EP se asocia a disfunción mitocondrial, pero no se conocen muchos de los mecanismos moleculares que la subyacen. **Objetivo:** Evaluar el efecto del silenciamiento de los genes PINK1 y Parkin sobre la fisiología mitocondrial y autofagia en células CAD expuestas a C2-ceramida. **Metodología:** Usando plásmidos lentivirales, se silenciaron los genes PINK1 y Parkin en la línea neuronal dopaminérgica CAD, se evaluaron cambios en viabilidad y vías de supervivencia neuronal, diferenciación, dinámica mitocondrial y autofagia en presencia de un reto neurotóxico inducido por C2-Ceramida. **Resultados:** el silenciamiento de PINK1 alteró la señalización del IGF1R, lo cual indujo una disminución en la activación de la proteína AKT y HKI, generando pérdida del potencial de membrana mitocondrial, incremento en el fraccionamiento de la red de mitocondrias y fallo en la mitofagia. La deficiencia de Parkin disminuyó los niveles de pERK y alteró la degradación de autofagosomas. Estos factores condujeron a una mayor susceptibilidad al tratamiento con ceramida y finalmente promovieron muerte neuronal. La sobre-expresión de Parkin recuperó el flujo autofágico en las células deficientes de PINK1 o Parkin y protegió de la muerte neuronal inducida por privación de nutrientes y ceramida. **Conclusión:** La deficiencia de PINK1 y Parkin induce muerte neuronal asociada con disfunción en vías de supervivencia, alterando el metabolismo, la dinámica mitocondrial y la autofagia.

**Palabras claves:** Enfermedad de Parkinson, PINK1, Parkin, supervivencia neuronal, ceramida, dinámica mitocondrial, autofagia



## Abstract

**Introduction:** The etiology of Parkinson's disease (PD) is still unknown, the evidence provided by mutations in PINK1 and Parkin and neurotoxic models suggests that PD is associated with mitochondrial dysfunction, but the underlying molecular mechanisms remain unknown. **Aim:** To evaluate the effect of silencing PINK1 and Parkin genes on mitochondrial physiology and autophagy in CAD cells exposed to C2-ceramide. **Methodology:** PINK1 and Parkin genes were silenced using lentiviral plasmids in dopaminergic neuronal CAD line, and changes in viability and neuronal survival, differentiation, mitochondrial dynamics and autophagy were evaluated in the presence of C2-Ceramide. **Results:** Silencing PINK1 altered IGF1R signaling, which induced a decrease in AKT and HKI activation generating loss of mitochondrial membrane potential, increased mitochondrial fission and failure in mitophagy. Parkin deficiency decreased pERK levels and altered autophagosomes degradation. All these factors led to an increased susceptibility to treatment with ceramide and finally they promoted neuronal death. The overexpression of Parkin regained autophagic flux in PINK1 or Parkin-deficient cells and protected of the neuronal death induced by starvation and ceramide. **Conclusion:** PINK1 and Parkin deficiency induces neuronal death associated with dysfunction in survival pathways, altering metabolism, mitochondrial dynamics and autophagy

**Keywords:** Parkinson's disease, PINK1, Parkin, neuronal survival, ceramide, mitochondrial dynamics, autophagy.



# CONTENIDO

<b>AGRADECIMIENTOS .....</b>	<b>VII</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>VIII</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>IX</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS .....</b>	<b>XV</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS.....</b>	<b>XIX</b>
<b>LISTA DE ANEXOS.....</b>	<b>XX</b>
<b>LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS.....</b>	<b>XXI</b>
<b>1. CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
1.1    PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	1
1.2    JUSTIFICACIÓN .....	1
1.3    HIPÓTESIS.....	2
1.3.1 <i>Predicciones</i> .....	2
1.4    OBJETIVOS.....	2
1.4.1 <i>Objetivo general</i> .....	2
1.4.2 <i>Objetivos específicos</i> .....	2
<b>2. CAPÍTULO 2: ESTADO DEL ARTE .....</b>	<b>3</b>
2.1    ENFERMEDAD DE PARKINSON.....	3
2.1.1 <i>Genética de la enfermedad de Parkinson</i> .....	4
2.2    PINK1 .....	8
2.2.1 <i>Localización subcelular de PINK1</i> .....	9
2.2.2 <i>Blancos de PINK1</i> .....	10
2.2.3 <i>Función neuroprotectora de PINK1</i> .....	11
2.3    PARKIN .....	12
2.3.1 <i>Función neuroprotectora de Parkin</i> .....	13
2.4    CERAMIDA COMO NEUROTÓXICO.....	14
<b>3. CAPÍTULO 3: MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>17</b>
3.1    MATERIALES.....	17
3.1.1 <i>Equipos</i> .....	17
3.1.2 <i>Materiales de laboratorio y desechables</i> .....	18
3.1.3 <i>Reactivos químicos y antibióticos</i> .....	19
3.1.4 <i>Kits</i> .....	20
3.1.5 <i>Marcadores</i> .....	20
3.1.6 <i>Medios de cultivo</i> .....	21
3.1.7 <i>Medios de cultivo de bacterias</i> .....	22
3.1.8 <i>Plásmidos</i> .....	22

3.1.9	<i>Anticuerpos</i> .....	23
3.1.10	<i>Programas</i> .....	26
3.2	MÉTODOS .....	27
3.2.1	<i>Células CAD</i> .....	27
3.2.2	<i>Células SHSY5Y</i> .....	28
3.2.3	<i>Competencia de bacterias JM109 usando el método de cloruro de calcio</i> .....	29
3.2.4	<i>Transformación de bacterias competentes</i> .....	29
3.2.5	<i>Protocolo de transfección usando lipofectamina 2000.</i> .....	30
3.2.6	<i>Ensayo de MTT</i> .....	32
3.2.7	<i>Ensayo de liberación de LDH</i> .....	33
3.2.8	<i>Western blot</i> .....	34
3.2.9	<i>Inmunofluorescencia</i> .....	35
3.2.10	<i>RT-PCR</i> .....	35
3.2.11	<i>Cultivo primario de neuronas hipocampales</i> .....	37
3.2.12	<i>Análisis estadístico</i> .....	38
<b>4.</b>	<b>CAPÍTULO 4: VIABILIDAD CELULAR</b> .....	<b>39</b>
4.1	INTRODUCCIÓN.....	39
4.2	VÍAS DE SUPERVIVENCIA NEURONAL .....	39
4.2.1	<i>Neurotrofinas</i> .....	39
4.2.2	<i>Otros factores de crecimiento neuronal</i> .....	40
4.2.3	<i>Traducción de señal mediada por receptores tirosina quinasa</i> .....	41
4.2.4	<i>Señalización PI3K/AKT</i> .....	43
4.2.5	<i>Señalización Ras/MAPK</i> .....	47
4.2.6	<i>Señalización PLC<math>\gamma</math></i> .....	48
4.3	OBJETIVO ESPECÍFICO .....	50
4.4	METODOLOGÍA .....	50
4.4.1	<i>Diferenciación de las células CAD</i> .....	50
4.4.2	<i>Evaluación de la tasas de crecimiento de las células CAD</i> .....	51
4.4.3	<i>Efecto de la C2C sobre la línea neuronal SHSY5Y</i> .....	52
4.4.4	<i>Análisis de viabilidad celular de células CAD</i> .....	55
4.4.5	<i>Análisis del efecto del silenciamiento de PINK1 y Parkin sobre proteínas implicadas en vía PI3K/AKT activada por IGF1 y bajo un contexto neurotóxico inducido por C2C.</i> .....	56
4.5	RESULTADOS .....	56
4.5.1	<i>El silenciamiento de PINK1 afectó la diferenciación neuronal de las células CAD</i> .	57
4.5.2	<i>El silenciamiento de PINK1 afecta la actividad mitocondrial y disminuye la tasa de crecimiento de las células CAD.</i> .....	61
4.5.3	<i>El tratamiento con C2C produce fisión mitocondrial, alteraciones en la ultraestructura mitocondrial, inhibición de la vía PI3K/AKT y disminución de la movilidad de las mitocondrias</i> .....	63
4.5.4	<i>El silenciamiento de PINK1 hace a las células CAD más susceptibles a la muerte celular inducida por C2C</i> .....	74
4.5.5	<i>La señalización celular secundaria a IGF1 se encuentra afectada en las células silenciadas para PINK1.</i> .....	74

4.5.6	<i>El silenciamiento de PINK1 alteró la activación del receptor de IGF1</i> .....	80
4.6	DISCUSIÓN.....	85
4.7	CONCLUSIONES.....	90
<b>5.</b>	<b>CAPÍTULO 5: MORFOLOGÍA MITOCONDRIAL</b> .....	<b>91</b>
5.1	INTRODUCCIÓN.....	91
5.2	PROTEÍNAS EFECTORAS DE LOS MECANISMOS DE DINÁMICA MITOCONDRIAL.....	93
5.2.1	<i>Mitofusinas</i> .....	93
5.2.2	<i>OPA1</i> .....	95
5.2.3	<i>DRP1</i> .....	96
5.2.4	<i>Proteínas adaptadoras de DRP1</i> .....	99
5.3	OBJETIVO ESPECÍFICO.....	100
5.4	METODOLOGÍA.....	100
5.4.1	<i>Evaluación de la morfología mitocondrial</i> .....	100
5.4.2	<i>Evaluación del potencial de membrana mitocondrial usando JC-1</i> .....	102
5.5	RESULTADOS.....	104
5.5.1	<i>El silenciamiento de PINK1 o Parkin altera la morfología mitocondrial favoreciendo la fisión</i> .....	104
5.5.2	<i>El silenciamiento de PINK1 o Parkin disminuyen el contenido y la interconectividad mitocondrial</i> .....	107
5.5.3	<i>El silenciamiento de PINK1 o Parkin disminuyen la expresión de FIS1</i> .....	108
5.5.4	<i>El silenciamiento de PINK1 o Parkin aumenta la desfosforilación de DRP1 (S637)</i> .....	110
5.5.5	<i>El silenciamiento de PINK1 aumenta el clivaje de OPA1<sub>L</sub></i> .....	110
5.5.6	<i>El silenciamiento de PINK1 disminuye la expresión de MNF1</i> .....	113
5.5.7	<i>El silenciamiento de PINK1 disminuye el potencial de membrana mitocondrial</i> .....	113
5.6	DISCUSIÓN.....	113
5.7	CONCLUSIONES.....	118
<b>6.</b>	<b>CAPÍTULO 6: AUTOFAGIA</b> .....	<b>119</b>
6.1	INTRODUCCIÓN.....	119
6.2	AUTOFAGIA: SU PAPEL EN SUPERVIVENCIA Y MUERTE CELULAR.....	120
6.3	MACROAUTOFAGIA.....	121
6.3.1	<i>Mecanismo molecular de la macroautofagia</i> .....	123
6.3.2	<i>Mecanismos de regulación de la autofagia</i> .....	128
6.3.3	<i>Autofagia no canónica</i> .....	130
6.3.4	<i>Mitofagia</i> .....	131
6.4	MICROAUTOFAGIA.....	134
6.5	AMC.....	135
6.6	OBJETIVO ESPECÍFICO.....	135
6.7	METODOLOGÍA.....	135
6.7.1	<i>Evaluación del efecto del silenciamiento de los genes PINK1 y Parkin sobre el proceso de mitofagia</i> .....	135
6.7.2	<i>Evaluación del proceso de degradación de autofagosomas</i> .....	137
6.7.3	<i>Análisis por western blot de proteínas implicadas en autofagia</i> .....	141

---

6.7.4	<i>Medición de la liberación de LDH</i> .....	142
6.8	RESULTADOS .....	142
6.8.1	<i>Efecto del silenciamiento de PINK1 o Parkin sobre la respuesta autofágica, secundaria a privación de nutrientes o tratamiento con C2C</i> .....	142
6.8.2	<i>Efecto del silenciamiento de PINK1 o Parkin sobre el proceso de mitofagia en un contexto neurotóxico con C2C</i> .....	146
6.8.3	<i>El silenciamiento de PINK1 o Parkin disminuyó la degradación lisosomal de los autofagosomas</i> .....	149
6.8.4	<i>Efecto del silenciamiento de PINK1 o Parkin sobre la conversión de LC3-I a LC3-II</i> 156	
6.8.5	<i>Efecto del silenciamiento de PINK1 o Parkin sobre la activación de mTOR, AMPK, AKT y ERK1/2 en un contexto de privación de nutrientes o neurotóxico.</i> .....	158
6.9	DISCUSIÓN .....	163
6.10	CONCLUSIONES .....	169
<b>7. CAPÍTULO 7: CONCLUSIONES GENERALES Y MODELO PROPUESTO</b> .....		<b>171</b>
7.1	CONCLUSIONES GENERALES .....	171
7.2	MODELO PROPUESTO .....	171
<b>ANEXOS</b> .....		<b>175</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....		<b>191</b>

# Índice de figuras

FIGURA 2. 1 INTERACCIONES PROTEÍNA-PROTEÍNA DE PARKIN .....	13
FIGURA 4.1 ILUSTRACIÓN ESQUEMÁTICA DE VÍAS DE SEÑALIZACIÓN INICIADAS POR TRKS.....	42
FIGURA 4.2 SEÑALIZACIÓN DE AKT MEDIADA POR ACTIVACIÓN DE RECEPTORES TIROSINA QUINASA .....	46
FIGURA 4.3 VÍA RAS/MAPK/ERK MEDIADA POR ACTIVACIÓN DE RECEPTORES TIROSINA QUINASA.....	49
FIGURA 4.4 VÍA PLC $\gamma$ RAS/MAPK/ERK MEDIADA POR ACTIVACIÓN DE RECEPTORES TIROSINA QUINASA .....	50
FIGURA 4.5 LAS CÉLULAS CAD INCREMENTAN LA EXPRESIÓN DE PINK1 Y PARKIN LUEGO DEL TERCER DÍA DE DIFERENCIACIÓN .....	58
FIGURA 4.6 EL SILENCIAMIENTO DE PINK1 O PARKIN ALTERA LA DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS CAD .....	59
FIGURA 4.7 EL SILENCIAMIENTO DE PINK1 AFECTA LA TASA DE CRECIMIENTO DE LAS CÉLULAS CAD.....	62
FIGURA 4.8 EL TRATAMIENTO CON C2C INDUCE MUERTE DE LAS CÉLULAS SHSY5Y .....	64
FIGURA 4.9 EL TRATAMIENTO CON C2C PRODUCE FISIÓN MITOCONDRIAL E INHIBE LA MOVILIDAD MITOCONDRIAL EN CÉLULAS SHSY5Y Y EL PRETRATAMIENTO CON IGF1 PREVIENE PARCIALMENTE TAL EFECTO. ....	67
FIGURA 4.10 EL TRATAMIENTO CON C2C (10 $\mu$ M) DIMINUYE LA FOSFORILACIÓN DE AKT SIN ALTERAR LAS PROTEÍNAS DE DINÁMICA MITOCONDRIAL EN CÉLULAS SHSY5Y .....	69
FIGURA 4.11 EL TRATAMIENTO CON C2C (50 $\mu$ M) INHIBE LA VÍA PI3K/AKT Y DISMINUYE LOS NIVELES DE MIRO, PDRP1 (S637) ASÍ COMO DE PINK1 EN CÉLULAS SHSY5Y .....	71

<b>FIGURA 4.12 EL SILENCIAMIENTO DE PINK1 O PARKIN DISMINUYE LA ACTIVIDAD MITOCONDRIAL E INCREMENTA LA LIBERACIÓN DE LDH EN CULTIVOS DE CÉLULAS CAD.....</b>	<b>75</b>
<b>FIGURA 4.13 EL SILENCIAMIENTO DE PINK1 O PARKIN INCREMENTA LA MUERTE DE LAS CÉLULAS CAD EN UN CONTEXTO NEUROTÓXICO Y DE DEPRIVACIÓN DE NUTRIENTES. ....</b>	<b>76</b>
<b>FIGURA 4.14 EL SILENCIAMIENTO DE PINK1 O PARKIN AFECTA LA ACTIVACIÓN DE AKT Y ERK DEPENDIENTE DE IGF1 .....</b>	<b>77</b>
<b>FIGURA 4.15 EL SILENCIAMIENTO DE PINK1 INHIBE LA ACTIVACIÓN DE VÍA PI3K/AKT SECUNDARIA A ESTIMULACIÓN CON IGF1. ....</b>	<b>79</b>
<b>FIGURA 4.16 EL SILENCIAMIENTO DE PARKIN DISMINUYE LA FOSFORILACIÓN DE ERK Y EL TRATAMIENTO CON C2C INCREMENTA LA ACTIVACIÓN DE JNK Y P38.....</b>	<b>81</b>
<b>FIGURA 4.17 EL SILENCIAMIENTO DE PINK1 INHIBE LA FOSFORILACIÓN DE AKT MEDIADA POR IGF1 .....</b>	<b>82</b>
<b>FIGURA 4.18 EL SILENCIAMIENTO DE PINK1 INHIBE LA ACTIVACIÓN DE IGF1R MEDIADA POR IGF1 .....</b>	<b>83</b>
<b>FIGURA 4.19 REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE AKT MEDIADA POR PINK1.....</b>	<b>89</b>
<b>FIGURA 5.1 PROTEÍNAS DE DINÁMICA MITOCONDRIAL .....</b>	<b>94</b>
<b>FIGURA 5.2 REGULACIÓN DE LA FUSIÓN MITOCONDRIAL .....</b>	<b>95</b>
<b>FIGURA 5.3 REGULACIÓN DE LA FISIÓN MITOCONDRIAL .....</b>	<b>98</b>
<b>FIGURA 5.4 EL SILENCIAMIENTO DE PINK1 O PARKIN INCREMENTA EL NÚMERO DE CÉLULAS CON REDES MITOCONDRIALES FISIONADAS.....</b>	<b>105</b>
<b>FIGURA 5.5 EL SILENCIAMIENTO DE PINK1 O PARKIN DISMINUYEN EL CONTENIDO Y LA INTERCONECTIVIDAD MITOCONDRIAL.....</b>	<b>108</b>
<b>FIGURA 5.6 EL SILENCIAMIENTO DE PINK1 O PARKIN DISMINUYEN LA EXPRESIÓN DE FIS1.....</b>	<b>109</b>
<b>FIGURA 5.7 EL SILENCIAMIENTO DE PINK1 O PARKIN AUMENTA LA DESFOSFORILACIÓN DE DRP1 (S637).....</b>	<b>111</b>
<b>FIGURA 5.8 EL SILENCIAMIENTO DE PINK1 AUMENTA EL CLIVAJE DE OPA1L ..</b>	<b>112</b>
<b>FIGURA 5.9 EL SILENCIAMIENTO DE PINK1 DISMINUYE LA EXPRESIÓN DE MNF</b>	<b>114</b>



<b>FIGURA 5.10 EL SILENCIAMIENTO DE PINK1 DISMINUYE EL POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL .....</b>	<b>115</b>
<b>FIGURA 5.11 MODELO .....</b>	<b>118</b>
<b>FIGURA 6.1 TIPOS DE AUTOFAGIA .....</b>	<b>120</b>
<b>FIGURA 6.2 DOMINIOS ESTRUCTURALES DE RECEPTORES DE AUTOFAGIA SELECTIVA .....</b>	<b>126</b>
<b>FIGURA 6.3 MECANISMOS DE REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE BECLIN-1 ....</b>	<b>129</b>
<b>FIGURA 6.4 DISEÑO EXPERIMENTAL, DE LA EVALUACIÓN DEL FLUJO AUTOFÁGICO POR EXPRESIÓN DE PTF-LC3.....</b>	<b>140</b>
<b>FIGURA 6.5 DISEÑO EXPERIMENTAL, ANÁLISIS DE PROTEÍNAS IMPLICADAS EN AUTOFAGIA POR WESTERN BLOT .....</b>	<b>141</b>
<b>FIGURA 6.6 EL SILENCIAMIENTO DE PINK1 O PARKIN HIZO A LAS CÉLULAS MÁS SUSCEPTIBLES A AFG POR C2C Y EL SILENCIAMIENTO DE PARKIN INCREMENTÓ EL NÚMERO DE AGREGADOS EGFP-LC3.....</b>	<b>143</b>
<b>FIGURA 6.7 EL SILENCIAMIENTO DE PINK1 O PARKIN DISMINUYÓ LA MITOFAGIA SECUNDARIA AL TRATAMIENTO CON C2C. ....</b>	<b>147</b>
<b>FIGURA 6.8 EFECTO DEL SILENCIAMIENTO DE PINK1 O PARKIN SOBRE EL MARCAJE DE COMPARTIMENTOS ACÍDICOS CON MDC.....</b>	<b>150</b>
<b>FIGURA 6.9 EL SILENCIAMIENTO DE PINK1 O PARKIN DISMINUYÓ LA DEGRADACIÓN LISOSOMAL DE LOS AUTOFAGOSOMAS Y ESTE FLUJO FUE RECUPERADO POR LA SOBRE-EXPRESIÓN DE PARKIN.....</b>	<b>151</b>
<b>FIGURA 6.10 EL SILENCIAMIENTO DE PINK1 O PARKIN INCREMENTAN LOS NIVELES DE LC3-II. ....</b>	<b>157</b>
<b>FIGURA 6.11 LAS ALTERACIONES EN EL PROCESO DE AFG ASOCIADAS AL SILENCIAMIENTO DE PINK1 (EN CONDICIONES DE DN O C2C), NO SE ASOCIARON CON LA REGULACIÓN DE MTOR. ....</b>	<b>159</b>
<b>FIGURA 6.12 LA SOBRE-EXPRESIÓN DE PARKIN SE ASOCIÓ CON UNA INHIBICIÓN DE LA ACTIVACIÓN DE AMPKA EN LAS CÉLULAS SILENCIADAS PARA PINK1. ....</b>	<b>160</b>
<b>FIGURA 6.13 LA DN Y EL TRATAMIENTO CON C2C DISMINUYEN LA FOSFORILACIÓN DE AKT.....</b>	<b>162</b>
<b>FIGURA 6.14 LA DN INCREMENTA LA FOSFORILACIÓN DE AKT MIENTRAS QUE EL TRATAMIENTO CON C2C LA DISMINUYE.....</b>	<b>164</b>

XVIII

Efecto del silenciamiento de los genes *PINK1* y *Parkin* sobre la dinámica y autofagia mitocondrial en un modelo de neuronas dopaminérgicas

---

**FIGURA 6.15 LA SOBREENPRESIÓN DE PARKIN DISMINUYE LA MUERTE DE CELULAR EN LAS CÉLULAS SILENCIADAS PARA PINK1 LUEGO DE DN Y C2C .165**

## Índice de tablas

TABLA 2.1 GENES ASOCIADOS CON FORMAS MONOGÉNICAS DE LA EP .....	5
TABLA 3.1 EQUIPOS ESPECIALIZADOS .....	17
TABLA 3.2 MATERIALES DE LABORATORIO Y DESECHABLES .....	18
TABLA 3.3 REACTIVOS QUÍMICOS Y ANTIBIÓTICOS .....	19
TABLA 3.4 KITS .....	20
TABLA 3.5 MARCADORES .....	20
TABLA 3.6 MEDIOS DE CULTIVO DE CÉLULAS EUCARIOTAS .....	21
TABLA 3.7 MEDIOS DE CULTIVO DE CÉLULAS DE BACTERIAS .....	22
TABLA 3.8 PLÁSMIDOS .....	22
TABLA 3.9 ANTICUERPOS PRIMARIOS .....	23
TABLA 3.10 ANTICUERPOS SECUNDARIOS .....	26
TABLA 3.12 REFERENCIA DE SIEMBRA DE CÉLULAS CAD SEGÚN EXPERIMENTO Y RECIPIENTE .....	28
TABLA 3.13 ESPECIFICACIONES DE LAS MEZCLAS DE TRANSFECCIÓN.....	32
TABLA 3.14 SOLUCIONES USADAS EN <i>WESTERN BLOT</i> .....	35
TABLA 6.1 PROTEÍNAS INVOLUCRADAS EN LA BIOGÉNESIS DE AUTOFAGOSOMAS Y SU FUSIÓN CON LISOSOMAS .....	122

## Lista de anexos

A.	VERIFICACIÓN DEL SILENCIAMIENTO DE PINK1 Y PARKIN.....	175
B.	PROGRAMA DE AMPLIFICACIÓN POR RT-PCR.....	176
C.	ESTANDARIZACIÓN CONTROLES DE APOPTOSIS Y NECROSIS PARA CITOMETRÍA DE FLUJO .....	176
D.	ANÁLISIS DE CITOMETRÍA CON EL PROGRAMA FLOW JO.....	177
E.	RESULTADOS PRELIMINARES EN NEURONAS HIPOCAMPALES SILENCIADAS PARA PINK1.....	178
F.	ESTANDARIZACIÓN MITOTRACKER® RED CMXROS. ....	179
G.	MODIFICACIONES MACRO <i>MITO-MORPHOLOGY</i> .....	179
H.	EL SILENCIAMIENTO DE PINK1 O PARKIN FAVORECE DESFOSFORILACIÓN DE DRP1 EN SERINA 637.....	182
I.	EL SILENCIAMIENTO DE PINK1 DISMINUYE LA EXPRESIÓN DE MNF.....	183
J.	EL SILENCIAMIENTO DE PINK1 EN LAS CÉLULAS CAD DISMINUYE EL JC-1 POR CITOMETRÍA .....	183
K.	EJEMPLO DEL ANÁLISIS DE IMÁGENES, PARA EVALUAR FLUJO AUTOFÁGICO USANDO EL <i>PLUGIN</i> ITCN DE IMAGEJ.....	185
L.	EL TRATAMIENTO CON C2C INCREMENTA EL ÁREA MEDIA DE LOS AGREGADOS GFP-LC3.....	186
M.	RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN DE FLUJO AUTOFÁGICO .....	187
N.	VERIFICACIÓN DE LA SOBRE-EXPRESIÓN DE PARKIN EN CÉLULAS SILENCIADAS PARA PINK1.....	188
O.	EL SILENCIAMIENTO DE PINK1 AFECTA LA LOCALIZACIÓN MITOCONDRIAL DE HK1 Y SU ACTIVIDAD .....	189

## Lista de símbolos y abreviaturas

### Unidades

<b>%v/v</b>	Porcentaje volumen/volumen
<b>g</b>	gramos
<b>h</b>	horas
<b>kb</b>	kilobases
<b>min</b>	minutos
<b>ml</b>	mililitros
<b>mV</b>	milivoltios
<b>mW</b>	Megavatios
<b>ng</b>	nanogramos
<b>nm</b>	nanómetros
<b>nM</b>	nanomolar
<b>°C</b>	Grados centígrados
<b>s</b>	segundos
<b>µl</b>	microlitros
<b>µM</b>	micromolar

### Abreviaturas

<b>3MA</b>	3 metiladenina
<b>4EBP1</b>	<i>Phosphorylated 4E-binding protein</i>
<b>4H</b>	<i>Four-helix bundle domain</i>
<b>aa</b>	Aminoácidos
<b>ABD</b>	<i>Ams1-binding domain</i>
<b>Abs</b>	Absorbancia
<b>ACL</b>	<i>ATP citrate lyasa</i>
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>AMA GFP-LC3</b>	Área media de agregados de GFP-LC3
<b>AMBRA1</b>	<i>Activating molecule in Beclin1-regulated autophagy 1</i>
<b>AMC</b>	Autofagia mediada por chaperonas

<b>AMPK</b>	AMP-activated protein kinase
<b>AP1</b>	<i>Activator protein-1</i>
<b>APS</b>	Persulfato de amonio
<b>ASK1</b>	<i>Apoptosis signaling kinase-1</i>
<b>ATCC</b>	<i>American tissue cell culture</i>
<b>ATG</b>	<i>Autophagy-related genes</i>
<b>ATM</b>	<i>Ataxia telangiectasia mutated</i>
<b>ATP</b>	<i>Adenosin trifosfato</i>
<b>ATR</b>	<i>ATM and Rad3-related</i>
<b>AV</b>	<i>Anexina V</i>
<b>BCA</b>	Ácido bicinconínico
<b>BECLIN1</b>	<i>Becn1; coiled-coil, myosin-like BCL2-interacting protein 1</i>
<b>BH3</b>	<i>Bcl-2 homology (BH) domain 3</i>
<b>BSA</b>	<i>Bovine serum albumin</i> - Albúmina sérica bovina
<b>CAD</b>	<i>Cath.a-differentiated</i>
<b>CaMKI<math>\alpha</math></b>	Ca <sup>2+</sup> /calmodulin-dependent protein kinase I $\alpha$
<b>CAMKK</b>	Ca <sup>2+</sup> /calmodulin dependent kinase
<b>Cath.a</b>	<i>CNS catecholaminergic cel line</i>
<b>CBM20</b>	<i>Family 20 carbohydrate-binding module domain</i>
<b>CBP</b>	<i>Creb binding protein</i>
<b>CC</b>	<i>Coiled-coil domain</i>
<b>CCCP</b>	Carbonilcianuro-m-clorofenilhidrazona
<b>Cdk</b>	Cyclin-dependent kinase
<b>ChK1</b>	<i>DNA damage checkpoint kinase</i>
<b>CKDi</b>	<i>CDK inhibitor</i>
<b>COXII</b>	Subunidad II de la citocromo C oxidasa
<b>CREB</b>	<i>Camp response element-binding</i>
<b>C-t</b>	Extremo carboxi terminal
<b>CUB</b>	Dominio de c1r/c1s, Uegf, y Bmp1
<b>DAG</b>	Diacilglicerol
<b>DC</b>	Dominio central

## Lista de símbolos y abreviaturas

---

<b>DFC</b>	Dominio de Factor de Crecimiento
<b>DFCP1</b>	<i>Double FYVE domain–containing protein 1</i>
<b>DIC</b>	Contraste por interferencia diferencial <i>Differential interference contrast</i>
<b>DMEM</b>	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> -Medio Eagle modificado por Dulbecco
<b>DMSO</b>	Dimetil sulfóxido
<b>DN</b>	Deprivación de nutrientes
<b>DRP1</b>	<i>Dihidropirimidase-related protein 1</i>
<b>DRP2</b>	<i>Dihidropirimidase-related protein 2</i>
<b>DUBs</b>	<i>Deubiquitinating enzymes</i>
<b>DV</b>	Dominio variable
<b>EAT</b>	Early autophagy targeting/tethering
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiamino tetraacético
<b>EF</b>	<i>EF-hand-fold domain</i>
<b>EF2</b>	<i>Elongation factor 2</i>
<b>EGF</b>	Epidermal growth factor
<b>EGFR</b>	Epidermal growth factor receptor
<b>eIF4E</b>	<i>Eukaryotic translation initiation factor 4E</i>
<b>EIM</b>	Espacio inter membranar
<b>ERES</b>	<i>Endoplasmatic reticulum exit sites</i>
<b>ERGIC</b>	Compartimentos intermedios RE-Golgi
<b>ERK 1/2</b>	<i>Extracellular-signal-regulated kinase</i> (isoformas 1 y 2)
<b>FasL</b>	<i>Fas ligand</i>
<b>FCCP</b>	<i>Carbonylcyanide p-trifluoromethoxyphenylhydrazone</i>
<b>FIP200</b>	<i>Focal adhesion kinase interacting protein of 200 kda</i>
<b>FOXO</b>	<i>Forkhead box transcription factors class O</i>
<b>FW</b>	<i>Four tryptophan domain</i>
<b>Gal-8</b>	Galectina 8
<b>GAP</b>	<i>Gtpase-activating protein</i>
<b>GED</b>	<i>Gtpase effector domain</i>
<b>GEF</b>	<i>Guanine nucleotide exchange factors</i>
<b>GSK3<math>\beta</math></b>	<i>Glycogen synthase kinase 3 beta</i>

<b>GWAS</b>	<i>Genome wide association studies</i>
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Agua ultrapura, destilada, desionizada
<b>HBSS</b>	<i>Hanks' balanced salt solution</i>
<b>HDAC6</b>	<i>Histone deacetylase 6</i>
<b>HeNe</b>	Helio neón (referente al láser)
<b>HM</b>	<i>Hydrophobic motif kinase</i>
<b>Hsp</b>	<i>Heat shock protein</i> - proteínas de choque térmico
<b>HtrA2</b>	<i>High temperature requirement A2 protease</i>
<b>IdF</b>	Intensidad de fluorescencia
<b>IDR</b>	<i>Intrinsically disordered region</i>
<b>IF</b>	Inmunofluorescencia
<b>IGF1R</b>	<i>Insulin-like growth factor 1 receptor</i>
<b>I<math>\kappa</math>B</b>	<i>Inhibitor of <math>\kappa</math>b</i>
<b>IKK<math>\alpha</math></b>	<i>I<math>\kappa</math>b kinase <math>\alpha</math></i>
<b>IL 1</b>	Interleucina 1
<b>ILK</b>	<i>Integrin-linked kinase</i>
<b>IP</b>	Ioduro de propidio
<b>IP2</b>	Fosfatidil inositol bifosfato
<b>JNK</b>	<i>C-jun N-terminal kinase</i>
<b>KIR</b>	<i>Keap interacting region</i>
<b>LAPTM4B</b>	<i>Lysosomal protein transmembrane 4b</i>
<b>LC3</b>	<i>Microtubule associated protein 1 light chain 3</i>
<b>LDH</b>	Lactato deshidrogenasa
<b>L-DOPA</b>	L-dihidroxifenilalanina
<b>LIR</b>	<i>LC3-interacting region</i>
<b>lysoNa<sub>ATP</sub></b>	Canales de sodio sensibles a ATP de la membrana lisosomal
<b>lysoNav</b>	Canales de sodio dependientes de voltaje de la membrana lisosomal
<b>MAMs</b>	<i>Mitochondria-associated endoplasmic reticulum membranes</i>
<b>MAPK</b>	<i>Mitogen Activated Protein Kinase</i> - protein quinasa activada por mitógenos



## Lista de símbolos y abreviaturas

---

<b>MAPKAPK2/MAPK</b>	<i>MAP kinase activated protein kinases 2/3</i>
<b>APK3-MK2/MK3</b>	
<b>MAPL</b>	<i>Mitochondria-Associated protein ligase</i>
<b>MARCH-V</b>	<i>Membrane-associated RING finger protein 5</i>
<b>MCL1</b>	<i>Myeloid cell leukemia sequence 1</i>
<b>MDC</b>	Monodancil cadaverina
<b>Mdm2</b>	<i>Murine double minute 2</i>
<b>MFNs</b>	Mitofusinas
<b>MPP</b>	<i>Mitochondrial processing peptidase</i>
<b>mRNA</b>	RNA mensajero
<b>MTMR14 o MTMR3</b>	<i>Myotubularin-related protein 14 or 3</i>
<b>mTOR</b>	<i>Mammalian target of rapamycin</i>
<b>mTORC1</b>	<i>Mammalian target of rapamycin complexes 1</i>
<b>MTS</b>	<i>Matrix targeting sequence</i>
<b>MTT</b>	Metil tiazol tetrazolium
<b>NBR1</b>	<i>Neighbor of Brca1 gene</i>
<b>NES</b>	<i>Nuclear export signal</i>
<b>NFκB</b>	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
<b>NGF</b>	Factor de Crecimiento Neural
<b>NIX</b>	<i>NIP3-like protein X</i>
<b>NLS1 y 2</b>	<i>Nuclear localization signals 1 and 2</i>
<b>nt</b>	Nucleótidos
<b>nt</b>	Nucleótidos
<b>N-t</b>	Extremo amino terminal
<b>OMA1</b>	<i>Overlapping activity with m-AAA protease</i>
<b>OPA1</b>	<i>Optic atrophy 1</i>
<b>OPTN</b>	Optineurina
<b>ORF</b>	<i>Open reading frame</i>
<b>PARL</b>	<i>Presenilin-associated rhomboid-like protease</i>
<b>PB1</b>	<i>Phox and Bem1 domain</i>
<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino
<b>PDGF</b>	<i>Platelet Derived Growth Factor-</i> Factor de Crecimiento derivado de Plaquetas

---

<b>PDK1</b>	<i>Phosphoinositide Dependent protein Kinase 1</i>
<b>PDK2</b>	<i>3-phosphoinositide-dependent protein kinase 2</i>
<b>PH</b>	<i>Pleckstrin Homology-Dominio de Homología a Pleckstrin</i>
<b>PI(3)P</b>	Fosfatidil inositol 3 fosfato
<b>PI(3,5)P<sub>2</sub></b>	Fosfatidil 3, 5 bifosfato
<b>PI(4,5)P<sub>2</sub></b>	<i>Phosphatidyl Inositol 4,5-biphosphate</i>
<b>PI3K</b>	<i>Phospho Inositide 3-kinase</i> -Fosfatidil inositol 3 quinasa
<b>PIP</b>	<i>Phosphatidyl inositol 4 phosphate</i>
<b>PIP2</b>	<i>Phosphatidyl Inositol 3,4-biphosphate</i>
<b>PIP3</b>	<i>Phosphatidyl Inositol 3,4,5-triphosphate</i>
<b>PKA</b>	Proteína quinasa A
<b>PKB</b>	Proteína quinasa B
<b>PKC</b>	Proteína quinasa C
<b>PLC<math>\gamma</math></b>	Fosfolipasa C gamma
<b>PMN</b>	<i>Piecemeal microautophagy of the nucleus</i>
<b>PP2A</b>	<i>Protein phosphatase 2A</i>
<b>PRAS40</b>	<i>Proline-Rich Akt/PKB Substrate 40 kda</i>
<b>PSD95</b>	<i>Postsynaptic Density protein 95</i>
<b>PtdEtn</b>	Fosfatidiletanolamina
<b>PTEN</b>	<i>Phosphatase and Tensin homolog deleted on chromosome TEN</i>
<b>RE</b>	Retículo endoplasmático
<b>RhoGAP29</b>	<i>Rho gtpase-activating protein 29</i>
<b>Ring</b>	<i>Really-interesting-new-gene-finger domain</i>
<b>RNA</b>	<i>Ribonucleic acid</i>
<b>ROCKII</b>	<i>Rho-associated protein kinase 2</i>
<b>ROS</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>RP-HPLC</b>	Cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa
<b>S6K</b>	<i>S6 ribosomal kinase</i>
<b>SAXS</b>	<i>Small-angle X-ray scattering</i>
<b>SDI</b>	Inhibidor de la succinato deshidrogenasa

## Lista de símbolos y abreviaturas

---

<b>SDS</b>	Dodecil sulfato de sodio
<b>SEM</b>	Error estándar de la media
<b>SFB</b>	Suero fetal bovino
<b>SH2</b>	<i>Src-homology 2 domain</i>
<b>SKICH</b>	<i>SKIP carboxyl homology domain</i>
<b>SNARE</b>	<i>Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor</i>
<b>SNpc</b>	<i>Sustancia nigra pars compacta</i>
<b>SPT</b>	Solución patrón de trabajo
<b>Stx17</b>	<i>Syntaxin 17</i>
<b>SUMO</b>	<i>Small ubiquitin-like modifier</i>
<b>TEMED</b>	Tetrametilenetilendiamida
<b>TGF<math>\beta</math></b>	Factor de Crecimiento Transformante $\beta$
<b>TH</b>	Tirosina hidroxilasa
<b>TM</b>	<i>Transmembrane domain</i>
<b>TOM</b>	<i>Translocase of the outer membrane</i>
<b>TPC</b>	<i>Two pore channel</i>
<b>TRIS</b>	Tris(hidroximetil)aminometano
<b>TSC2</b>	<i>Tuberous sclerosis complex 2</i>
<b>u.a</b>	Unidades arbitrarias
<b>Ub</b>	Ubiquitina
<b>UBA</b>	<i>Ubiquitin-associated domain</i>
<b>UBAN</b>	<i>Ubiquitin binding in ABIN and NEMO domain</i>
<b>ULK1</b>	Unc-51-like kinase1
<b>UPS</b>	Sistema ubiquitin proteosoma
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>v-Akt</b>	Oncogén retroviral Akt
<b>VEGF</b>	Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular
<b>VMP1</b>	<i>Multi-membrane spanning protein vacuole membrane protein-1</i>
<b>WB</b>	<i>Western blot</i>
<b>WIPI1/2</b>	<i>WD repeat domain phosphoinositide interacting proteins</i>
<b>YAP</b>	<i>Yes associated protein.</i>

<b>ZF</b>	<i>Zinc-finger domain</i>
<b>ZZ</b>	<i>ZZ-type zink finger domain</i>
<b><math>\Delta\Psi_m</math></b>	Potencial de membrana interna mitocondrial

# 1. Capítulo 1: Introducción

## 1.1 Planteamiento del problema

La Enfermedad de Parkinson (EP) es una patología neurodegenerativa causante de una gran discapacidad con graves consecuencias económicas y sociales, que afecta a la población mundial en general. El principal problema relacionado con la EP es el desconocimiento de la causa de la muerte selectiva de las neuronas dopaminérgicas en la *sustancia nigra pars compacta* (SNpc), y su amplia heterogeneidad clínico-genética.

La evidencia aportada por modelos genéticos y bioquímicos sugiere que la patología tiene un componente mitocondrial importante, pero muchos de los mecanismos moleculares que subyacen la disfunción mitocondrial permanecen desconocidos. Por lo tanto, el análisis molecular *in vitro* de la función mitocondrial y de procesos fisiológicos de dinámica mitocondrial (fusión-fisión) y mitofagia, podría esclarecer aspectos de la fisiopatología neuronal de esta enfermedad.

En la actualidad, las proteínas PINK1 y Parkin asociadas con EP de origen familiar, están implicadas en procesos neuroprotectores directamente asociados a la regulación de la dinámica y autofagia mitocondrial. Los resultados, sin embargo, son contradictorios y dependen en gran medida del modelo de estudio. En el presente proyecto, se estudiaron los mecanismos por los cuáles la deficiencia de PINK1 y Parkin afecta la fisiología mitocondrial y autofagia en un modelo de neuronas dopaminérgicas, células CAD, expuestas a C2-ceramida.

## 1.2 Justificación

En la actualidad los estudios genéticos han identificado varios genes asociados con la EP familiar. Entre ellos los genes *PINK1* y *Parkin* se han encontrado involucrados en las formas de inicio temprano y patrón de herencia autosómica recesiva. Estos genes codifican para las proteínas PINK1 y Parkin, candidatas en el proceso de regulación de la dinámica mitocondrial, además evidencia experimental las interrelaciona con procesos neuroprotectores, que involucran mecanismos altamente regulados como la mitofagia. En este sentido, el poder conocer la función que desempeñan estas proteínas normalmente y qué sucede cuando no están presentes en neuronas dopaminérgicas, representa un nuevo

reto para la investigación en EP, ya que el estudio de los mecanismos moleculares por los cuales las neuronas del sistema dopaminérgico nigroestriado mueren o se protegen, permitirá en un futuro el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas que detengan o hagan más lenta la evolución de esta enfermedad neurodegenerativa.

## 1.3 Hipótesis

El efecto neuroprotector de PINK1 y Parkin en el control de calidad mitocondrial está mediado por la regulación de AKT.

### 1.3.1 Predicciones

- El silenciamiento de PINK1 y Parkin se asocia a menores niveles de pAKT haciendo a las neuronas más susceptibles a insultos neurotóxicos
- La activación de la vía de supervivencia PI3K/AKT restaura los efectos fisiológicos asociados a la deficiencia de PINK1 y Parkin

## 1.4 Objetivos

### 1.4.1 Objetivo general

Evaluar el efecto del silenciamiento de los genes PINK1 o Parkin sobre la fisiología mitocondrial y autofagia en células CAD expuestas a C2-ceramida

### 1.4.2 Objetivos específicos

Identificar el efecto del silenciamiento de los genes *PINK1* o *Parkin* sobre la viabilidad de células CAD tratadas con C2-ceramida.

Evaluar el efecto del silenciamiento de los genes *PINK1* o *Parkin* en la dinámica mitocondrial de células CAD tratadas con C2-ceramida

Evaluar el efecto del silenciamiento de los genes *PINK1* o *Parkin* sobre la autofagia modulada por privación de nutrientes y C2-ceramida.

Evaluar el efecto de la sobre-expresión de Parkin en células silenciadas para PINK1 sobre supervivencia celular y autofagia.

## 2. Capítulo 2: Estado del arte

### 2.1 Enfermedad de Parkinson

La EP es el desorden neurodegenerativo más común luego de la Enfermedad de Alzheimer [1]. Sus índices de prevalencia son muy variables dependiendo de la metodología de recolección de datos, encontrándose cifras más altas en Europa [2] y América [3, 4] y menores en Asia [5] y África [6].

Inicialmente fue descrita por James Parkinson en 1817 quien la denominó “parálisis agitante” debido al temblor involuntario y con bajo tono muscular que presentaban los individuos que la padecían, mientras estaban en reposo [7]. Fisiopatológicamente se relaciona con una deficiencia de dopamina en el cuerpo estriado que resulta de una degeneración selectiva y crónica de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc, lo cual se manifiesta con temblor en reposo, rigidez en “rueda dentada” y aquinesia [8]. Sin embargo, luego de varios años de progresión de la enfermedad, los pacientes desarrollan otros signos motores, como trastornos de la marcha, inestabilidad postural y disartria, que resultan de lesiones no dopaminérgicas; los pacientes también manifiestan trastornos neuropsiquiátricos, trastornos de sueño, disfunción autonómica, síntomas gastrointestinales, síntomas sensoriales, entre otros [9, 10]. Estos síntomas son los responsables directos de la poca calidad de vida de los pacientes parkinsonianos.

A nivel neuropatológico, la EP se caracteriza por degeneración neuronal, gliosis reactiva, muerte selectiva y la presencia de cuerpos de Lewy y neuritas de Lewy, en neuronas dopaminérgicas de la SNpc y el *locus coeruleus*, donde las células más afectadas presentan algunas características diferenciales como son: localización en zonas con alta densidad celular, alto contenido de neuromelanina, expresión abundante del transportador de dopamina, pobre contenido de calbindina y enzimas glucolíticas, y alta arborización en el estriado [11]. La tomografía por emisión de positrones y la tomografía computarizada de emisión de fotón único han reflejado cambios en el metabolismo de la glucosa, de la levodopa y alteraciones en su unión con el transportador de dopamina en pacientes con EP [12].

La EP es un trastorno multifactorial donde los componentes ambiental y genético son complementarios al proceso que la subyace. Algunas toxinas exógenas como el MPTP (1-

metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina) [13], rotenona [14] y 6-hidroxi dopamina (6-OHDA) [15], o endógenas como la ceramida [16], se han relacionado con el establecimiento de este desorden. Adicionalmente, modificaciones genéticas que conlleven a procesos de estrés oxidativo, disfunción mitocondrial, o del sistema ubiquitin-proteosoma (SUP) [17, 18] junto al proceso fisiológico de envejecimiento [19], se han considerado como contribuyentes al desarrollo de la EP.

Mientras que la causa de la muerte celular en la EP es aún desconocida, la escasez de cambios necróticos en la SNpc, el patrón topográfico y temporalmente específico de la pérdida celular, hace de la apoptosis el principal mecanismo de muerte neuronal en esta patología [20]. En este sentido se conoce que las alteraciones mitocondriales surgen del delicado balance entre los niveles de las proteínas pro y anti-apoptóticas, los procesos de dinámica mitocondrial y la autofagia [21]; así como de alteraciones de vías de señalización que regulan corriente arriba los anteriores procesos moleculares [22]. Es así que la mitocondria, como vía final común, ha sido la más estudiada en eventos de muerte y de supervivencia neuronal y se ha asociado con un amplio espectro de enfermedades neurodegenerativas, entre ellas la EP [23].

### **2.1.1 Genética de la enfermedad de Parkinson**

La contribución de factores genéticos en el desarrollo de la EP no fue estimada por muchos años, aun cuando desde 1880 se reportó que el 15% de los casos de EP tenían una historia familiar [24, 25]. Con la reciente descripción de mutaciones en diferentes genes asociados con formas monogénicas de la EP, este componente ha tomado una gran importancia. Sin embargo, el monto de la contribución genética y la interacción de factores ambientales y genéticos permanecen sin aclararse por completo [26]. Adicionalmente, estudios de gemelos a gran escala han demostrado que los factores genéticos cumplen una función primordial en casos de inicio temprano de la EP [27].

Uno de los grandes avances en la investigación biomédica básica en enfermedades neurodegenerativas ha sido el reconocimiento, mapeo y descripción de varios genes asociados a algunas formas heredadas monogénicamente de las enfermedades. Es así que análisis de ligamiento o estudios de asociación de genoma completo (GWAS, del inglés *Genome wide association studies*), han permitido establecer varios loci para la EP que se han denominado según la secuencia cronológica de su identificación PARK1 a PARK21 (OMIN #168600). En este sentido, se han identificado varios genes responsables de la EP, con patrones de herencia mendeliana autosómica dominante o recesiva y variabilidad de algunas características clínicas (véase tabla 2.1).



**Tabla 2.1 Genes asociados con formas monogénicas de la EP**

Locus/Genes	Herencia	Mutaciones	Rango de edad de inicio	Rasgos Clínicos	Referencias
<b>PARK1/</b> <i>SNCA</i> (4q21)	AD	Sustituciones de A30>P, G46>K y A53>T; duplicaciones genómicas y triplicaciones.	Duplicaciones: 38-65 años. Triplicaciones: 24-48 años	Respuesta progresiva a levodopa, disfunción autonómica y demencia; en los casos de Glu46>Lys alucinaciones y descenso cognitivo; rápida progresión en Ala53>Thr y casos de triplicación.	[29-37]
<b>PARK2/</b> <i>PARKIN</i> (6q25.2-27)	AR	Mutaciones con sentido(>57); deleciones ,duplicaciones y triplicaciones	< 45 años	Parkinsonismo con progresión lenta, respuesta a bajas dosis de levodopa.	[38]
<b>PARK3/</b> <i>HGNC</i> (2p13)	AD	ND	59 años	Parkinsonismo típico	[39-41]
<b>PARK4/</b> <i>SNCA</i> (4p15)	AD	Triplicación en el gen <i>SNCA</i>	~30	Parkinsonismo típico	[42, 43]
<b>PARK5/</b> <i>UCHL1</i> (4p14)	AD	Sustituciones: I93>M, S18>Y y M124>L	49-58 años	Parkinsonismo típico	[45-47]
<b>PARK6/</b> <i>PINK1</i> (1p35-36)	AR	Deleciones, y sustituciones	20-40 años	Progresión lenta, respuesta a dosis bajas de levodopa, disquinesias	[48-50]
<b>PARK7/</b> <i>DJ-1</i> (1p36)	AR	Sustituciones: L166>P; deleciones (de IEx1-5), inserción y deleción en el promotor	20-40 años	Progresión lenta, respuesta a levodopa, en ocasiones con distonía, trastorno psiquiátrico; demencia, amiotrofia.	[51-56]

**Tabla 2.1** (continuación)

<b>PARK8/LRRK2</b> (12q12)	AD	Varias sustituciones: Arg1441>Cys/Gly, Tyr1699>Cys, Gly2019>Ser y Ile2020>Thr	50–70 años	Respuesta predominante a levodopa, ocasionalmente con distonía, parálisis de la mirada, demencia y amiotrofia.	[57-60]
<b>PARK9/ATP13A2</b> (1p36)	AR	Sustituciones: Ala746>Thr, y Gly504>Arg, Thr12>Met, Gly533>Arg; deleciones y duplicaciones (exon 16)	12–18 años	Respuesta a levodopa, con degeneración piramidal, parálisis en la mirada y demencia.	[61-64]
<b>PARK10/ND</b> (1p32)	ND	ND	ND	Parkinsonismo típico	[65, 66]
<b>PARK11/GIGYF2</b> (2q36–37)	AD	Sustituciones: Asn56>Ser, Asn457>Thr	ND	Parkinsonismo típico	[67-70]
<b>PARK12/Des conocido</b> (Xq21–25)	Ligada al X	ND	ND	Parkinsonismo típico	[68]
<b>PARK13/Omi/HTRA2</b> (2p12)	ND	Sustituciones: Gly399>Ser, Ala141>Ser	49–77 años	Parkinsonismo típico	[71, 72]
<b>PARK14/PLA2G6</b> (22q13.1)	AR	ND	ND	Acompañado de demencia, psicosis, distonía	[73, 74]
<b>PARK15/FBXO7</b> (22q12-q13)	AR	Polimorfismos (-274G-->C, c.A155G)	ND	Parkinsonismo típico	[75, 76]

Tabla 2.1 (continuación)

<b>PARK16/ND</b> (1q32)	ND	Polimorfismos	ND	Parkinsonismo típico	[77, 78]
<b>PARK17/VPS</b> 35	AD	Mutaciones D620N	42-64 años	Parkinsonismo típico, algunos individuos afectados mostraron dificultades en el aprendizaje y un individuo presentó retardo mental y esquizofrenia y demencia al final de su vida.	[81-83]
<b>PARK18/EIF</b> 4G1(3q27.1)	AD	Mutación R1205H, A502V, G686C	50-80 años	Parkinsonismo típico con respuesta a L-dopa	[84, 85]
<b>PARK19/DN</b> AJC6(1p32)	AR	Mutación Q734X	10-20 años.	Parkinsonismo típico. Algunos pacientes muestran retardo metal y convulsiones. Sin respuesta a L-dopa	[86, 87]
<b>PARK20/SYN</b> J1 (21q22.11)	AR	Mutación sin sentido R258Q	20 años	Parkinsonismo típico con respuesta a L-dopa con disquinesias secundarias	[88, 89]
<b>PARK21/DN</b> AJC13 (3q22.1)	AD	Mutación sin sentido N855S	67 años	Parkinsonismo típico con respuesta a L-dopa. Un paciente mostró signos de demencia en estadios avanzados de la enfermedad	[90-92]

AD (autosómica dominante), AR (autosómica recesiva), ND (No definida). Tomado y actualizado de [93]

Por lo cual se ha sugerido un modelo patogénico de función celular de estas proteínas, apoyado por estudios en modelos celulares y animales, en el cual la ganancia de función tóxica de las proteínas  $\alpha$ -sinucleína y LRRK2 (del inglés, *leucine-rich repeat kinase*) favorecen la disfunción celular promoviendo la agregación de proteínas y la subsiguiente muerte neuronal, y donde las proteínas Parkin, DJ-1 y PINK1 (del inglés, *PTEN induced putative kinase 1*) actúan como elementos neuroprotectores en vías de supervivencia neuronal que se pierden en la EP [94].

Es así, que dentro de las estrategias neuroprotectoras usadas en EP se encuentra la utilización de factores de crecimiento [95, 96]; sin embargo, éstos sólo generan una protección temporal, posiblemente debido al desconocimiento de muchos de los eventos celulares y moleculares que subyacen en dichos procesos. Recientemente, se han empezado a esclarecer estos mecanismos y la evidencia empieza a converger en vías de señalización intracelular implicadas en supervivencia celular y función mitocondrial, de manera que la comprensión de los procesos de regulación de estas vías podría facilitar la creación de fármacos con el fin de potenciar la viabilidad de una población celular específica [93].

## 2.2 PINK1

El gen *PINK1* humano se localiza en el cromosoma 1 (1p35-36), tiene 8 exones y abarca 1,8 kb. Fue descubierto por Unoki en el año 2001 [97], y en el año 2004 se identificó como el tercer gen (PARK6) asociado a EP juvenil de herencia autosómica recesiva [48]. Se han identificado más de 100 mutaciones homocigotas asociadas a EP familiar y se han anotado muchas mutaciones heterocigotas en pacientes con EP de inicio tardío, sin un componente familiar definido; sugiriendo un posible papel de estas mutaciones como factor de riesgo de EP (revisado en [98-100]).

Desde el punto de vista filogenético PINK1 es una proteína altamente conservada, reportándose ortólogos en nematodos, artrópodos y cordatas. Dentro de los mamíferos, los ortólogos de PINK1 conservan una identidad entre el 75%-85% [101]. El gen *PINK1* codifica para la proteína PINK1, una serina treonina quinasa de 581 aminoácidos que contiene en su extremo amino terminal (N-t) una secuencia de localización mitocondrial denominada MTS (del inglés, *Matrix targeting sequence*), seguido de un dominio transmembrana TM (del inglés, *transmembrane domain*) y un dominio quinasa [102]. Inicialmente la expresión de PINK1 se asoció a fosfatasa y homólogos del gen de la tensina (*Pten*) [97], sin embargo actualmente se conoce que FOXO3a regula positivamente la transcripción del gen *PINK1* [103].

En humanos PINK1 se expresa ampliamente en el hígado y tejidos epiteliales como glándula mamaria, glándula suprarrenal, páncreas, próstata, estómago, intestinos, hipófisis, túbulos renales, no se expresa en la vejiga ni en la epidermis; también es expresada en el sistema nervioso central en mayor proporción en la sustancia gris; por otro lado se conoce que su expresión es menor en los tejidos de origen mesenquimal; adicionalmente muestra un patrón diferente de expresión en tejidos neoplásicos [104].

### 2.2.1 Localización subcelular de PINK1

PINK1 se transcribe en el núcleo y va al citoplasma, se traduce y es importada a la mitocondria a través de su MTS. La localización subcelular de PINK1 muestra un modelo dual entre mitocondria y citoplasma. Tal patrón depende de procesamientos postraduccionales de PINK1 [105, 106]. En este sentido, se sabe que la secuencia MTS de la proteína, es suficiente para que PINK1 vaya a la mitocondria [107] y se inserte en la membrana interna mitocondrial (MIM) mediante su importación a través del complejo de proteínas TOM20/TIM23 [108]. Adicionalmente PINK1 se ha encontrado en el espacio intermembranal (EIM) [109]. Sin embargo, aún no se ha determinado el papel que desempeña PINK1 en estas localizaciones, pero posiblemente está relacionada con función o estabilidad de complejos de la cadena respiratoria ya que forma homodímeros, que migran junto a estos complejos en gradientes de sucrosa [110].

También se ha demostrado que cuando la mitocondria está desacoplada, PINK1 se establece en la membrana externa mitocondrial (MEM), con el dominio quinasa ubicado en el lado citoplasmático [111, 112], donde tal localización depende de la presencia del dominio TM. Es en esta ubicación y bajo tales condiciones que PINK1 puede reclutar a Parkin para que esta induzca mitofagia como un mecanismo protector [107, 106].

Lo que parece ocurrir es que en condiciones donde la mitocondria está acoplada, PINK1 (de tamaño completo, 63 kD) se inserta en la MIM mediante su importación a través del complejo mitocondrial TOM20/TIM23 [108]. Posteriormente ocurre el clivaje del dominio MTS por un mecanismo de procesamiento proteolítico llevado a cabo por la peptidasa de procesamiento mitocondrial MPP (del inglés, *mitochondrial processing peptidase*) y se genera una forma clivada de PINK1 de aproximadamente 60 kD; luego la proteasa PARL (del inglés, *presenilin-associated rhomboid-like protein*) cliva a PINK1 entre la A103 y la F104, el resultado es un fragmento de aproximadamente 53 kD de 104 aminoácidos con un residuo fenilalanina en el extremo N-t [105, 106]. El residuo fenilalanina del N-t es reconocido por enzimas E3 específicas (UBR1, UBR2 y UBR4) es decir actúa como una señal de degradación de la vía *N-end rule pathway* [113]. Finalmente PINK1 se degradada vía UPS [114, 107, 115].

Por el contrario la disipación del  $\Delta\Psi_m$  impide la translocación PINK1 a la MIM a través del dominio MTS cargado positivamente. De esta manera se previene la exposición del residuo clave (fenilalanina 104) para su degradación proteosomal y PINK1 de 63 kDa, se establece en la MEM [111], tal localización depende de una región que se encuentra entre el dominio MTS y el TM (entre los residuos 74 y 94) la cual funciona como una señal alternativa de localización en la MEM que además puede estar involucrada en interacciones con el complejo TOM [116]; es en esta localización y bajo tales condiciones que PINK1 se dimeriza y autofosforila en los residuos S228 y S402 [117]. Estos sitios de autofosforilación son críticos para la función de PINK1 en mitofagia ya que potencian la habilidad de PINK1 para fosforilar a Parkin y Ub [118], y así poder reclutar a Parkin [107, 106, 111, 119].

Ahora bien, el mecanismo molecular que regula la retención de PINK1 en la MEM de mitocondrias despolarizadas no se ha resuelto de manera concluyente [116]. Por otro lado, para que PINK1 se localiza en el citosol, una vez esté en la MEM, la chaperona Hsp90 debe interactuar con el dominio quinasa y debe ocurrir un clivaje en algún sitio cercano al dominio TM [107] que aún no se conoce. A la fecha, no son claras las diferencias en cuanto a la función de las diversas isoformas de PINK1, pero PINK1 citosólico se asocia con supervivencia y diferenciación neuronal [120, 121].

## 2.2.2 Blancos de PINK1

La función de PINK1 se relaciona con la regulación de actividad de diversas proteínas involucradas en diferentes procesos moleculares como: metabolismo energético, señalización celular, dinámica mitocondrial, mitofagia, estrés oxidativo, plasticidad neuronal entre otros; de esta forma contribuye activamente en la homeostasis celular. Esta regulación puede ser directa o indirecta dependiendo de las proteínas que fosforile.

Se conocen algunas proteínas blanco de fosforilación de PINK1, como:

- TRAP1 (del inglés, *TNF-associated protein 1*), una chaperona mitocondrial conocida también como proteína 75 de choque térmico (Hsp75) [122].
- Rictor, cuya fosforilación determina la activación del complejo mTORC2 [123]. mTORC2 activa AKT
- HtrA2/OMI, donde PINK1 modula sus niveles de fosforilación en la S142, dependiente de p38 [124].
- Miro, proteína involucrada en el transporte de mitocondrias por la red de microtúbulos, de esta forma puede modular el tráfico mitocondrial [112, 125].
- Ub y Parkin en la S65, para regular la mitofagia [126, 127].

Adicionalmente PINK1 puede formar complejos con proteínas de la cadena respiratoria [110, 128], así como con las proteínas Parkin y DJ-1 [129]. Recientemente se publicó un estudio del proteoma y fosfoproteoma de ratones de 6 meses PINK1(-/-) y PINK1 (+/+), donde se encontraron 29 proteínas con expresión diferencial o niveles de fosforilación alterados, lo cual sugiere la participación de PINK1 en la regulación de vías de metabólicas, de señalización, proteostasis, plasticidad y estructura neuronal; cuyas alteraciones están involucradas en la patogénesis de la EP familiar [130].

### 2.2.3 Función neuroprotectora de PINK1

La función neuroprotectora de PINK1 se conoce principalmente con base en experimentos que demuestran una mayor susceptibilidad de muerte neuronal en modelos celulares donde PINK1 se encuentra silenciado, ausente, o mutado. Es así que neuronas deficientes de PINK1 muestran: (1) Niveles superiores de radicales libres asociados a un menor nivel de glutatión [131]. (2) Mayor susceptibilidad a Rotenona y MPP+ (1-metil-4-fenil piridina) [132]. (3) Menor potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ) [133], que se relaciona con una disminución en el consumo de oxígeno, que concluye con una deficiencia en la síntesis de ATP [110]. (4) Deterioro proteosomal y agregación de  $\alpha$ -sinucleína [110] y (5) alteraciones en la morfología mitocondrial caracterizadas por aumento en la fragmentación mitocondrial [134].

Adicionalmente se ha observado que la sobre-expresión de PINK1 protege contra la muerte celular inducida por estrés oxidativo dependiente de estaurosporina [131, 135], rotenona [136, 123], MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina) [137]; peróxido de hidrógeno, cisplatina, tunicamicina y cloruro de cadmio [123]. Sin embargo, los mecanismos exactos de pérdida del potencial de membrana mitocondrial, y la base de la sensibilidad a la apoptosis producto de la deficiencia de PINK1, no están del todo claros; pero aproximaciones experimentales indican que se relacionan con una alteración del complejo I mitocondrial [138] o con un desbalance de la homeostasis del calcio mitocondrial, donde la pérdida de la función de PINK1 resulta en una sobrecarga de calcio mitocondrial y disminución de la capacidad de tolerancia a calcio por las mitocondrias [139].

En este sentido, Gandhi reporta que los cambios en la concentración de calcio mitocondrial dependientes de PINK1, se deben a un defecto en el funcionamiento del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ , que es incapaz de restablecer los niveles de calcio mitocondrial [139]. Posiblemente PINK1 también esté regulando el ingreso de calcio a la mitocondria vía MCU (del inglés, *Mitochondrial calcium uniporter*) ya que daños neuronales asociados a mutaciones en PINK1 son rescatados por el boqueador específico de MCU, rojo rutenio [140].

Por otro lado existe evidencia experimental que demuestra la relación de PINK1 y la dinámica mitocondrial. La carencia de PINK1 se relaciona con un incremento en la fragmentación mitocondrial [134] y este fenotipo se ha asociado a neurodegeneración [141]. Sin embargo, son muchas las contradicciones relacionadas con la intervención de PINK1 en el proceso de dinámica mitocondrial.

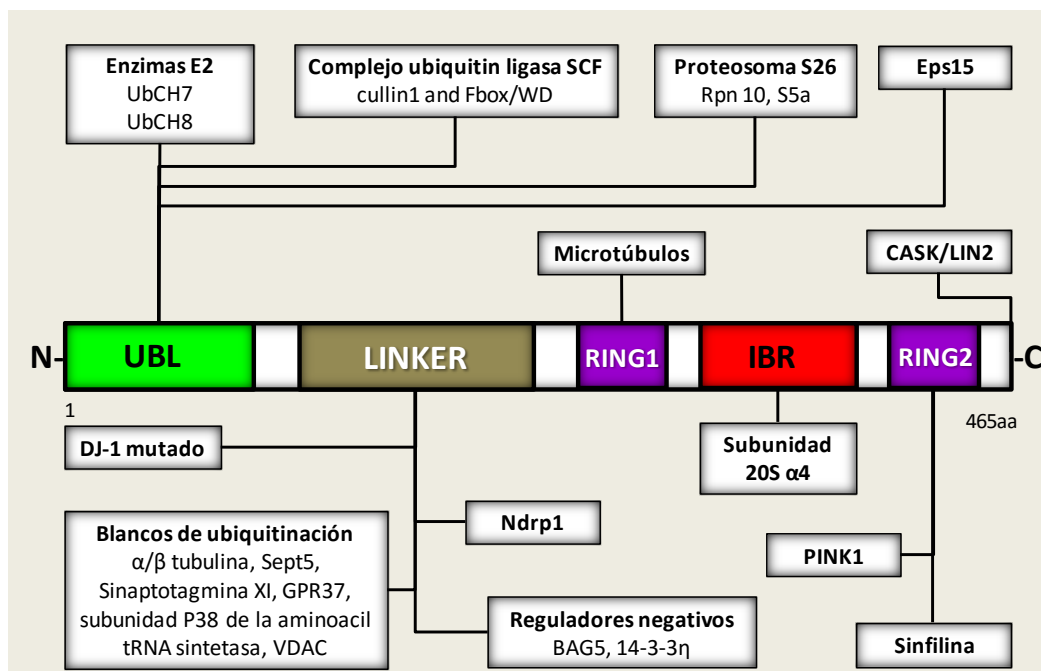
## 2.3 Parkin

En el año 1998 varios autores, entre ellos Jones [142], Leroy [143], Kitada [144] y Hattori [144], encontraron que diferentes mutaciones en *Parkin* causaban EP juvenil asociada a herencia autosómica recesiva (AR). El análisis de ligamiento genético localizó este gen en el cromosoma 6 (6q25.2-27) [145]. Posteriormente, en el año 2000 se definió que este parkinsonismo era debido a la disfunción en Parkin, una E3 ubiquitin ligasa [146-148] de 465 aminoácidos, cuya estructura se constituye por un dominio de homología a la ubiquitina (UBL del inglés *ubiquitin-like*) en su N-t, un dominio específico de Parkin denominado *linker*, ubicado en la región central y dos dominios *RING* (del inglés, *Really Interesting New Gene*) (RING1, RING2) en su extremo carboxi terminal (C-t), separados por un dominio IBR (del inglés, *in-between ring*) [149].

La expresión de *Parkin* por análisis de *Northern blot* ha sido detectada en cerebro, corazón, hígado, músculo esquelético, riñón y testículo de ratón, la cual se hace evidente desde el día quince del desarrollo embrionario, aumentando en la última etapa del desarrollo murino [150]. Subcelularmente, Parkin muestra un patrón dinámico de localización, predominando en el citoplasma y con capacidad de trasladarse al núcleo [151, 152] y la MEM [115]. En el citoplasma Parkin mantiene una conformación inactiva (de auto-inhibición) que está dada por un dominio represor (REP del inglés, *repressor element of the Parkin*) que obstruye el dominio RING1 previniendo la transferencia de Ub por desde la enzima E2 (conjugación de Ub); adicionalmente existe una interacción entre RING0 y RING2 que bloquea el acceso al sitio catalítico alrededor de la C431. En este sentido, mutaciones que eliminan estas interacciones (W403A, F463A, F146A o delección de RING0) llevan a una activación constitutiva de Parkin que se traduce a un aumento dramático de auto-ubiquitinación y una acelerada acumulación sobre mitocondrias despolarizadas (revisado en [153]).

Parkin puede interactuar de forma directa con varias proteínas (ver figura 2.1) y tales interacciones han llevado a dilucidar las posibles funciones y blancos de acción de Parkin, así como algunos aspectos de su regulación, lo que ha favorecido la comprensión de los mecanismos moleculares asociados a su patogénesis.





**Figura 2. 1 Interacciones proteína-proteína de Parkin**

A través del dominio UBL, Parkin interactúa con una variedad de proteínas relacionadas con el SUP, como las enzimas de conjugación de ubiquitina E2 UbCH7 y UbCH8 [146, 148]; las proteínas cullin1 y FBOX/WD que forman parte del complejo ubiquitin ligasa SCF. Adicionalmente a través del dominio IBR puede asociarse a la subunidad 20S de proteosoma [154]. También se han identificado una amplia variedad de sustratos de ubiquitinación como  $\alpha/\beta$  tubulina [155], septina 5 (proteína de unión a nucleótidos implicados en la regulación de la organización del citoesqueleto [148], sinaptotagmina XI [156], GPR37 (del inglés, G-protein coupled receptor 37) [157], la subunidad p38 del complejo aminoacil-tRNA sintetasa [158] y VDAC (del inglés, *voltage dependent anion channel*) [159]. También, CASK, una serin quinasa dependiente de calcio/cadmodulina se asocia mediante su dominio PDZ al extremo c-t de Parkin para favorecer su localización en la sinapsis [160]. A través del dominio RING2, Parkin se asocia a sinfilina (una proteína de unión a alfa sinucleína importante en la formación de cuerpos de Lewy) [161], y a PINK1 (del inglés, *PTEN-induced putative kinase 1*) [162]. Por otra parte, las interacciones de BAG5 (del inglés, *BCL2-associated athanogene 5*) [163] y 14-3-3 $\eta$  [36] con el dominio LINKER regulan de forma negativa la actividad ubiquitina de Parkin. DJ-1 mutado (PARK7) se asocia con Parkin, lo que resulta en la inhibición de su actividad ubiquitina ligasa [164]. Además, Parkin es sustrato de Ndrp1 (del inglés, *neuregulin receptor degradation protein-1*) otra E3 ubiquitin ligasa que favorece su degradación [165].

### 2.3.1 Función neuroprotectora de Parkin

En general la función de Parkin se relaciona con neuroprotección ya que: (1) Se ha demostrado experimentalmente que es capaz de proteger neuronas de muerte celular inducida por estrés de proteínas mal plegadas [147], pues tiene como sustratos de ubiquitinación, neurotóxicos intrínsecos con propiedades de agregación como formas mutadas y o-glicosiladas de  $\alpha$ -sinucleína [166, 167]. (2) Protege contra el estrés oxidativo ya que su sobre-expresión se relaciona con una disminución de proteínas con grupos carbonilos y proteínas nitrosiladas y un aumento de la actividad proteosomal [168]. (3)

Protege a la mitocondria del efecto tóxico de la ceramida, al impedir la ruptura de la MEM y subsecuente liberación de citocromo c y activación de caspasa 3 [158]. (4) Parkin es capaz de regular positivamente la vía de supervivencia PI3K/Akt mediada por la activación del EGFR (del inglés, *epidermal growth factor receptor*) al favorecer la degradación de EPS15 una proteína adaptadora relacionada con la endocitosis de EGFR [169]. (5) Se ha identificado como un represor transcripcional de p53. Estudios realizados en neuronas y fibroblastos de ratón mostraron que la sobre-expresión de Parkin silvestre protege a las células de una variedad de estímulos pro-apoptóticos, inhibe la activación de la caspasa-3, en una forma dependiente de p53 [170]. (6) En general, sus efectos neuroprotectores se han relacionado con su acción sobre la mitocondria. Los últimos hallazgos señalan que Parkin es reclutado a mitocondrias disfuncionales marcándolas para autofagia por ubiquitinación de VDAC (del inglés, *voltage dependent anion channel*) y posterior reclutamiento de p62, un receptor de autofagia [159]. Alternativamente, por ubiquitinación de mitofusina se favorece la fragmentación mitocondrial que es el paso inicial en el proceso de mitofagia [171]. También se ha documentado su relación con otras proteínas como PINK1 y DJ1 en la regulación de la actividad y modulación de procesos de dinámica mitocondrial [172], por medio de la unión a proteínas como las mitofusinas [173]. Recientemente se conoce que otra proteína involucrada en EP de origen familiar (UCHL1) es ubiquitinada por Parkin [174].

## 2.4 Ceramida como neurotóxico

Las ceramidas (N-acetil-esfingosina) hacen parte de un grupo de segundos mensajeros lipídicos basados en esfingomielina [175], su síntesis es estimulada por señales de estrés [176], y están relacionadas con procesos de muerte celular [177-182].

El uso de la C2-ceramida simula el efecto de la ceramida, y se ha propuesto como un camino putativo de muerte neuronal en EP [16], y como una toxina endógena de neuronas dopaminérgicas [183].

Su efecto está asociado a desfosforilación de AKT y la consecuente inhibición de mediadores antiapoptóticos como Bcl-2 y Bcl-xL [22]. También, se ha demostrado que induce muerte celular por alteración de la función mitocondrial, incluyendo generación de radicales libres, formación directa de poros sobre la membrana mitocondrial [184, 185], alteración en la homeóstasis del calcio, colapso del  $\Delta\psi_m$ , liberación de citocromo c [175, 176], e inhibición de los complejos I y III de la cadena respiratoria [186, 187].

Adicionalmente se reconoce a la ceramida como un inductor de autofagia (AFG). Por un lado se conoce que activa la fosfatasa PP2A (del inglés, *Protein phosphatase 2A*), lo cual bloquea la activación de AKT y suprime la inhibición de la AFG mediada por mTOR [188-190]. Adicionalmente, disminuye la expresión de transportadores de aminoácidos y de nutrientes, induciendo una condición de privación de nutrientes y llevando a AFG dependiente de AMPK [191-193]. Específicamente el tratamiento con C2C potencia la expresión de Beclin-1, al parecer por la activación de JNK y c-Jun un factor de transcripción que regula la expresión de Beclin1 [194] (revisado en [195] y referencias allí citadas). Por otra parte C18-Ceramida se localiza en la MEM y actúa como un receptor de LC3-II e induce mitofagia, sin embargo el mecanismo por el cual esta especie de ceramida se localiza sobre la mitocondria, es desconocido [196].

Todo lo anterior hace de la C2-ceramida un excelente neurotóxico útil para el estudio de efectos neuropatológicos y neuroprotectores.



## 3. Capítulo 3: Materiales y métodos

### 3.1 Materiales

#### 3.1.1 Equipos

Tabla 3.1 Equipos especializados

Equipo	Proveedor
Cabina de seguridad biológica clase II tipo a	Labgard ES Energy Saver Class II, Type A2 Laminar Flow Biological Safety Cabinet Models NU-425-300 NUAIRE
Cámara de electroforesis	Mini-Protean-III Cell, Bio-Rad Laboratories
Citómetro de flujo	Attune Flow Cytometry, Applied Biosystems Inc
Citómetro de flujo	BD FACSAria II BD Biosciences
Espectrofotómetro	NanoDrop ND-2000 Thermo Scientific <u>Software:</u> NanoDrop 2000 / 2000c Software
Fluorómetro	Twinkle LB 970 Microplate Fluorometer. BERTHOLD Technologies <u>Filtros de excitación:</u> 355 nm, 485 nm y 540 nm <u>Filtros de emisión:</u> 460 nm, 535 nm y 600 nm
Incubadora de CO <sub>2</sub>	AutoFlow NU-8500 Water Jacket CO <sub>2</sub> Incubator
Lector de microplacas	Sunrise™ Absorbance Reader. Tecan <u>Software:</u> Magellan
Light Cycler 4.1	RT-PCR Roche Molecular Biochemicals
Microscopio Confocal Leica	<u>Microscopio:</u> Leica DM IRE2, Leica <u>Unidad confocal:</u> Leica TCS SP2 AOBS confocal point scanner. <u>Objetivo:</u> Plan Apo 63X / 1,4 Ph3 Oil immersion <u>Láser:</u> Ar/Kr (488nm, 514nm), HeNe (543nm, 594nm, 633nm) <u>Filtros de emisión:</u> I3, blue exc. (BP 450-490, LP515); N 2.1, green exc. (BP 515-560, LP590); A, UV exc. (BP 340-380, LP425) <u>Software:</u> Leica LCS, Leica

**Tabla 3.1** (continuación)

Microscopio Confocal Nikon	<u>Microscopio:</u> Nikon eclipse ti C1 plus <u>Lámpara de fluorescencia:</u> Halogen lamp 12 uv-100 <u>Filtros de fluorescencia:</u> C-fl uv-2e/c DAPI. C-fl b-2e/c fitc. C-fl tritc hyq. <u>Cámara:</u> w l.l. c-lhgf i hg intensy light lamp. DS Cooled Camera Head DS-Qi1Mc/DS-5Mc/DS-2MBWc/DS-Ri1. <u>Unidad confocal:</u> C1si spectral imaging system <u>Objetivo:</u> Plan Apo VC 60.x/1,40/wd 0,13 Oil PFS <u>Láser:</u> S-P 50 MW multiline Argon-ion. Diode laser 17 MW (408 nm). MG G HeNe (543 nm) pol laser. Diode laser 10 MW (638 nm) <u>Filtros de emisión:</u> C1 ET emission set for 408. C1 ET emission set for 457/514. C1 1stdm 405/488/543/640 <u>Software:</u> Nikon EZ-C1, Nikon
Microscopio Live Cell Spining Disk	<u>Microscopio:</u> Axiovert 200M, Zeiss <u>Unidad:</u> Spinning Disk CSU22 <u>Objetivo:</u> Plan Apo 63X / 1,4 Ph3 Oil immersion <u>Láser:</u> Colbot Calypso CW 491nm, Cobolt Jive 561nm <u>Filtros de emision:</u> ET 525/50 (green), ET 620/60 (red), Chroma Technology <u>Cámara:</u> EM-CCD C9100-02 <u>Software:</u> Volocity, Perkin Elmer
Sistema de documentación de imágenes	ChemiDoc™MP System Bio-Rad Laboratories Laboratories <u>Software:</u> Image Lab Bio-Rad Laboratories
Sonicador	Qsonica 500 Watt Sonicator

### 3.1.2 Materiales de laboratorio y desechables

**Tabla 3.2 Materiales de laboratorio y desechables**

Material	Proveedor
Tubos cónicos de 15 y 50 ml Frascos de cultivo 25 y 75 cm <sup>2</sup> , platos de cultivo 6, 12, 24, 96 pozos	Varios (Biologix, SPL, TPP, Greiner, Scientific)
Tubos eppendorf 0,2; 0,5;1,5 y 2 ml	Eppendorf
Películas de revelado	Amersham Hyperfilm ECL
Membranas de nitrocelulosa	GE Healthcare Life Sciences Hybond™ ECL
Membranas de PDVF	GE Healthcare Life Sciences Hybond™ ECL

### 3.1.3 Reactivos químicos y antibióticos

**Tabla 3.3 Reactivos químicos y antibióticos**

Reactivos	Uso	Fabricante	Referencia
Ampicilina	Selección de bacterias	Sigma-Aldrich	A9518
Blasticidina	Selección células eucariotas	InvivoGen	ant-bl-1
<i>Buffer</i> Laemmli 2x	Western blot	Bio Rad	1610737
<i>Buffer</i> Laemmli 4x	Western blot	Bio Rad	1610747
<i>Buffer</i> Ripa	Solución de lisis celular	Sigma-Aldrich	R0278
C2-Ceramida	Neurotóxico	Sigma	A7191
Complete Mini Cocktail tablets	Inhibidor de proteasas	Roche	04693159002
Kanamicia	Selección de bacterias	Sigma-Aldrich	K1377
Matrigel	Tratamiento de material de cultivo para adhesión de cultivos de células CAD	Sigma-Aldrich	E1270
MTT	Ensayos de viabilidad celular	Sigma-Aldrich	M5655
Penicilina/Estreptomina	Cultivo de células eucariotas	Gibco	16000-044
PhosStop Cocktail tablets	Inhibidor de fosfatasas	Roche	04906837001
Poli D lisina	Tratamiento de material de cultivo para adhesión de cultivos de células CAD	Sigma	P7405
Poli L lisina	Tratamiento de material de cultivo para adhesión de neuronas primarias y células SHSY5Y	Sigma	P4707
Puromicina	Selección células eucariotas	Sigma-Aldrich	P8833
Solución 30% Acrilamida-Bisacrilamida	<i>Western</i> blot	Bio Rad	1610158
Tripsina	Desprendimiento de células adherente	Lonza	CC-5012

### 3.1.4 Kits

**Tabla 3.4 Kits**

Kit	Uso	Fabricante	Referencia
Alexa Fluor® 488 annexin V/Dead Cell Apoptosis Kit with for Flow Cytometry	Ensayos de muerte celular (apoptosis-necrosis) por citometría de flujo	Invitrogen	V13245
CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay	Medición de liberación de LDH	Promega	G1782
Lipofectamine 2000	Transfección celular	Invitrogen	11668-019
Lipofectamine LTX Reagent with PLUS Reagent	Transfección celular	Invitrogen	15338-100
MitoProbe™ JC-1 Assay Kit for Flow Cytometry	Estimación del $\Delta\Psi_m$	Invitrogen	M34152
Novex ECL Chemiluminescent Substrate Reagent Kit	Revelar western blot	Invitrogen	WP20005
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Cuantificación de proteínas	Thermo Fisher Scientific	23225
SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR	RT-PCR	Invitrogen	18080-051
Zyppy™ Plasmid Midiprep Kit	Purificación de DNA plasmídico	Zymo Research	D4026
PureYield™ Midiprep System Promega	Purificación de DNA plasmídico	Promega	A2495

### 3.1.5 Marcadores

**Tabla 3.5 Marcadores**

Marcadores	Uso	Fabricante	Referencia
MitoTracker® Green FM	Marcaje de mitocondrias en células vivas	Invitrogen	M7514
MitoTracker® Red CMXRos	Marcaje de mitocondrias en células fijadas	Invitrogen	M7514
Monodansil cadaverina	Marcaje de autofagolisosomas	Sigma Aldrich	30432



**Tabla 3.5** (continuación)

Hoescht 33342	Marcaje de núcleo	Thermo Fisher Scientific	H3570
Trypan Blue	Marcaje de células muertas	Sigma Aldrich	T8154
Azul de Coomassie	Tinción de geles de poliacrilamida	Bio Rad	1610686
Ponceau	Tinción de membranas de nitrocelulosa y de PVDF	Sigma Aldrich	P7170
CytoPainter Phalloidin-iFluor 488 Reagent	Faloidina, marcador de Actina F usado para microscopía	Abcam	Ab176753
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 10 to 250 kDa	Marcador de peso de proteínas usado en <i>western blot</i>	Thermo Fisher Scientific.	26619

### 3.1.6 Medios de cultivo

**Tabla 3.6 Medios de cultivo de células eucariotas**

Medio de cultivo	Fabricante	Referencia
DMEM high glucose	Lonza	12-614Q
DMEM Media - No Glucose	Gibco	11966-025
DMEM-F12	Lonza	12-719Q
OptiMEM	Gibco	31985-070
PNBM Primary Neuron Basal Medium BulletKit	Lonza	CC3256/ CC-4462
Suero fetal bovino. Certificado	Gibco	16000-044

### 3.1.7 Medios de cultivo de bacterias

Tabla 3.7 Medios de cultivo de células de bacterias

Medio de cultivo	Preparación
LB líquido	<b>Para 1 litro:</b> 10 g de Bacto® triptona, 5 g de Bacto® extracto de levadura, 5 g de NaCl. Disolver en 800 ml de H <sub>2</sub> O dd, ajustar a pH 7.0 con NaOH, completar a 1 l con H <sub>2</sub> O dd. Esterilizar con calor húmedo en autoclave. La adición del antibiótico se debe hacer, luego de esterilizada la solución y a una temperatura inferior a 50°C.
LB sólido	<b>Para 1 litro:</b> 10 g de Bacto® triptona, 5 g de Bacto® extracto de levadura, 5 g de NaCl y 15 g de Bacto® agar. Disolver todo menos el agar en 800 ml de H <sub>2</sub> O dd, ajustar a pH 7.0 con NaOH, adicionar los 15 g de agar y completar a 1 l con H <sub>2</sub> O dd. Esterilizar con calor húmedo en autoclave. Después de esterilizar se deja enfriar hasta 50°C y bajo condiciones de esterilidad se sirve en cajas de Petri estériles, aproximadamente 30 mL para cajas de 85 mm, luego de gelificado, las cajas se tapan y se guardan a 4°C hasta el momento de su uso, las cajas pueden permanecer almacenadas a 4°C hasta por un mes y a temperatura ambiente una semana. La adición del antibiótico se debe hacer, luego de esterilizada la solución, a una temperatura inferior a 50°C, justo antes de llenar las cajas de Petri.
SOC	<b>Para 100 ml:</b> 2 g de Bacto® triptona, 0,5 g de Bacto® extracto de levadura, 1 ml de NaCl 1M, 0,25 ml de KCl 1M, 1 ml de Mg+2 2M, 1 ml de glucosa 2M. Adicionar la triptona, el extracto de levadura, el NaCl y KCl a 97 ml de H <sub>2</sub> O dd, agitar hasta disolver, esterilizar en autoclave y enfriar hasta temperatura ambiente. En cabina, adicionar la solución stock de 2M Mg+2 y la solución de 2M glucosa. Almacenar a 4°C hasta el momento de su uso.

### 3.1.8 Plásmidos

Tabla 3.8 Plásmidos

Nombre	Producto de expresión	Resistencia	Referencia
EGFP-LC3	LC3 (humano) con EGFP	Kanamicina	[197](Addgene #11546)
ptf-LC3	LC3 (rata) con EGFP y mRFP	Kanamicina	[198] (Addgene #21074)
pcDNA3.1 V5/HIS Parkin WT	Parkin (humano)	Ampicilina	El plásmido fue donado por el Dr Mark Cookson

## Capítulo 3: Materiales y métodos

**Tabla 3.8** (continuación)

pcDNA 3.1 empty vector	Vector vacío	Ampicilina	El plásmido fue donado por el Dr Mark Cookson
PINK1 shRNA (m)	3 a 5 secuencias de shRNAs específicos para bloquear la expresión de PINK1 de ratón (corresponden a secuencias de 19-25 nt)	Puromicina	Santa Cruz Biotechnology sc-44599-SH
Parkin shRNA	3 a 5 secuencias de shRNAs específicos para bloquear la expresión de Parkin de ratón (corresponden a secuencias de 19-25 nt)	Puromicina	Santa Cruz Biotechnology sc-42159-SH
Control shRNA plasmid A	Secuencia <i>scrambled</i>	Puromicina	Santa Cruz Biotechnology sc-108060-SH
pLenti6 PINK1 shRNA (A)	Secuencia de shRNA específica para bloquear la expresión de PINK1 humano (GCTGGAGGAGTATCTGATAGG) empezando desde el nt 550	Ampicilina Blasticidina	[136]
pLenti6 PINK1 shRNA (C)	Secuencia de shRNA específica para bloquear la expresión de PINK1 humano (GCTGGAGGAGTATCTGATAGG) empezando desde el nt 1411	Ampicilina Blasticidina	[136]
pLenti6 Control (C1) shRNA	Secuencia de shRNA (5'-CCTAGACGCGATAGTATGGAC)	Ampicilina Blasticidina	[136]
pLenti6 Control (C2) shRNA	Secuencia de shRNA <i>scrambled</i>	Ampicilina Blasticidina	El plásmido fue donado por el Dr Mark Cookson

### 3.1.9 Anticuerpos

**Tabla 3.9** Anticuerpos primarios

Anticuerpos primarios	Animal de obtención	Fabricante	Referencia	Dilución / <i>buffer</i>
AMPK $\alpha$ (23A3)	Conejo	Cell Signaling Technology	2603	<b>WB:</b> 1:1000 / BSA 1% en TTBS 1X
AMPK $\beta$ 1:2 (57C12)	Conejo	Cell Signaling Technology	4150	<b>WB:</b> 1:1000 / BSA 1% en TTBS 1X
Erk 1:2	Conejo	Cell Signaling Technology	9102S	<b>WB:</b> 1:1000 / leche 5% en TTBS 1X

Efecto del silenciamiento de los genes *PINK1* y *Parkin* sobre la dinámica y autofagia mitocondrial en un modelo de neuronas dopaminérgicas

**Tabla 3.9** (continuación)

FIS1	Conejo	Santa Cruz Biotechnology	sc-98900	<b>WB:</b> 1:500 / leche 5% en TTBS 1X
HK	Ratón	Abcam	Ab55144	<b>WB:</b> 1:1000 / leche 5% en TTBS 1X
IGF1 Receptor $\beta$ (111A9)	Conejo	Cell Signaling Technology	3018	<b>WB:</b> 1:500 / leche 5% en TTBS 1X
LC3	Cabra	Santa Cruz Biotechnology	Sc-16756	<b>WB:</b> 1:500 / leche 5% en TTBS 1X <b>IF:</b> 1:50 / 1% de BSA, 1% de SFB y 0,05% de Tritón X-100 en PBS
MIRO	Conejo	Sigma	AV44817	<b>WB:</b> 1:1000 / BSA 1% en TTBS 1X
MNF	Conejo	Santa Cruz Biotechnology	Sc- 50330	<b>WB:</b> 1:500 / leche 5% en TTBS 1X
mTOR (7C10)	Conejo	Cell Signaling Technology	2983	<b>WB:</b> 1:1000 / leche 5% en TTBS 1X
OPA1	Conejo	Abcam	ab42364	<b>WB:</b> 1:500 / leche 5% en TTBS 1X
p-DRP1 (S637)	Conejo	Cell Signaling Technology	4867	<b>WB:</b> 1:500 / leche 5% en TTBS 1X
p-AMPK $\alpha$ (T172)	Conejo	Cell Signaling Technology	2535	<b>WB:</b> 1:1000 / BSA 1% en TTBS 1X
p-AMPK $\beta$ (S108)	Conejo	Cell Signaling Technology	4181	<b>WB:</b> 1:1000 / BSA 1% en TTBS 1X
Parkin (PRK8)	Ratón	Santa Cruz Biotechnology	sc-32282	<b>WB:</b> 1:250 / leche 5% en TTBS 1X <b>IF:</b> 1:50 / 1% de BSA, 1% de SFB y 0,05% de Tritón X-100 en PBS
P-Erk1:2 (T202:Y204) (D13.14.4E)	Conejo	Cell Signaling Technology	4370	<b>WB:</b> 1:1000 / leche 5% en TTBS 1X
p-GSK-3 $\beta$ (S9) (5B3)	Conejo	Cell Signaling Technology	9323	<b>WB:</b> 1:500 / leche 5% en TTBS 1X
p-IGF1R (Y1161)	Conejo	Santa Cruz Biotechnology	sc-101703	<b>WB:</b> 1:500 / leche 5% en TTBS 1X <b>IF:</b> 1:50 / 1% de BSA, 1% de SFB y 0,05% de Tritón X-100 en PBS
PINK1	Ratón	Abcam	ab75487	<b>WB:</b> 1:500 / leche 5% en TTBS 1X
PINK1	Conejo	Abcam	ab23707	<b>WB:</b> 1:500 / leche 5% en TTBS 1X

### Capítulo 3: Materiales y métodos

**Tabla 3.9** (continuación)

PINK1	Ratón	Cell Signaling Technology	5660	<b>WB:</b> 1:500 / leche 5% en TTBS 1X
p-JNK (T183/Y185)	Conejo	Cell Signaling Technology	4668	<b>WB:</b> 1:1000 / leche 5% en TTBS 1X
p-mTOR (S2448)	Conejo	Cell Signaling Technology	2971	<b>WB:</b> 1:1000 / leche 5% en TTBS 1X
p-p38	Conejo	Cell Signaling Technology	4511	<b>WB:</b> 1:500 / leche 5% en TTBS 1X
p-Rictor (T1135)	Conejo	Cell Signaling Technology	3806	<b>WB:</b> 1:1000 / BSA 1% en TTBS 1X
PSD95	Ratón	Abcam	ab2723	<b>WB:</b> 1:500 / leche 5% en TTBS 1X
Raptor (24C12)	Conejo	Cell Signaling Technology	2280	<b>WB:</b> 1:1000 / BSA 1% en TTBS 1X
Rho GAP 29	Conejo	Abcam	ab85853	<b>WB:</b> 1:1000 / leche 5% en TTBS 1X
Rictor (53A2)	Conejo	Cell Signaling Technology	2114	<b>WB:</b> 1:1000 en BSA 1% en TTBS 1X
ROCKII	Conejo	Abcam	ab137697	<b>WB:</b> 1:1000 / leche 5% en TTBS 1X
Sinapsina 1	Conejo	Abcam	ab64581	<b>WB:</b> 1:500 / leche 5% en TTBS 1X
TOM20	Ratón	Santa Cruz Biotechnology	sc11415	<b>IF:</b> 1:50 / 1% de BSA, 1% de SFB y 0,05% de Tritón X-100 en PBS
VDAC	Ratón	Abcam	ab14734	<b>WB:</b> 1:1000 / leche 5% en TTBS 1X
$\beta$ -Actin–Peroxidase	Ratón	Sigma	A3854	<b>WB:</b> 1:25000 / leche 5% en TTBS 1X
$\beta$ III tubulina	Ratón	Abcam	ab78078	<b>WB:</b> 1:1000 / leche 5% en TTBS 1X

**Tabla 3.10 Anticuerpos secundarios**

Anticuerpos secundarios	Animal de obtención	Reconoce	Fabricante	Referencia	Dilución/ <i>buffer</i>
Alexa Fluor® 488	Cabra	Ratón	Invitrogen	A11001	<b>IF:</b> 1:1000 / 1% de BSA, 1% de SFB y 0,05% de Tritón X-100 en PBS
Alexa Fluor® 488	Cabra	Conejo	Invitrogen	A11008	<b>IF:</b> 1:1000 / 1% de BSA, 1% de SFB y 0,05% de Tritón X-100 en PBS
Alexa Fluor® 568	Cabra	Ratón	Invitrogen	A11004	<b>IF:</b> 1:1000 / 1% de BSA, 1% de SFB y 0,05% de Tritón X-100 en PBS
Alexa Fluor® 568	Cabra	Conejo	Invitrogen	A11011	<b>IF:</b> 1:1000 / 1% de BSA, 1% de SFB y 0,05% de Tritón X-100 en PBS
Alexa Fluor® 568	Burro	Cabra	Invitrogen	A11057	<b>IF:</b> 1:1000 / 1% de BSA, 1% de SFB y 0,05% de Tritón X-100 en PBS
Anti Goat	Burro	Cabra	Santa cruz Biotechnology	sc2020	<b>WB:</b> 1:1000 / leche 5% en TTBS 1X
Anti Mouse	Caballo	Ratón	Cell Signaling Technology	7076S	<b>WB:</b> 1:1000 / leche 5% en TTBS 1X
Anti Rabbit	Cabra	Conejo	Cell Signaling Technology	7074S	<b>WB:</b> 1:1000 / leche 5% en TTBS 1X

### 3.1.10 Programas

**Tabla 3.11 Programas especializados**

Programa	Uso
FlowJo V10 CL	Análisis de citometría de flujo
GraphPad Prism 5	Análisis estadístico de datos y elaboración de gráficas
ImageJ compilación Confocal Uniovi ImageJ. versión 1.51, Image J versión 1.44 e Image J win 64 FIJI	Análisis y procesamiento de imágenes de microscopía y <i>western blot</i>

## 3.2 Métodos

Para el desarrollo del presente proyecto se usaron dos líneas celulares dopaminérgicas, las neuronas murinas CAD, y las neuronas humanas SHSY5Y. Adicionalmente en la última fase de este trabajo se utilizaron cultivos primarios de neuronas hipocampales de ratones C57BL/6.

### 3.2.1 Células CAD

Las células CAD (del inglés *Cath.a-differentiated*) son neuronas dopaminérgicas mesencefálicas murinas. Constituyen una línea celular establecida por Qi *et al* en 1997 [199] derivada de la línea Cath.a (del inglés *CNS catecholaminergic cell line*) que proviene de un tumor murino mesencefálico tirosina hidroxilasa (TH) positivo, de un ratón que expresaba el antígeno T SV40, bajo el control transcripcional de los elementos reguladores de la región promotora del gen de la TH de rata. Las Cath.a expresan β-hidroxilasa dopamina, TH, dopamina y norepinefrina entre otros marcadores neuronales [200-203].

Las células CAD, a diferencia de la línea Cath.a, no tienen el oncogen T SV40 y se diferencian al cultivarlas en medio libre de suero, donde dejan de proliferar y adquieren morfología neuronal con procesos largos y varicosidades [199]. Las CAD producen neurotrofina-3 (NT-3) por lo cual sobreviven en ausencia de factores de crecimiento exógenos al regular su supervivencia de forma autocrina [204].

Las células CAD expresan proteínas neuronales específicas como proteínas de vesículas sinápticas (sinaptofisina, sinaptotagmina), TH, canales de Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> y Ca<sup>+2</sup> dependientes de voltaje, β-tubulina clase III, sintetizan L-dihidroxifenilalanina (L-DOPA), también expresan receptores de Slit, Robo1 y Robo2 involucrados en la señalización asociada a crecimiento axonal y no expresan la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) [202, 205, 206, 199, 207, 208].

#### ▪ Cultivo de células CAD

Las células CAD se cultivaron en medio completo que consistió de DMEM-F12 suplementado con 10% de SFB, 1% de penicilina-estreptomina (P/S) y 2 mM de L-glutamina, siguiendo el protocolo descrito en [209]. Para los diferentes experimentos, las CAD se sembraron sobre material previamente tratado con Matrigel, Poli-D-lisina o Poli-L-lisina, la densidad dependió del tipo de experimento así como del diámetro de la superficie (véase tabla 3.12).

**Tabla 3.12 Referencia de siembra de células CAD según experimento y recipiente**

Experimento	Recipiente	Densidad
Transfección con constructos lentivirales	Cajas de 6 pozos	150.000 células/pozo
Extracción de proteína	Cajas de 6 pozos	180.000 células/pozo
Extracción de proteína	Cajas de 3,5 cm de diámetro	250.000 células/caja
MTT, JC-1 y MDC	Cajas de 96 pozos	7.000 células/pozo
Microscopía de fluorescencia y confocal	Vidriecillos dispuestos en cajas de 24 pozos	20.000 - 25.000 células/pozo
curvas de crecimiento	Cajas de 12 pozos	3.500 células/pozo

#### ▪ Diferenciación de las células CAD

Se siguió el protocolo de diferenciación descrito en [209]. Para lo cual las células CAD se sembraron sobre material previamente tratado con Matrigel, Poli-D-lisina o Poli-L-lisina, a las densidades definidas en la tabla 3.12. Se utilizó medio de diferenciación (DMEM-F12 libre de SFB suplementado con sodio selenita 50 ng/ml, 1 % de P/S y 2 mM de L-glutamina), durante 4 días.

### 3.2.2 Células SHSY5Y

Las células SHSY5Y son el tercer subclon de las células SK-N-SH, las cuales provienen de una biopsia de médula ósea de una paciente con neuroblastoma simpático adrenérgico de origen ganglionar, mantenido en cultivo desde 1970 [210]. Las células SHSY5Y son positivas para tirosina y dopamina- $\beta$ -hidroxilasas, y expresa una o más proteínas de los neurofilamentos; estas células también pueden expresar receptores opioides, muscarínicos y factores de crecimiento nervioso [211]. Además, exhiben propiedades de células madre y su diferenciación se logra tratándolas con ácido retinoico [212].

El cultivo de las células SHSY5Y se realizó sobre material previamente tratado con poli-L-lisina en DMEM-F12 suplementado con 10% de SFB, 1% de glutamax y 1% de P/S. La diferenciación se indujo sustituyendo el medio de cultivo por DMEM-F12, con 5% de SFB, 1% de glutamax, 5  $\mu$ M de ácido retinoico y 1% P/S durante 5 días. El medio se cambiaba día de por medio. Es importante tener en cuenta, que para el proceso de diferenciación las células se deben sembrar entre el 60% y 70% de confluencia.



### 3.2.3 Competencia de bacterias JM109 usando el método de cloruro de calcio

Las bacterias JM109 se hicieron competentes siguiendo el protocolo de cloruro de calcio para lo cual.

- 10 µl del *stock* de bacterias JM109 se crecieron en 30 ml de medio LB a 37 °C (en un tubo cónico de 50 ml) con agitación constante durante toda la noche.
- Al día siguiente se tomó 1 ml del cultivo anterior y se puso a crecer en 500 ml de LB a 37 °C con agitación constante durante 2 h o hasta que la densidad óptica fuera de 0,6.
- Se dividió el cultivo en 2 tubos de 50 ml previamente enfriados, y se colocaron en hielo durante 10 min.
- Se centrifugaron durante 10 min a 4000 rpm a 4 °C.
- Se descartó el sobrenadante y el pellet de cada tubo se resuspendió en 2 ml de una solución de CaCl<sub>2</sub> 50 mM en Tris 10 mM, a 4 °C.
- Se incubaron durante 15 min y luego se centrifugaron 10 min a 4000 rpm a 4 °C.
- Se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 2 ml de la solución de CaCl<sub>2</sub>.
- Luego se hicieron alícuotas de 200 µl que se almacenaron a -70 °C hasta el momento de su uso.

### 3.2.4 Transformación de bacterias competentes

Se utilizó una alícuota (200 µl) de JM109 competentes, por cada plásmido que se amplificó. Durante el desarrollo de este proyecto, se amplificaron los siguientes plásmidos:

- (1) EGFP-LC3
- (2) pcDNA 3.1
- (3) pcDNA3.1 V5/HIS Parkin WT
- (4) pLenti6 Control(C1) shRNA
- (5) pLenti6 Control (C2) shRNA
- (6) pLenti6 PINK1 shRNA A
- (7) pLenti6 PINK1 shRNA C
- (8) ptf-LC3

El procedimiento que se siguió fue el siguiente:

- Se sacó la alícuota de bacterias competentes guardada a -70 °C y se puso en hielo hasta que se descongelara.

- Una vez descongeladas las bacterias, se les adicionaron 50 ng de ADN plasmídico, y se dejaron en reposo durante 30 min (en hielo).
- Luego se pusieron en un baño termostático a 42 °C durante 90 s exactos.
- Inmediatamente se pasaron a un recipiente con hielo durante 2 min.
- Luego se adicionaron 800 µl de medio SOCK y las bacterias se pusieron a 37 °C con agitación durante 45 min para que se recuperaran del choque térmico.
- 200 µl de las bacterias transformadas se plaquearon sobre agar LB+antibiótico de selección (100 ng/ml) específico de cada plásmido.
- Las placas se incubaron de 12 a 16 h máximo, a 37 °C.
- Nota: para este procedimiento es necesario hacer un control positivo en el cual se deben plaquear bacterias no transformadas en agar LB sin ningún antibiótico. Y un control negativo en el cual se siembran bacterias si transformar sobre LB+antibiótico de selección.
- Al día siguiente se revisaron los controles y si estaban bien, se procedió a seleccionar 3 colonias aisladas de la caja plaqueada con las bacterias transformadas.
- La inserción del plásmido se comprobó haciendo un *Toohpick* de 3 colonias por plásmido.
- Luego de comprobado el proceso de transformación, una o dos colonias aisladas se pusieron a crecer en 150 ml de medio LB + antibiótico durante 12 a 16 h máximo, a 37 °C y con agitación.
- Luego de transcurrido ese tiempo, se procedió a realizar la purificación de los plásmidos, siguiendo el protocolo del kit Zyppy™ Plasmid Midiprep Kit o del PureYield™ Midiprep System Promega.
- Los plásmidos purificados se cuantificaron y se conservaron a -70 °C hasta el momento de su uso.

### 3.2.5 Protocolo de transfección usando lipofectamina 2000.

- **Transfección de células CAD con constructos lentivirales**

El silenciamiento de *PINK1* o *Parkin* en el modelo de células CAD se realizó con constructos lentivirales que codificaban para secuencias de shRNA de interferencia, para lo cual:

- Las células CAD se sembraron sobre platos de 6 pozos tratados con poli-D lisina en medio completo, a una densidad de 100.000 células/pozo que correspondió aproximadamente a un 50 % de confluencia.
- Luego de 24 h, se preparaba la mezcla de transfección, las cantidades de lipofectamina, optimen y plásmido se especifican en la tabla 3.13.

- Se prepararon 2 soluciones: (1) La solución A que contenía el ADN plasmídico y ½ del volumen de optimen y (2) la solución B que contenía la lipofectamina y ½ del volumen de optimen.
  - Luego de preparadas se dejaban 5 min a temperatura ambiente, y posteriormente se transfería la solución B en la A y la mezcla se incubaba a temperatura ambiente durante 20 min mientras se formaban los liposomas.
  - Una vez cumplido el tiempo de incubación, la monocapa se lavaba una vez con 400 µl de optimen precalentado a 37 °C.
  - Se adicionada gota a gota la mezcla de transfección, y las células se incubaban durante toda la noche a 37 °C en la incubadora de CO<sub>2</sub>
  - Al día siguiente el volumen del medio se completaba con DMEM-F12 completo durante 48 h.
  - Transcurridas las 48 h se realizaba un cambio de medio y se le adicionaba el antibiótico de selección específico para cada plásmido. La concentración de antibiótico estandarizada fue de 6 µg/ml de Blastidina para las células transfectadas con los plásmidos donados por el Dr Cookson o de 5 µg/ml en el caso de que la transfección se hubiera hecho con los plásmidos comerciales de la casa comercial santa cruz.
  - El proceso de selección duraba 10 días, luego del cual se realizaba la verificación del silenciamiento por *western blot*, midiendo los niveles de mRNA por PCR en tiempo real o por inmunofluorescencia. (véase anexo A)
  - Estas líneas celulares silenciadas fueron denominadas CAD shControl, CAD shPINK1 y CAD shParkin y se utilizaron hasta máximo 5 pasajes luego de los 10 días de selección. Durante el tiempo de cultivo las células permanecieron con el antibiótico de selección, el cual se retiraba al momento de montar los experimentos.
- **Otros constructos**

La transfección de las células CAD shControl, CAD shPINK1 y CAD shParkin con otros constructos, para la expresión de EGFP-LC3, GFP-RFP-LC3 y/o Parkin silvestre, se hizo de la siguiente forma.

- Para los ensayos de microscopía, las células se sembraron en cajas de 24 pozos a una densidad de 20.000 células/pozo en medio de diferenciación.
- Luego de 24 h, se realizó el proceso de transfección; las cantidades de lipofectamina, optimen y plásmido se especifican en la tabla 3.13.
- Igual que para los constructos lentivirales, se prepararon 2 soluciones: (1) La solución A que contenía el ADN plasmídico y ½ del volumen de optimen y (2) la solución B que contenía la lipofectamina y ½ del volumen de optimen, se dejaban 5 min a temperatura ambiente, y posteriormente se mezclaban y se incubaba a temperatura ambiente durante 20 min mientras se formaban los liposomas.

- Una vez cumplido el tiempo de incubación la monocapa se lavaba una vez con 150  $\mu$ l de optimen precalentado a 37 °C.
- Se adicionada gota a gota la mezcla de transfección, y las células se incubaban durante toda la noche a 37 °C en la incubadora de CO<sub>2</sub>
- Al día siguiente el volumen del medio se completaba con DMEM-F12 de diferenciación durante 48 h, y luego se aplicaban los correspondientes tratamientos.

**Tabla 3.13 Especificaciones de las mezclas de transfección**

Plásmido	$\mu$ g de ADN	Lipofectamina	Células	Diámetro del pozo	Volumen final de Optimen
EGFP-LC3	1 $\mu$ g	2,5 $\mu$ l	20.000	1,56 cm	250 $\mu$ l
ptf-LC3	1 $\mu$ g	2,5 $\mu$ l	20.000	1,56 cm	250 $\mu$ l
ptf-LC3+Parkin WT ptf-LC3+ pcDNA 3.1	1 $\mu$ g por plásmido	2,5 $\mu$ l	20.000	1,56 cm	250 $\mu$ l
pcDNA3.1 V5/HIS Parkin WT	2 $\mu$ g	7 $\mu$ l	100.000	3,48 cm	700 $\mu$ l
pcDNA 3.1 empty vector	2 $\mu$ g	7 $\mu$ l	100.000	3,48 cm	700 $\mu$ l
PINK1 shRNA (m)	2 $\mu$ g	7 $\mu$ l	100.000	3,48 cm	700 $\mu$ l
Parkin shRNA	2 $\mu$ g	7 $\mu$ l	100.000	3,48 cm	700 $\mu$ l
Control shRNA plasmid A	2 $\mu$ g	7 $\mu$ l	100.000	3,48 cm	700 $\mu$ l
pLenti6 PINK1 shRNA (A) + (C)	1 $\mu$ g por plásmido	7 $\mu$ l	100.000	3,48 cm	700 $\mu$ l
pLenti6 Control shRNA (C1) + (C2)	1 $\mu$ g por plásmido	7 $\mu$ l	100.000	3,48 cm	700 $\mu$ l

### 3.2.6 Ensayo de MTT

El ensayo de MTT también llamado test de inhibición de la succinato deshidrogenasa, permite inferir la viabilidad celular de forma indirecta. Evalúa la actividad mitocondrial al medir la reducción de la actividad deshidrogenasa mitocondrial a partir de la rotura del anillo de tetrazolio del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5 difeniltetrazolio, reactivo MTT, que genera un producto medible colorimétricamente, denominado sal de formazán. [213, 214]. La metabolización sólo es realizada por parte de células viables mientras que no consiguen metabolizarlo aquellas cuya maquinaria celular se encuentra parada o aquellas que han muerto.

Los cristales de formazán son insolubles en medio acuoso, pero solubles en disolventes orgánicos. Dependiendo del disolvente usado, la longitud de onda de máxima absorción de la sal de formazán varía [213] en este estudio los cristales se disolvieron en DMSO y se midió la absorbancia a 550 nm. La absorbancia de la cantidad de formazán formado es proporcional al número de células proliferantes (metabólicamente activas) [215].

- Para este ensayo las células se sembraron en cajas de 96 pozos con 200  $\mu$ l de medio. Se prepararon como mínimo 3 pozos por cada condición que se quiso medir.
- Tres pozos se utilizaron para calcular el blanco de la técnica, que consistió en células sembradas a la misma densidad que los pozos controles, a las cuales no se les adicionó reactivo de MTT.
- Al momento de hacer la medición, se retiraron 100  $\mu$ l de medio, se adicionaron (menos a los pozos blanco) 20  $\mu$ l de una solución de MTT [5 mg/ml] en PBS y se incubaron 2 h a 37 °C.
- Transcurrido este tiempo, se removió el medio con micropipeta, (con mucho cuidado de no retirar los cristales) y a cada pozo se le adicionaron 100  $\mu$ l de DMSO para disolver los cristales y se midió la absorbancia a 550 nm.
- Se promedió la absorbancia de los pozos blanco y se le restó a todos los pozos.
- Los datos se normalizaron, respecto al promedio de la absorbancia de las células control que se consideró el 100 % de la actividad mitocondrial.

### 3.2.7 Ensayo de liberación de LDH

La lactato deshidrogenasa (LDH) es una enzima citoplasmática, que se libera al medio cuando se pierde la integridad de la membrana plasmática, por lo que la medición de su actividad en el medio de cultivo, se utiliza como indicador de muerte celular.

Este ensayo se realizó siguiendo las especificaciones del fabricante del kit *CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay* con algunas modificaciones explicadas a continuación. El kit utiliza una reacción enzimática acoplada a la actividad de la LDH. La reacción de la diaforasa permite la reducción de una sal de tetrazolio a formazán rojo que se mide colorimétricamente a 490 nm.

- Luego de transcurridos los tiempos de incubación respectivos para cada experimento, 50  $\mu$ l de medio de cultivo se transfirieron a una caja de 96 pozos.
- Se adicionaron 20  $\mu$ l del reactivo CytoTox 96 que consiste básicamente en lactato, NAD, diaforasa y sal de tetrazolio.
- Se incubó 30 min a temperatura ambiente protegido de la luz.
- Una vez transcurrido el tiempo de incubación, la reacción se detuvo adicionando 50  $\mu$ l de una solución de ácido acético 1 M.
- Se procedió a leer en el espectrofotómetro a 490 nm.

### 3.2.8 Western blot

- El lisado de proteínas se extrajo con una solución de lisis RIPA que contenía 1X de inhibidores de proteasas y 1X de inhibidores de fosfatasa. Todo el procedimiento se llevó a cabo en hielo.
- Luego se procedió a sonicar los extractos con 3 pulsos de 3 s a una amplitud de 20 %.
- La proteína se cuantificó por el método de BCA y los extractos se almacenaron a -70 °C hasta el momento de su uso.
- La electroforesis (SDS-PAGE) se realizó en un sistema miniprotean 3 de Biorad con *buffer* towing 1X. Dependiendo del peso molecular de la proteína que se quería detectar, se prepararon geles de diferente concentración:

Proteínas >120 kDa (geles de 8 %)

Proteína entre 35 – 120 kDa (geles de 10 %)

Proteínas entre 20-35 kDa (geles de 12 %)

Proteínas < 20 kDa (geles de 15 %)

LC3 se detectó en geles de gradiente (4-20%)

- Se sembraron de 40 a 50 µg de proteína por carril previamente desnaturalizada por calor (95 °C durante 10 min).
- Las condiciones de corrido fueron 50 voltios durante 45 min, una vez las muestras se encontraban alineadas, se aumentaba el voltaje hasta 100 voltios y se corrían en el gel de separación durante aproximadamente 90 min. Se utilizó el marcador de peso molecular *PageRuler Plus Prestained Protein Ladder* (thermo Scientific) para monitorear el progreso de la electroforesis.
- Para la transferencia se utilizaron membranas de nitrocelulosa o PVDF, las de PDVF se activaron previamente con metanol. La solución para la transferencia contenía 20 % de metanol en *buffer* towing 1X; y las condiciones fueron 250 mA constantes durante 2 h. Para la proteína Fis1 se hicieron transferencias de 30 min.
- El bloqueo se realizó durante 1 h en una solución de leche descremada al 5% en TBS 1X.
- La incubación de todos los anticuerpos primarios, se hizo toda la noche a 4 °C, luego se realizaron 5 lavados de 5 min en TTBS 1X.
- Los anticuerpos secundarios se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente se realizaron 5 lavados de 5 min en TTBS 1X.
- Inmediatamente se procedió a revelar con el kit de quimioluminiscencia Novex ECL Chemiluminescent Substrate Reagent Kit.
- El revelado se hizo manualmente usando películas Amersham Hyperfilm ECL o utilizando el sistema de documentación ChemiDoc<sup>TM</sup>MP System Bio-Rad.

- El análisis densitométrico se realizó con el *software* ImageJ.

**Tabla 3.14 Soluciones usadas en *western blot***

Solución	Composición	Uso
TBS 10X	Tris-Base 1M, NaCl 1,5 M pH 7,5	1:10 diluído en H <sub>2</sub> O dd
TTBS 10X	Tris-Base 1M, NaCl 1,5 M, pH 7,5, 2 % de Tween 20	1:10 diluído en H <sub>2</sub> O dd
Towing 10X	Tris-Base 248 mM, Glicina 1,92 M, SDS 10 g/l, pH 8,3	1:10 diluído en H <sub>2</sub> O dd
Transferencia	Towing 1X, Metanol 20 %	Listo para usar

### 3.2.9 Inmunofluorescencia

- Las células CAD shControl, CADshPINK1 y CADshParkin se cultivaron sobre vidriecillos de 12 mm de diámetro previamente cubiertos con poli-L Lisina dispuestos sobre cajas de 24 pozos (densidad de 20.000 a 25.000 células/vidrio).
- Una vez cumplidos los tiempos de los tratamientos, las células se fijaron con PFA al 4% durante 10 min.
- Se realizaron 2 lavados con 500 µl de PBS x 5 min.
- Posteriormente las células se permeabilizaron con 0,1% de Triton X-100 en PBS durante 10 min.
- Luego se realizaron 3 lavados de 5 min con solución de bloqueo fresca (1% de BSA, 1% de SFB y 0,05% de Triton X-100 en PBS) y se dejaron durante 90 min en solución de bloqueo.
- Una vez se cumplió el tiempo de bloqueo las células se incubaron con el anticuerpo primario 1:50 diluido en solución de bloqueo, durante 36 h a 4 °C en un ambiente húmedo.
- Después se realizaron 5 lavados de 10 min con solución de bloqueo.
- Las células se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente diluido en solución de bloqueo (1:1000) durante 2 h a temperatura ambiente y protegido de la luz (preferiblemente sobre una plancha con agitación orbital).
- Posteriormente, se hicieron 5 lavados de 10 min con solución de bloqueo. Y luego los vidriecillos se montaron en portaobjetos con el medio de montaje con *Hoescht*. Los bordes se fijaron con esmalte de uñas.
- Las láminas fueron guardadas en oscuridad a -20 °C hasta el momento de tomar las fotos en el microscopio confocal o en el de fluorescencia.

### 3.2.10 RT-PCR

- El RNA de las células CAD fue extraído utilizando Trizol, para lo cual las células fueron lisadas directamente en platos de 10 cm<sup>2</sup> de área con 1 ml de Trizol.

- El lisado se transfirió a un tubo eppendorf de 1,5 ml y se incubó durante 5 min a temperatura ambiente.
- Luego se agregaron 200  $\mu$ l de cloroformo, se taparon los tubos, se agitaron vigorosamente durante 15 s y se incubaron a temperatura ambiente durante 3 min.
- Las muestras se centrifugaron a 12000 g por 15 min a 4°C.
- Posteriormente la fase acuosa, que contenía el RNA, fue transferida a un nuevo tubo y el RNA fue precipitado agregando 500  $\mu$ l de isopropanol, las muestras se incubaron a temperatura ambiente, durante 10 min y se centrifugaron a 12000 xg durante 10 min a 4°C.
- Después se removió el sobrenadante y el pellet de RNA se lavó una vez con 1 ml de etanol al 75% v/v en agua DEPC mezclando con vórtex, luego se centrifugó a 7500 g durante 8 min a 4°C.
- Finalmente se removió el sobrenadante y el RNA se secó en un Speed Vac durante 5 min, y el RNA se disolvió en 30-50  $\mu$ l de agua DEPC (dependiendo del tamaño del pellet). La integridad del RNA fue evaluada mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8% teñido con SYBR safe.
- Las muestras fueron cuantificadas y conservadas a -70 °C hasta el momento de su uso.
- La síntesis de cDNA se hizo siguiendo las especificaciones del fabricante del kit Superscript III de Invitrogen.
- Para evaluar la disminución de la expresión de PINK1 se hizo la medición de la cantidad de transcrito usando la metodología de PCR cuantitativa relativa a los niveles de expresión de  $\beta$ -actina, la secuencia de los primers específicos fue la siguiente.

**PINK1** Directo 5'-GTGGAACATCTCGGCAGGTT-3'

**PINK1** Reverso 5'-CCTCTCTTGGATTTTCTGTAAGTGAC-3'

**$\beta$ -actina** Directo 5'-CTTGGGTATGGAATCCTGTGG-3'

**$\beta$ -actina** Reverso 5'-TCAGGAGGAGCAATGATCTTG-3'

- Primero se hizo una PCR convencional en gradiente de temperatura para determinar el rango de temperatura de anillamiento de los primers de PINK1.
- Una vez determinado ese rango se empezaron los ensayos en el equipo de tiempo de real probando las temperaturas de anillamiento encontradas en la PCR convencional hasta determinar que 51°C era la temperatura óptima.
- El equipo empleado fue el Light Cycler 4.1 (Roche Molecular Biochemicals; Mannheim, Germany). El programa de amplificación empleado para PINK1 se muestra en el anexo B. El método del  $\Delta\Delta C_t$  fue utilizado para analizar los resultados ya que provee una rápida estimación de la proporción relativa de la expresión de un gen [216, 217].



- Posteriormente se recuperaron los amplificadores y se corrieron en un gel de agarosa al 5% para corroborar su identidad de acuerdo al tamaño esperado del producto.

### 3.2.11 Cultivo primario de neuronas hipocampales

Los cultivos primarios de neuronas de hipocampo se obtuvieron a partir de neonatos (día 1) de ratones C57BL/6. Todo el procedimiento se realizó en cabina de flujo laminar y con instrumentación estéril.

- Las crías se colocaron en cajas de petri sobre hielo durante aproximadamente 5 min.
- Luego se decapitaron con tijeras y las cabezas se colocaron en placas de petri con medio HBSS frío.
- La disección se hizo con la ayuda de un estereoscopio, para esto se tomó la cabeza del ratón por el hocico con una pinza de agarre; con la ayuda de otra pinza se retiró la piel, y luego se hizo una incisión por encima de la oreja para romper la calota y poder retirarla con mucho cuidado, de esta manera el cerebro quedó expuesto.
- Se retiró el cerebro y se colocó en otra placa de petri con HBSS 1X frío.
- Se retiraron las meninges, el cerebro se tomó por el lado posterior (donde está el cerebelo) y los hemisferios se separaron abriéndolos cuidadosamente, como si se trataran de un libro.
- De esta manera el hipocampo es visible y puede ser removido cuidadosamente.
- Los hipocampos se recolectaron en un tubo cónico de 15 ml con medio HBSS 1X frío.
- Una vez se tuvieron todos los hipocampos, éstos fueron re-suspendidos en tripsina 0,5 X e incubados a 37 °C por 15 min.
- Posteriormente se lavaron 2 veces con 5 ml de medio HBSS y se les adicionaron 3 ml de medio PNBM suplementado con 10% de SFB.
- El tejido se disoció pasando la solución de células a través de puntas de micropipetas de 1 ml, 200 µl y finalmente 3 veces por una punta de 20 µl.
- Posteriormente las células se transfirieron a un tubo falcon de 50 ml a través de un *cell strainer* (70 µm).
- Las células se contaron con azul de tripan y se sembraron 90.000 células contenidas en 80 – 100 µl de medio PNBM con 5 µM de glutamato, sobre vidriecillos de 12 mm de diámetro pre-tratados con poli-L lisina y dispuestos en cajas de 24 pozos. Se incubaron durante 3 h a 37°C en incubadora de CO<sub>2</sub>.
- Luego de las 3 h, se completó el volumen del medio hasta 600 µl y las células se volvieron a incubar a 37°C por 3 días.
- Al tercer día, se le adicionó arabinósido C 0,5 µM para impedir la proliferación de glía.
- Al día siguiente se cambió el 50 % del medio, por medio fresco sin glutamato, cada tercer día el medio fue cambiado de la misma manera.

- A los 10 días de cultivo, se realizó la transfección con el constructo lentiviral shRNA PINK1 (A), para lo cual se utilizó 1 µg de DNA plasmídico y 1 µl de lipofectamina en 250 µl de optimen. Para lo cual el medio de cultivo se retiró y reservó, se adicionó la mezcla de transfección sobre la monocapa y se dejó durante 1 h, a la hora se retiró toda la mezcla y se adicionaron 300 µl del medio reservado y 300 µl de medio fresco.
- A las 72 horas postransfección se realizaron los experimentos.

### 3.2.12 Análisis estadístico

Los datos de esta tesis corresponden a tres experimentos independientes. Los resultados, se expresaron como medias  $\pm$  SEM. Para todos los experimentos se realizaron pruebas de análisis de varianza y se evaluó la significancia estadística a un nivel del 5%. El primer diseño experimental se desarrolló a una vía de clasificación para evaluar: (1) El efecto de la C2-Ceramida y el IGF1 sobre las variables viabilidad, morfología de la red mitocondrial, activación y expresión de varias proteínas de la vía PI3K/AKT y proteínas de dinámica mitocondrial. (2) El efecto del silenciamiento de PINK1 y Parkin sobre las variables tasa de crecimiento, actividad de mitocondrial, % de liberación de LDH, % de muerte celular. El segundo diseño experimental correspondió a un arreglo de dos factores fijos: El primer factor correspondió al silenciamiento considerándose tres niveles (shControl, shPINK1 y shParkin) y el segundo factor correspondió al tratamiento y correspondió a (vehículo, IGF1, C2-Ceramida). En los casos en los que se requirió hacer comparaciones de medias entre dos muestras, se utilizó la prueba *t* de Student.

## 4. Capítulo 4: Viabilidad Celular

### 4.1 Introducción

Las neuronas son células especializadas y representan la unidad funcional del sistema nervioso. En vertebrados su número final es determinado durante el desarrollo embrionario y a diferencia de la mayoría de los otros tipos celulares, las neuronas maduras son incapaces de dividirse por tratarse de células pos-mitóticas [218]. Debido a esto, los mecanismos de supervivencia que utilizan las neuronas son determinantes en el mantenimiento del número de éstas en diferentes partes del cerebro, lo cual define la función neuronal [219].

### 4.2 Vías de supervivencia neuronal

Las rutas de señalización comprenden un grupo de moléculas intracelulares que actúan en conjunto para controlar al menos un proceso celular, como proliferación, supervivencia o muerte. Este grupo de moléculas se activa de forma secuencial bajo diferentes estímulos extracelulares o condiciones biológicas específicas. En este sentido se conoce que neurotrofinas y otros factores de crecimiento como el FGF (del inglés, *fibroblast growth factor*), IGF (del inglés, *insulin-like growth factor*), EGF (del inglés, *epidermal growth factor*), TGF $\alpha$  (del inglés, *transforming growth factor alpha*), CNTF (del inglés, *ciliary neurotrophic factor*), PDGF (del inglés, *platelet derived growth factor*), GDNF (del inglés, *glial derived neurotrophic factor*) e interleucinas son capaces de promover la supervivencia neuronal [220, 96].

Todos estos factores tróficos, actúan a través de receptores tirosina quinasa activando varias vías de señalización entre las cuales se encuentran la vía PI3K/AKT, RAS/MAPK y PLC $\gamma$ , cada una de las cuales contribuye a la supervivencia neuronal bajo ciertas condiciones que dependen del tipo celular y el factor trófico. Sin embargo, la vía PI3K/AKT es reconocida como la principal vía de supervivencia en neuronas [221, 222].

#### 4.2.1 Neurotrofinas

El grupo principal y mejor caracterizado de moléculas que controlan el número de neuronas y el crecimiento dendrítico mediante la activación de vías de señalización son las

Neurotrofinas (NTs). En mamíferos existen cuatro NTs bien caracterizadas: (1) NGF (del inglés, *nerve growth factor*), (2) BDNF (del inglés, *brain derived neurotrophic factor*), NT-3 (neurotrofina (3) y (4) NT4/5 (neurotrofina-4/5) las cuales derivan de un gen ancestral común, por lo que su secuencia y estructura es similar mostrando aproximadamente un 50% de homología entre ellas (revisado en [223-225]).

Las NTs son sintetizadas por diferentes células en el sistema nervioso central y sistema nervioso periférico [225] como proteínas precursoras (pre-pro-proteínas) que son trasladadas al RE (retículo endoplasmático) donde son procesadas proteolíticamente para constituir formas maduras de 118-120 aminoácidos [226, 227], que se asocian como homodímeros unidos no covalentemente y se unen a receptores transmembranales, Trk (del inglés, *tropomyosin receptor kinase*).

Los Trk pertenecen a la superfamilia de receptores localizados en la membrana plasmática con actividad tirosina quinasa intrínseca. En humanos existen tres isoformas de Trk de aproximadamente de 140 kD denominados TrkA, TrkB y TrkC que muestran alto grado de homología en su región intracelular y difieren en su dominio extracelular (de unión del ligando), de forma que NGF se une preferencialmente a TrkA, BDNF y NT4/5 a TrkB y NT3 a TrkC [225]. Estructuralmente los Trk son glicoproteínas integrales de membrana que poseen tres dominios: un dominio extracelular N-t el cual contiene tres motivos LRR (del inglés, *leucine repeats rich*), dos *clusters* de cisteína (C1, C2) y dos dominios tipo inmunoglobulina (Ig1, Ig1) que conforman el sitio de unión del ligando; un dominio transmembranal y un dominio citoplasmático C-t en el que se localiza el sitio catalítico responsable de la actividad tirosina quinasa [228].

Los tres tipos de receptores Trk median respuestas celulares similares, a través de la activación de enzimas efectoras como PI3K (del inglés, *phosphatidylinositol 3 kinase*), fosfolipasa C gamma (PLC $\gamma$ ) y ras [226].

#### 4.2.2 Otros factores de crecimiento neuronal

Además de las neurotrofinas, existen otros factores de crecimiento relacionados con mecanismos de supervivencia neuronal entre ellos se encuentran los miembros de la familia GDNF (del inglés, *glial cell line-derived neurotrophic factor*) (GDNF, neurturin, artemin y persephin) que representan el principal factor neurotrófico de neuronas dopaminérgicas [229], los cuales al unirse a receptores específicos (GFR $\alpha$ 1-4) activan al receptor tirosina quinasa transmembranal c-Ret (del inglés, *rearranged during transformation*) por lo cual se induce la activación de las vías de señalización de las PI3K, MAPK y PLC $\gamma$  (revisado en [230]).

El MANF (del inglés, *mesencephalic astrocyte derived neurotrophic factor*) y el CDFN (del inglés, *conserved dopamine neurotrophic factor*) son miembros de una familia de factores neurotróficos conservados evolutivamente los cuales tienen propiedades específicas sobre neuronas dopaminérgicas [231]. Tanto el CDFN [232], como el MANF [231] en modelos experimentales de rata, fueron capaces de restaurar la función dopaminérgica y prevenir la degeneración de las neuronas dopaminérgicas en la *sustancia nigra* luego del tratamiento con 6-OHDA.

El IGF1 es un polipéptido de 70 aminoácidos con un peso molecular de 7.5 kDa, consta de 4 dominios: A, B, C y D, de los cuales A y B presentan homología estructural con las cadenas A y B de la insulina. El dominio C es análogo al péptido C de la proinsulina, mientras que el dominio D no está presente en dicha hormona [233]. El IGF1 se une con alta afinidad a los receptores IGF1R activando en neuronas principalmente la vía de señalización RAS/MAPK y la vía PI3K/AKT por lo cual recientes estudios han propuesto el uso del IGF1 como potencial terapéutico en el tratamiento de enfermedades del sistema nervioso; además el IGF1 juega un papel importante en el desarrollo del sistema nervioso ya que se ha demostrado su efecto sobre proliferación, diferenciación y supervivencia celular en varios estadios del desarrollo del cerebro (revisado en [234]).

En el cerebro, el IGF1 es producido por astrocitos y microglia luego de una lesión isquémica y funciona como un factor neurotrófico para promover la supervivencia neuronal [235], principalmente por activación de la vía de supervivencia PI3K/AKT [221]

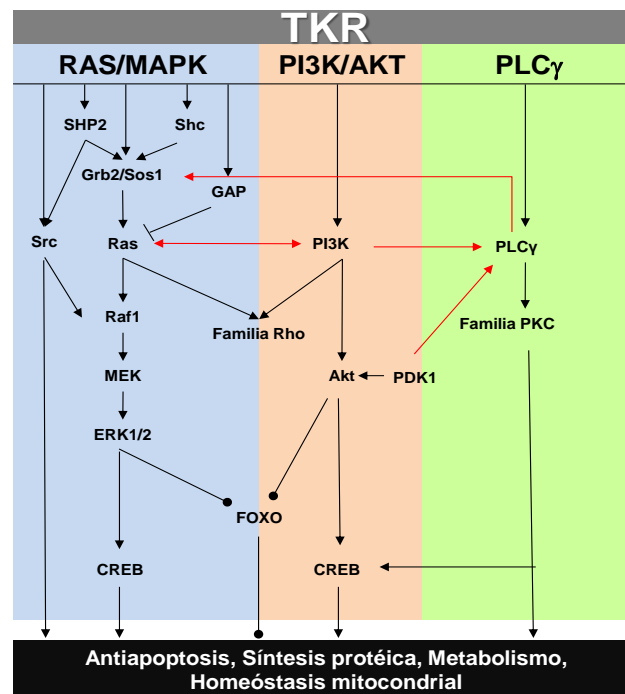
### **4.2.3 Traducción de señal mediada por receptores tirosina quinasa**

En general los receptores tirosina quinasa (RTK), son activados por dimerización inducida por la unión del ligando, lo cual resulta en la autofosforilación de residuos específicos de tirosina que se encuentran en un *loop* intracelular, que obstruye el sitio catalítico del dominio quinasa. Esto genera un cambio de conformación en el receptor debido al desplazamiento de este *loop* y favorece la transfosforilación de los receptores y la creación de sitios de anclaje para proteínas involucradas en la transducción de señales, que conducen a la expresión de genes y a la síntesis de proteínas [225, 236]. Adicionalmente se han reconocido integrinas y otras moléculas de adhesión que actúan como co-receptores requeridos tanto para asegurar la correcta unión del ligando [237-239], así como necesarios para los eventos de señalización subsecuentes [240-242].

El evento inicial seguido de la activación de este tipo de receptores, es el reclutamiento de proteínas involucradas en la transducción de señales (proteínas de acoplamiento o “*docking*”) que pertenecen a las familias de proteínas IRS (del inglés, *insulin receptor substrate*), Gab (del inglés, *grb2-associated binder*), Dok (del inglés, *downstream of*

*tyrosine kinases*) y FRS2 (del inglés, *fgf receptor substrate 2*), las cuales se caracterizan por tener en su extremo N-t una región de unión a membrana (que puede ser un dominio PH (del inglés, *pleckstrin homology*) o una secuencia de miristoilación y en su porción C-t, múltiples sitios de fosforilación de tirosina, que sirven para unir diversas proteínas efectoras con dominios SH2 (inglés *src homology domain 2*) o dominios PTB (del inglés, *phosphotyrosine-binding*) (revisado en [243]).

La activación de este tipo de receptores involucra tres vías principales de señalización la vía PI3K/AKT, la vía Ras/MAPK y la vía de PLC $\gamma$  que no son del todo independientes ya que se interrelacionan cascada abajo en moléculas clave de señalización (ver figura 4.1).



**Figura 4.1 Ilustración esquemática de vías de señalización iniciadas por TRKs**

Se observan separadas por colores las tres principales rutas de señalización activadas por los TRKs. Azul la vía Ras/MAPK, rosado la vía PI3K/Akt y verde la vía PLC $\gamma$ . Las flechas indican interacciones que han sido verificadas experimentalmente, pero puede que no sean directas, obsérvese la comunicación cruzada entre las tres rutas (flechas rojas). Las interacciones inhibitorias son señaladas con ( $\perp$ ).

#### 4.2.4 Señalización PI3K/AKT

PI3K (del inglés, *phosphatidyl inositol inositol3 kinase*) es una quinasa lipídica que cuando es fosforilada en el anillo inositol puede transducir señales. En general cuando los TRKs son activados, la PI3K es reclutada de las proximidades de la membrana plasmática, asociándose al receptor a través de proteínas Gab mediante uno de sus dominios SH2 presente en la subunidad adaptadora p85, lo cual permite la activación alostérica de la subunidad catalítica p110 de PI3K. Una vez activada, PI3K fosforila en la posición tres a los glicerofosfolípidos de membrana PIP y PIP2 (del inglés, *phosphatidyl inositol 4 phosphate* y *phosphatidyl inositol 4,5-biphosphate*), produciendo los respectivos fosfoinositoles fosfato en el lado citoplasmático de la membrana celular, PIP3 (del inglés, *phosphatidyl inositol 3,4,5-triphosphate*) y PI(3,4)P (del inglés, *phosphatidyl inositol 3,4-biphosphate*) (revisado en [244]).

PIP3 actúa como segundo mensajero, y sus niveles están regulados de forma precisa por la acción de fosfatasa como PTEN (del inglés, *phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome TEN*) [245]. Su función es proporcionar un sitio de anclaje para AKT que es la serina treonina quinasa central de la vía.

AKT es una proteína quinasa serina/treonina específica, conocida también como proteína quinasa B (PKB). En mamíferos se han identificados tres genes Akt, que dan origen a tres isoformas denotadas como AKT1, AKT2 o AKT3 las cuales exhiben un alto grado de homología y están constituidas por una estructura conservada, que se compone de un dominio PH ubicado en su extremo N-terminal, un dominio central, donde reside la actividad quinasa y un dominio regulador ubicado en su extremo C-terminal.

La regulación de la actividad de AKT viene determinada por dos sitios de fosforilación dentro de su estructura, un residuo treonina que se localiza en el dominio quinasa, y un residuo serina que se encuentra en el dominio regulador. Para la activación de AKT se requiere primero la fosforilación del residuo serina (S473, S474 o S472, dependiendo si es AKT1,2 o 3) localizado en el dominio regulador y luego la fosforilación del residuo treonina (T308, T309 o T305) ubicado en el dominio catalítico (revisado en [246]).

Debido a la alta afinidad del dominio PH a PIP3, AKT es reclutado a la membrana plasmática y esta asociación produce un cambio conformacional de la proteína que permite la exposición del residuo serina del dominio regulador [247]. El mecanismo de fosforilación de esta serina no está completamente descrito y continúa actualmente en debate [248].

Distintos grupos han implicado a diferentes proteínas en este proceso como la quinasa ILK (del inglés, *integrin linked kinase*)[249], el complejo mTORC2 (del inglés, *mammalian TOR complexes 2*) [250, 251], la DNA-PK (del inglés, *DNA dependent protein kinase*), la PKC $\gamma$  [252], e incluso se ha demostrado que en respuesta a insulina o radiación gamma la

proteína ATM (del inglés, *ataxia telangiectasia mutated*) es la responsable de la fosforilación de este residuo [253]. Además se conoce que AKT puede autofosforilar este residuo [254, 255]. Al parecer, una vez ocurre la fosforilación de esta serina, resulta otro cambio de conformación quedando expuesto el sitio de activación del dominio catalítico [256], y así la quinasa PDK1 (del inglés, *phosphoinositide dependent protein kinase 1*), localizada en la membrana plasmática a través de un dominio PH, puede fosforilar el residuo treonina del dominio catalítico.

Una vez activada AKT se trasloca desde la membrana plasmática al citosol y al núcleo [257]. Su función principal es favorecer la supervivencia celular por el bloqueo de mecanismos de muerte celular, dotando a las células de una señal de supervivencia que les permite hacer frente a diferentes estímulos apoptóticos. Esto es alcanzado por regulación directa de la vía apoptótica, control transcripcional de la supervivencia celular y regulación del metabolismo celular. En este sentido, AKT fosforila a Bad en la S136 [258, 259], Bax en la S184 [260] y Bim en la S87 [261], y promueve su asociación a proteínas 14-3-3 en el citosol. AKT también fosforila caspasa-9 en la S196, lo cual genera un cambio conformacional que impide su acción proteolítica [262].

Otra forma de contribuir a la supervivencia celular, es inhibiendo proteínas MAPK como JNK (del inglés, *c-jun N-terminal kinase*) la cual media la fosforilación y activación de c-jun, un factor que junto con c-fos median la transcripción de genes pro-apoptóticos. Esto lo hace indirectamente al fosforilar en la S83 a ASK1 (del inglés, *apoptosis signaling kinase-1*) que es un miembro de la familia MAPKKK capaz de fosforilar e inactivar JNK impidiendo de esta forma su actividad pro-apoptótica [263].

Respecto al control transcripcional, AKT puede modular la actividad de diferentes factores de transcripción. La fosforilación de FOXO en la T24 y S256 [264] provoca su redistribución celular desde el núcleo al citosol causando una inhibición de su actividad lo cual previene la inducción de la expresión de factores citotóxicos como FasL (del inglés, *fas ligand*) [265, 266]. Otro de los factores de transcripción regulados por AKT es CREB cuya fosforilación en la S133 resulta en su activación y expresión de sus genes blanco por reclutamiento de CBP (del inglés, *CREB Binding Protein*) que incluyen miembros anti-apoptóticos Bcl2, Mcl-1 [267, 268, 258, 269].

La inducción de la actividad transcripcional de NF $\kappa$ B (del inglés, *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) se realiza por la fosforilación de IKK $\alpha$  (del inglés, *I $\kappa$ B kinase  $\alpha$* ) en la T23. IKK $\alpha$  activada fosforila la proteína I $\kappa$ B (del inglés, *inhibitor of  $\kappa$ B*) que es blanco para ubiquitinación y degradación proteosomal, de forma tal que NF $\kappa$ B queda libre para traslocarse al núcleo y activar la transcripción de genes pro-supervivencia como



Bcl-xL, Bcl2, c-IAPs, c-FLIP. AKT también estimula la activación de p38 MAPK que a su vez favorece la trans-activación de la subunidad RelA/p65 de NFκB [270].

También ha sido descrita la inactivación de los factores pro-apoptóticos p53 y p73 mediante la fosforilación por AKT. En el caso de p53 esta inactivación se da mediante la fosforilación de la proteína Mdm2 (del inglés, *murine double minute 2*) en las S166 y S168 lo que promueve su localización en el núcleo donde desestabiliza p53 y aumenta su degradación a través de la vía proteosomal [271-273]. Mediante la fosforilación en S127 de la proteína YAP (del inglés, *yes associated protein*), se induce la inactivación de p73 [274].

Además, AKT es capaz de fosforilar a GSK3β en la S9 e inhibirla (del inglés, *glycogen synthase kinase 3 beta*) [275]. La inhibición de GSK3β inhibe la vía intrínseca de la apoptosis ya que GSK3β regula factores de transcripción que controlan la expresión de proteínas pro-apoptóticas además de promover la desorganización de microtúbulos y la ruptura de la membrana mitocondrial por fosforilación, ubiquitinación y degradación de MCL1 (del inglés, *myeloid cell leukemia sequence 1*), un miembro antiapoptótico de la familia BCL-2 [276, 277].

GSK3β media la fosforilación de las ciclinas D [278] y E [279] y factores de transcripción c-jun [280] y c-myc [281] que juegan un papel central en la transición de G1 a S. Al GSK3β fosforilar la ciclina D y E así como c-jun y c-myc, estos son exportados del núcleo y degradados en el citoplasma por el proteosoma, es decir que GSK3 está involucrada en la no progresión del ciclo celular, pero AKT es capaz de inhibir esta acción ya que la fosforila e inactiva.

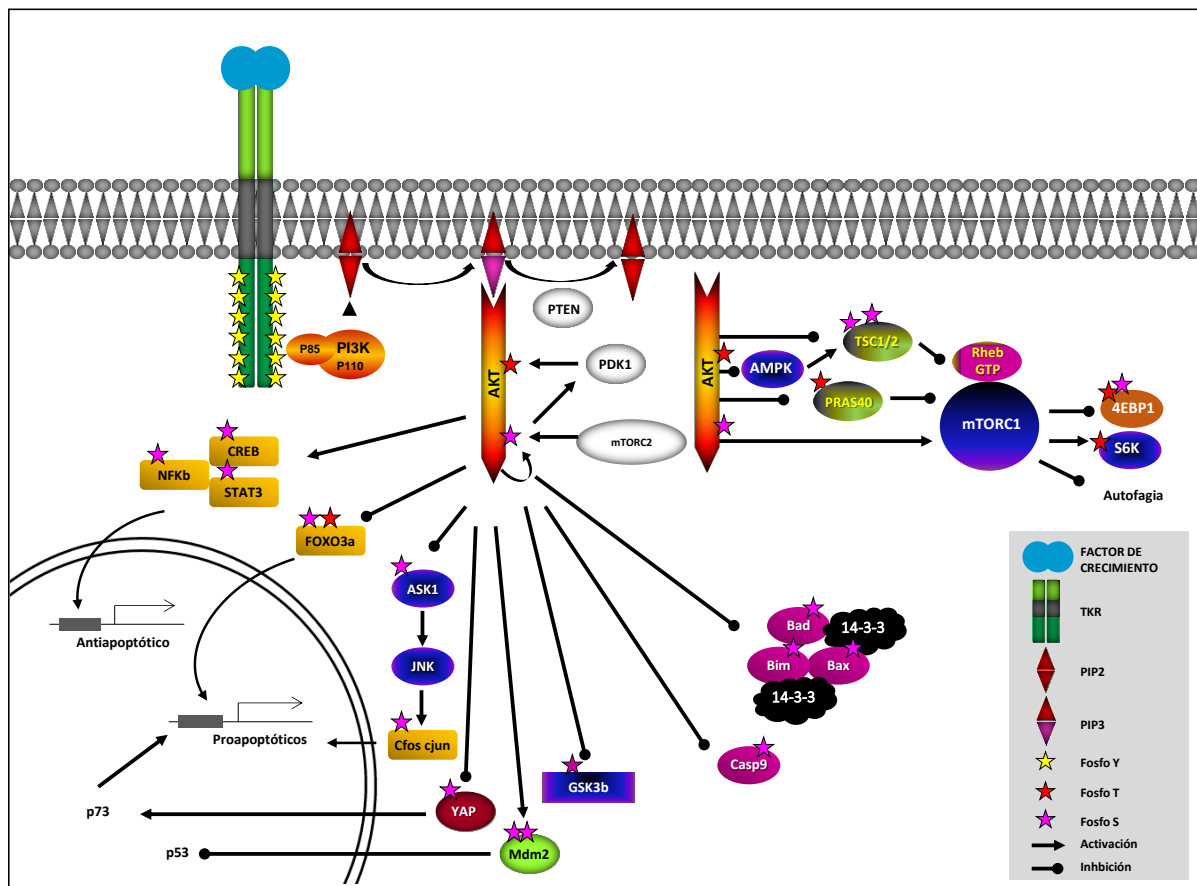
Ahora bien, la fosforilación de PRAS40 y TSC2 por AKT favorece la activación de mTORC1 que además de estimular el crecimiento celular e inhibir autofagia también es un regulador crítico en la proliferación celular [282-284].

Por otra parte, AKT permite la activación de un factor de iniciación de la traducción implicado en la unión del RNA mensajero al ribosoma, el eIF4E (del inglés, *eukaryotic translation initiation factor 4E*). Esta regulación es indirecta y la hace dependiente de la activación de mTORC1. La activación de este complejo hiperfosforila a una proteína inhibitoria de eIF4E denotada como 4 EBP1 (del inglés, *phosphorylated 4E-binding protein*), que cuando esta hipofosforilada retiene a eIF4E, de esta forma el factor de iniciación queda libre para participar en la iniciación de la traducción de mRNAs incluyendo aquellos que codifican ciclina D1 y c-myc [285].

Igualmente AKT a través de la activación de mTORC1, es capaz de activar otra proteína implicada en la traducción de mRNAs, la quinasa S6K (del inglés, *S6 ribosomal kinase*) cuya función es fosforilar la proteína ribosomal S6 y a eIF4B que también forma parte de

la maquinaria de iniciación de la traducción, lo cual se relaciona con incremento en la traducción mRNAs [286].

En algunas líneas celulares AKT promueve la progresión del ciclo celular en presencia de daño en el ADN, esto se explica porque AKT fosforila directamente en la serina 280 a la proteína quinasa Chk1 (del inglés, *DNA damage checkpoint kinase*), involucrada en la regulación de la progresión de las fases G2/M en el ciclo celular [287, 288, 271, 289], lo cual hace que Chk1 se localice en el citosol donde es fosforilada en la S345 por ATM y ATR (del inglés, *ATM and Rad3-related*), ambas quinasas sensibles a daño en el ADN, inactivando su acción inhibitoria [288]. Todo este mecanismo de regulación positiva de AKT se puede ver resumido en la figura 4.2.



**Figura 4.2 Señalización de AKT mediada por activación de receptores tirosina quinasa**

Representación esquemática de la activación de AKT secundaria a la activación de TRKs mediada por factores de crecimiento. AKT fosforilado regula directa o indirectamente la, transcripción de proteínas anti-apoptóticas e inhibe proteínas pro-apoptóticas, adicionalmente favorece proliferación celular celular e inhibe autofagia.

### 4.2.5 Señalización Ras/MAPK

Ras (del inglés, *rat sarcome*) es un miembro de la superfamilia Ras de pequeñas GTPasas. En mamíferos se encuentran tres isoformas codificadas por tres genes diferentes H-ras, K-ras, and N-ras, los cuales se expresan en todos los tejidos y tipos celulares aunque con patrones variables dependiendo del tipo celular y el estado de desarrollo [290].

Estructuralmente las tres isoformas constan de una región N-terminal con alta homología donde se encuentra localizado el dominio efector (domino GTPasa), el dominio *switch 1* (donde se unen proteínas activadoras de GTPasa) y el dominio *switch 2* (donde se unen proteínas intercambiadoras de nucleótidos de guanosina). La región C-terminal es altamente heterogénea y debido a modificaciones pos-trasduccionales (farnesilación y palmitoilación) Ras tiene gran afinidad por la membrana plasmática (revisado en [291]).

Ras funciona como un interruptor. Cuando se encuentra unido GDP su estado es inactivo y cuando está unido GTP se encuentra activo. Los estados de activación y desactivación de Ras son controlados por factores intercambiadores de nucleótidos de guanina (GEFs del inglés, *guanine nucleotide exchange factor*) que potencian la forma activa de Ras al catalizar la sustitución del GDP por GTP; y por proteínas activadoras de GTPasa (GAPs del inglés, *GTPase activating proteins*) que favorecen la forma inactiva de Ras al incrementar la actividad GTPasa por lo tanto la hidrólisis de GTP a GDP (revisado en [292, 293]).

El incremento en la actividad de Ras (dependiente de la activación de TKRs) resulta de la estimulación por Sos (del inglés, *son of sevenless*), un tipo de GEF cuya función depende de su localización y requiere la unión a la proteína adaptadora Grb2 (del inglés, *growth factor receptor-bound protein 2*). Una vez activados los TKRs, Grb2 se une mediante su dominio SH2 directamente a los TKRs, o indirectamente mediante la formación de complejos con proteínas adaptadoras Gab o complejos Gab-Shp2 [294]. En el caso específico de la activación del receptor 1 del FGF y de los Trks, Grb2 puede también unirse a estos receptores a través de la proteína adaptadora FRS2 [295, 296].

De esta forma Grb2, ahora ubicado cerca de la membrana plasmática, recluta a Sos quien se une a su dominio SH3 (del inglés, *src Homology 3*) a través de regiones ricas en prolina ubicadas en su extremo C-terminal [297, 298]. La formación de este complejo al parecer requiere de Ezrin (proteína de unión entre membrana plasmática y citoesqueleto), actina F y co-receptores [242]. Es así que Sos tiene acceso a Ras y lo puede activar.

De esta manera Ras activado da curso a la señalización y activa la vía de las quinasas MAPK (del inglés, *mitogen activated protein kinase*) al favorecer la activación de la primera quinasa de esta vía, la proteína Raf-1. Esto lo hace al unirse al dominio regulador N-terminal de Raf-1 y reclutarla a la membrana plasmática lo cual induce un cambio de

conformación al parecer también influenciado por la defosforilación de residuos serina específicos, con lo cual el dominio quinasa de Raf1 queda libre y activo. Sin embargo el mecanismo exacto aun es motivo de controversia (revisado en [299]).

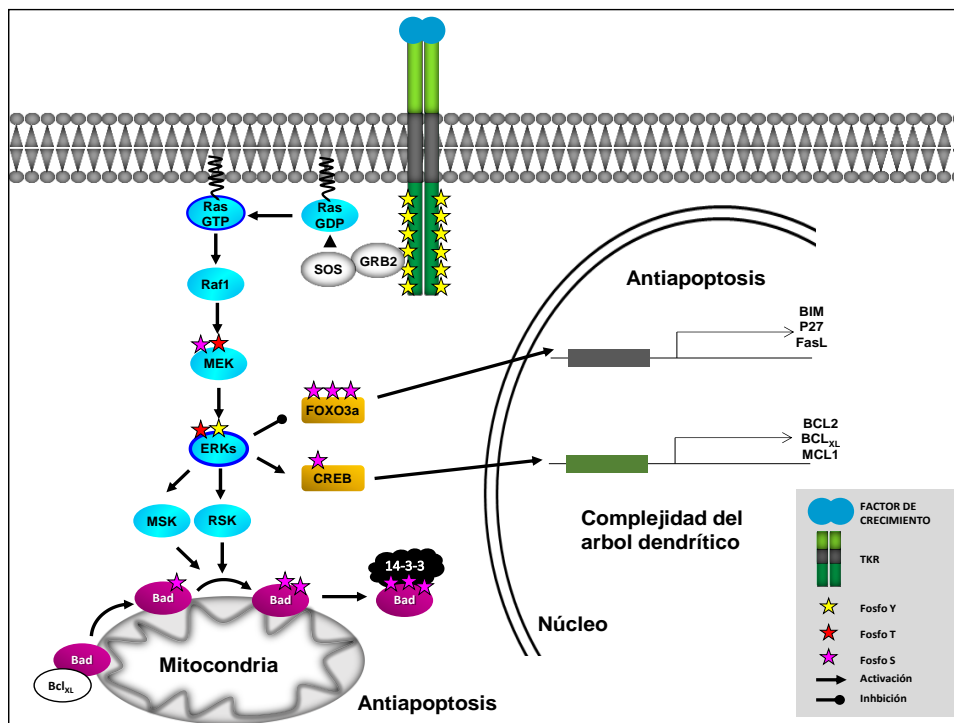
De esta forma Raf-1 forma un complejo estable con MEK1/2 (del inglés, *MAP ERK Kinase*) y fosforila dos residuos conservados serina/treonina activándola [300]. MEK1/2 a su vez fosforila dos residuos treonina y tirosina localizados en un motivo (T-E-Y) de las proteínas MAPK, ERK1/2 (del inglés, *extracellular signal-regulated kinase*) también conocidas como p42p44 MAPK activándolas. Finalmente las ERKs activas regulan mediante fosforilación de muchos blancos citoplasmáticos y nucleares que controlan funciones biológicas importantes como proliferación y diferenciación [301] e incluso muerte celular [302]

Dentro de los mecanismos usados por ERKs para favorecer la supervivencia celular se encuentran la regulación de proteínas pro y anti-apoptóticas de la familia BCL2. Las ERKs favorecen fosforilación de Bad en la S112 y así junto con la fosforilación en la S136 (dependiente de AKT) y la fosforilación en la S155 (dependiente de la proteína quinasa A, PKA) contribuye a su degradación vía proteínas 14-3-3. Esto lo hace de forma indirecta al activar RSK (del inglés, *ribosomal S6 kinase*) y MSK1 (del inglés, *stress-activated protein kinase*) [303-305].

Por otro lado los ERKs pueden reprimir la transcripción de factores pro-apoptóticos como Bim, ya que fosforilan al factor de transcripción FOXO3a (del inglés, *forkhead box class O 3a*) en tres residuos serina (S294, S344 y S425) favoreciendo su degradación vía proteosoma por ubiquitinación mediada por Mdm2 [306]. Adicionalmente los ERKs favorecen la expresión de proteínas anti-apoptóticas como Bcl2, Bcl-xl y MCL1 a través de la fosforilación de CREB (del inglés, *cAMP response element-binding*) (revisado en [304]), lo cual se ha relacionado con supervivencia neuronal [307]. Por otro lado, en neuronas la activación de CREB media además la complejidad y desarrollo dendrítico y por lo tanto la función neuronal [308]. Un resumen de la vía es mostrado en la figura 4.3.

#### 4.2.6 Señalización PLC $\gamma$

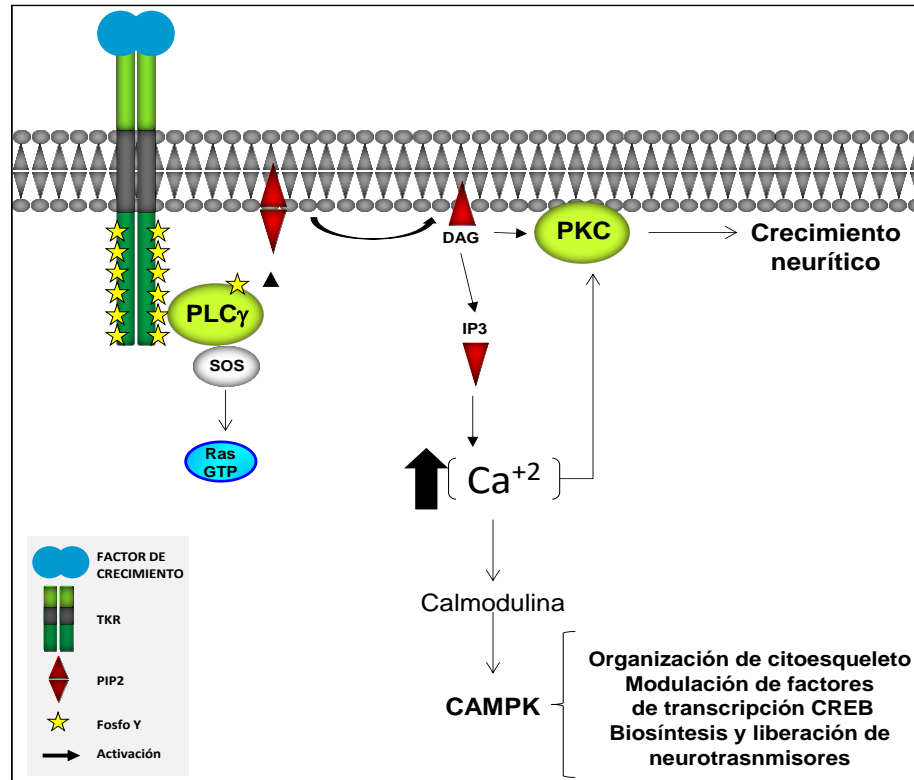
Otra de las moléculas de señalización corriente abajo de los TRKs es la fosfolipasa C gamma (PLC $\gamma$ ), una proteína citosólica que se trasloca a la membrana plasmática luego de la activación de TRKs. PLC $\gamma$  forma parte de una familia de trece isoenzimas que se caracterizan por tener en su estructura dominios X y Y que forman el dominio catalítico, así como varios dominios reguladores entre los cuales se encuentran un dominio PH un dominio SH3, un dominio SH2. La isoforma 1 de PLC $\gamma$  se expresa ampliamente en cerebro siendo las neuronas las células que presentan los mayores niveles seguidas de los oligodendrocitos y los astrocitos (revisado en [309]).



**Figura 4.3 Vía RAS/MAPK/ERK mediada por activación de receptores tirosina quinasa**

Representación esquemática de la activación de ERK secundaria a la activación de TRKs mediada por factores de crecimiento.

El mecanismo de activación de la PLC $\gamma$  se da mediante la unión directa a fosfotirosinas de los TRKs activos, a través de sus dominios SH2 o mediante proteínas adaptadoras Gab, y esta asociación provoca la fosforilación de la Y783 y la consecuente activación de PLC $\gamma$  [310]. Su activación cataliza la hidrólisis de fosfolípidos de membrana (PIP<sub>2</sub>) y la subsecuente generación de dos segundos mensajeros, diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>), por medio de los cuales se regulan los niveles intracelulares de calcio y la actividad de PKC (del inglés, *protein kinase C*). Esta vía de señalización es muy importante en plasticidad sináptica; sin embargo, también se ha visto relacionada con supervivencia debido a que constituye una vía alterna de activación de ras ya que mediante su dominio SH3 puede unir y activar a Sos [311]. IP<sub>3</sub> induce la liberación de calcio desde el RE lo cual resulta en la activación de varias enzimas reguladas por los niveles citoplasmáticos de calcio incluyendo fosfatasas y quinasas. Por otro lado el DAG actúa como cofactor de algunas isoformas de PKC, es así que en neuronas PC12 la activación de PKC $\delta$  (una proteína quinasa regulada por DAG) es requerida para el crecimiento neurítico y la activación de la señalización ERK (revisado en [223]). (Véase figura 4.4)



**Figura 4.4 Vía PLC $\gamma$  RAS/MAPK/ERK mediada por activación de receptores tirosina quinasa**

Representación esquemática de la activación de PLC $\gamma$  secundaria a la activación de TRKs mediada por factores de crecimiento.

### 4.3 Objetivo específico

Identificar el efecto del silenciamiento de los genes *PINK1* o *Parkin* sobre la viabilidad de células CAD tratadas con C2-ceramida.

## 4.4 Metodología

### 4.4.1 Diferenciación de las células CAD

Las células CAD silvestres, CAD shControl, CAD shPINK1 y CAD shParkin, se diferenciaron durante cuatro días en platos de cultivo de 6 pozos, para el análisis de proteínas por *western blot* (180.000 células/pozo), así como sobre vidriecillos de 12 mm de diámetro para inmunofluorescencia (20.000 células/vidrio). Se siguió el protocolo descrito por Arboleda et al. en [209] con algunas modificaciones que se describen en el capítulo 3.

Durante cada día del proceso de diferenciación se extrajo proteína y se evaluaron los niveles de expresión de algunas de las siguientes proteínas PSD95 (del inglés, *Postsynaptic Density protein 95*), Sinapsina 1, RhoGAP29 (del inglés, *Rho GTPase-activating protein 29*), ROCKII, PINK1 y Parkin. Como control de carga se utilizó la expresión de  $\beta$ -actina. Se siguió el procedimiento general de *western blot* descrito en el capítulo 3.

- **Morfología celular por microscopía confocal, utilizando faloidina como marcador de microfilamentos.**
- Luego de cada día de diferenciación, se retiró el medio de cultivo, la monocapa se lavó 1 vez con PBS precalentado a 37 °C, y las células se fijaron con PFA 4% durante 10 min.
- Se retiró el PFA, y las células se permeabilizaron durante 10 min con una solución de 0,1% de Tritón X100 en PBS.
- Posteriormente se realizaron 3 lavados de 10 min con una solución de bloqueo (1% SFB, 1% BSA y 0,05% de tritón X100 en PBS).
- Luego las células fueron incubadas durante 20 min exactos en una solución 1X de faloidina en *buffer* de bloqueo.
- Las células se lavaron 2 veces con 1 ml de PBS y una vez con agua destilada-desionizada estéril, los vidriecillos se montaron en portaobjetos con el medio de montaje con *Hoescht* y los bordes se fijaron con esmalte de uñas.
- Las láminas fueron guardadas en oscuridad a -20 °C hasta el momento de tomar las fotos en el microscopio confocal.

#### 4.4.2 Evaluación de la tasas de crecimiento de las células CAD

Para conocer el desarrollo de las células CAD silvestres, CAD shControl, CAD shPINK1 y CAD shParkin en cultivo, se realizaron dos abordajes metodológicos durante 6 días, el primero consistió en conocer el número de células y el segundo en evaluar la actividad mitocondrial usando MTT. En ambos casos las células se cultivaron en DMEM 4,5 g/l de glucosa suplementado con 10% de SFB y 4 mM de Glutamina o en DMEM 1g/l de galactosa suplementado con 10% de SFB y 4 mM de Glutamina.

- **Conteo celular y realización de curvas de crecimiento.**

El número de células viables y la evolución del cultivo durante 6 días, se conoció haciendo conteos diarios con azul de tripano, un colorante vital que permite diferenciar las células vivas (no teñidas) de las muertas (teñidas). La tinción con azul de tripano y la utilización

de una cámara de Neubauer permitió hacer medidas de viabilidad y densidad celular ( $n^{\circ}$  células/ml).

Para esto, las células se sembraron en platos de 12 pozos a una densidad de 3.500 células/pozo. Se sembraron 12 pozos por cada línea celular, 6 de los cuales fueron cultivados en medio con glucosa y los otros 6 en medio con galactosa. El procedimiento fue el siguiente. Cada día se procedió a contar el número de células en los pozos con cada tipo de medio, para esto.

- Se retiraba el medio de los pozos y se lavaba la monocapa 1 vez con 500  $\mu$ l de PBS precalentado a 37  $^{\circ}$ C.
- Se adicionaban 100  $\mu$ l de tripsina 1X a 37  $^{\circ}$ C durante 2 min, o hasta que se desprendieran las células.
- Para inactivar la tripsina, se adicionaban 300  $\mu$ l de medio suplementado con 10% de SFB. Y se tomaba una alícuota para hacer el conteo manual de las células vivas, usando cámara de Neubauer y azul de tripano.
- Los resultados se expresaron en células/ml.

Para realizar las curvas de crecimiento, el número de células contadas cada día se normalizó con respecto al número de células contadas el día 1, de esta manera se conoció el incremento proporcional diario de cada línea celular, en cada medio de cultivo.

#### ▪ **MTT y evaluación de la actividad mitocondrial**

Se siguió el protocolo de MTT descrito en el capítulo 3. Las diferentes líneas celulares se sembraron en platos de 96 pozos a una densidad de 1.000 células/pozo. La absorbancia de cada día se normalizó con respecto a la absorbancia del día 1, de esta manera se conoció el incremento proporcional diario de la actividad mitocondrial en cada línea celular y en cada medio de cultivo.

### **4.4.3 Efecto de la C2C sobre la línea neuronal SHSY5Y**

#### ▪ **Diferenciación de las células SHSY5Y**

El cultivo de las células SHSY5Y se realizó sobre material previamente tratado con poli-L-lisina. Las células se cultivaron en DMEM-F12 suplementado con 10% de SFB y 1% de glutamax y 1% de P/S. La diferenciación se indujo sustituyendo el medio de cultivo por DMEM-F12, 5% de SFB, 1% de glutamax, 5  $\mu$ M de ácido retinoico y 1% P/S durante 5 días.



**▪ Marcaje con MitoTracker® Red**

El MitoTracker® Red es un fluorocromo catiónico lipofílico derivado de clorometil-rosamina, que tiene alta especificidad por las mitocondrias, inicialmente se acumula en estos organelos debido a su potencial de membrana negativo, y luego es retenido dentro de la matriz mitocondrial donde el grupo clorometil reacciona con grupos tioles presentes en péptidos y proteínas para formar un conjugado que puede ser fijado con aldehídos (revisado en [312] y artículos allí citados)

- Las células SHSY5Y se sembraron sobre vidrios de microscopía de 12 mm de diámetro, pre-tratados con poli-L lisina a una densidad de 30.000 células/vidrio 12 mm, luego del quinto día de diferenciación el medio fue sustituido por DMEM-F12 fresco (sin suplementar) y las células se trataron con vehículo (0,01 %v/v DMSO), IGF1 150 ng/ml, C2C 10  $\mu$ M o IGF1 por 30 min, seguido de C2C durante 6 h.
- Cumplidos los tiempos de incubación, el medio de cultivo fue sustituido por DMEM-F12 puro (sin antibióticos y sin SFB) precalentado a 37 °C. Las mitocondrias fueron marcadas con MitoTracker® Red CMXRos a una concentración final de 200 nM durante 30 min.
- Luego se hicieron dos lavados con 2 ml de DMEM F-12 puro precalentado a 37 °C y las células se incubaron durante 5 min, este proceso se repitió 3 veces.
- Las células fueron fijadas con PFA al 4 % durante 10 min y permeabilizadas con acetona fría durante 120 s exactos, luego se lavaron 2 veces con 1 ml de PBS y una vez con agua destilada-desionizada estéril, los vidriecillos se montaron en portaobjetos con el medio de montaje con *Hoescht* y los bordes se fijaron con esmalte de uñas.
- Las láminas fueron guardadas en oscuridad a -20 °C hasta el momento de tomar las fotos.

Las imágenes, se adquirieron usando un microscopio confocal Leica DM IRE2 con objetivo de 63X de inmersión en aceite y apertura numérica de 1,4. Se capturaron imágenes de células únicas con un *zoom* de 4X, se registraron 25 secciones ópticas cada 0,1  $\mu$ m, usando de forma independiente el láser HeNe 1 MW (543 nm) para el *MitoTracker® Red* y el láser diodo 17 MW (405 nm) para *Hoescht*. Por cada condición, se seleccionaron 30 células que estuvieran aisladas. Las secciones ópticas de cada célula fueron fusionadas con la proyección de máxima intensidad usando el programa ImageJ, compilación ConfocalUniovi ImageJ. versión 1.51.

**▪ Microscopía de células vivas, marcaje con MitoTracker® Green**

Para evaluar la movilidad mitocondrial, las células SHSY5Y se sembraron en 2 ml de medio de diferenciación, sobre cajas de 35 mm de fondo de vidrio pre-tratadas con poli-L lisina,

a una densidad de 150.000 células/caja. Luego del quinto día de diferenciación el medio fue sustituido por DMEM-F12 fresco (sin suplementar) y las células se trataron con vehículo (0,01 %v/v DMSO), IGF1 150 ng/ml, C2C 10  $\mu$ M o IGF1 por 30 min, seguido de C2C durante 6 h. Una vez cumplido el tiempo de incubación de los diferentes tratamientos, se adicionó el MitoTracker® Green, para esto se preparó a partir de la solución madre [1 mM] en DMSO, una solución patrón de trabajo de [2  $\mu$ M] en DMEM-F12, y se adicionaron 10  $\mu$ l a cada caja, para una concentración final de trabajo de 20 nM. Las células se incubaron durante 20 min a 37 °C. Transcurrido este tiempo, se realizaron dos lavados de 3 min con DMEM-F12 precalentado a 37 °C e inmediatamente se procedió a la tomar las fotos usando el sistema *spinning disk*.

Es necesario tener en cuenta las siguientes recomendaciones: (1) Las células deben estar siempre a 37 °C. (2) El tiempo de incubación con el MitoTracker® Green no debe superar los 20 min, tiempos superiores se asociaron a fusión de las redes mitocondriales y no se observa movilidad. (3) Luego de retirar el mitotracker y lavar las células, las películas e imágenes deben registrarse en el menor tiempo posible, antes de 30 min.

Se tomó 1 foto cada 3 s durante 3 min, con un aumento de 60X. La secuencia de fotos fue analizada usando el plugin Multi Kymograph de Image J win 64 FIJI.

#### ▪ **Western blot y microscopía electrónica**

Para analizar las proteínas de fusión-fisión mitocondrial, así como las relacionadas con la vía de supervivencia PI3K/AKT. Y para el análisis por microscopía electrónica de transmisión, se siguió el siguiente procedimiento:

Las células se sembraron en cajas de Petri de 10 cm de diámetro tratadas con poli-L-lisina, a una densidad de 1.000.000 células/plato, en DMEM-F12 (10% SFB, 1% de glutamax, 1% de P/S), 24 horas luego el medio era sustituido por medio de diferenciación. Luego del quinto día de diferenciación, el medio se sustituyó por DMEM libre de suero y se aplicaron los diferentes tratamientos: vehículo (0,01 %v/v DMSO), IGF1 150 ng/ml, C2C 10  $\mu$ M, C2C 50  $\mu$ M o IGF1 (150 ng/ml) por 30 min, seguido de C2C (10  $\mu$ M o 50  $\mu$ M) durante 6 h.

Luego de la incubación con los diferentes tratamientos, se lavó la monocapa 1 vez con PBS estéril. (1) Las células destinadas para análisis por *western blot* se tripsinizaron y se siguió el protocolo estándar descrito en el capítulo 3. (2) Las células usadas en microscopía, se desprendieron mecánicamente con un raspador o rastrillo, se centrifugaron a 900 rpm, se descartó el sobrenadante y el *pellet* fue procesado en el departamento de neuropatología de UKE por el Prof. Dr. Christian Hagel (*Assistant Medical Director*).

#### 4.4.4 Análisis de viabilidad celular de células CAD

La viabilidad fue analizada por tres métodos, se midió: (1) Actividad mitocondrial por MTT, (2) % de liberación de LDH y (3) marcaje con AV/IP mediante citometría de flujo.

En el capítulo 3, se describe la metodología utilizada para los ensayos de MTT y de liberación de LDH.

- **Citometría de flujo ensayo de muerte celular con anexina V-Alexa fluor 488 y yoduro de propidio**
- Las células CAD shControl, CAD shPINK1 y CAD shParkin se cultivaron durante 3 días en medio de diferenciación, sobre platos de 6 pozos pre-tratados con Poli-L-Lisina (200.000 células/caja), posteriormente se aplicaron los tratamientos.
- Los tratamientos consistieron en: IGF1 (100 ng/ml), C2C (25  $\mu$ M), IGF1 (100 ng/ml) por 30 min + C2C (25  $\mu$ M), C2C (10  $\mu$ M), IGF1 (100 ng/ml) por 30 min + C2C (10  $\mu$ M), SFB (10 %) y HBSS. El tiempo de incubación fue de 6 horas para todos.
- Adicionalmente como control de tratamiento, las células se incubaron con 0,1 % v/v de DMSO (vehículo donde se diluyó la C2C).
- Se prepararon tres controles adicionales: (1) Control sin tinción (para ubicar la población de estudio en la gráfica FSC-SSC); (2) control positivo de necrosis ( $H_2O_2$  10 mM por 2 h); (3) control positivo de apoptosis (estaurosporina 250 nM por 2 h). Las concentraciones de estaurosporina y  $H_2O_2$  usadas como controles fueron estandarizadas previamente (véase anexo C).
- Una vez cumplidos los tiempos de incubación, se retiró el medio y la monocapa se lavó 1 vez con PBS frío.
- Las células se desprendieron con 200  $\mu$ l tripsina 1X durante 1 o 2 min.
- La tripsina fue neutralizada, adicionando 1 ml de DMEM con 10% de SFB, las células se recogieron en tubos eppendorf de 1,5 ml.
- Se siguió el protocolo recomendado por el fabricante del kit, Alexa Fluor® 488 annexin V/Dead Cell Apoptosis Kit with Alexa® Fluor 488 annexin V and PI for Flow Cytometry V13245 de invitrogen, con algunas modificaciones descritas a continuación:
- Las células se centrifugaron a 1200 rpm durante 3 min a 4°C y se lavaron 1 vez con PBS frío.
- Se descartó el sobrenadante y los *pellets* fueron resuspendidos en 200  $\mu$ l de *buffer binding 1X annexin* para una densidad de  $10^6$  células/ml.
- Se adicionaron 10  $\mu$ l de la solución Alexa Fluor® 488 annexin V y 2  $\mu$ l de la solución de trabajo de yoduro de propidio 100  $\mu$ g/mL.
- Las células se incubaron durante 15 min a temperatura ambiente.
- Luego de la incubación, las células se centrifugaron 1200 rpm durante 3 min a 4°C, se retiró el sobrenadante y se adicionaron 500  $\mu$ l de *buffer binding 1X annexin* frío o un

*buffer* de lavado preparado en el laboratorio (10 mM de HEPES, 140 nM NaCl, 2,5 nM CaCl<sub>2</sub> a pH 7,4).

- Se volvieron a centrifugar (1200 rpm durante 3 min a 4°C), se retiró el sobrenadante y el *pellet* fue resuspendido en 1 ml de *buffer binding 1X anexin* frío.
- Los tubos fueron mantenidos en hielo hasta el momento de la lectura.
- La lectura se realizó en el laboratorio de los Servicios Médicos Yunis Turbay en Bogotá, bajo la supervisión del Dr Juan José Yunis, en un citómetro acústico Attune Flow Cytometry, Life Technologies.
- La compensación del equipo se hizo con perlas, se usó el filtro PE para leer yoduro de propidio y el filtro FITC para leer anexina V-488. Se registraron 10.000 eventos por condición
- Los datos fueron analizados usando el software Flow Jo V10, para detalles, véase anexo D.

#### **4.4.5 Análisis del efecto del silenciamiento de PINK1 y Parkin sobre proteínas implicadas en vía PI3K/AKT activada por IGF1 y bajo un contexto neurotóxico inducido por C2C.**

Las células CAD shControl, CAD shPINK1 y CAD shParkin fueron cultivadas sobre cajas pre-tratadas con Poli-L-Lisina de 3,5 cm de diámetro (250.000 células/caja). Las células se trataron con vehículo (DMSO 0,01 % v/v), IGF (100 ng/ml), C2C (25 µM) o IGF1 (100 ng/ml) por 30 min + C2C (25 µM) durante 6 h. Adicionalmente las células CAD shControl y CAD shPINK1 fueron tratados con IGF1 (100 ng/ml) durante 15 min, 1 h o 6 h.

En todos los casos se siguió el protocolo estándar de *western blot* (descrito en el capítulo 3), en general, se analizaron las siguientes proteínas: AKT total, pAKT (S473), mTOR total, p mTOR (S2448), ERK 1/2 total, pERK 1 (T202), pERK 2 (Y204), Rictor total, pRictor (T1135), pJNK (T183/Y185), P38 total, pP38 (T180/Y182), IGF1R total, pIGF1R (Y1161), pIRS1 (S636/S639), pGSK3β (S9) y HK. Como control de carga se utilizó β-actina.

## **4.5 Resultados**

Inicialmente se determinó el día de diferenciación de las células CAD en el cual se realizarían los experimentos posteriores. Para esto, las células CAD se cultivaron durante 4 días en medio de diferenciación. Cada día se extrajo proteína para evaluar por *western blot* algunas asociadas a diferenciación neuronal como: PSD95, una proteína postsináptica; Sinapsina 1, una proteína asociada a las vesículas sinápticas; RhoGAP29, un inhibidor de RhoA, esta última se asocia a un efecto negativo sobre la formación y

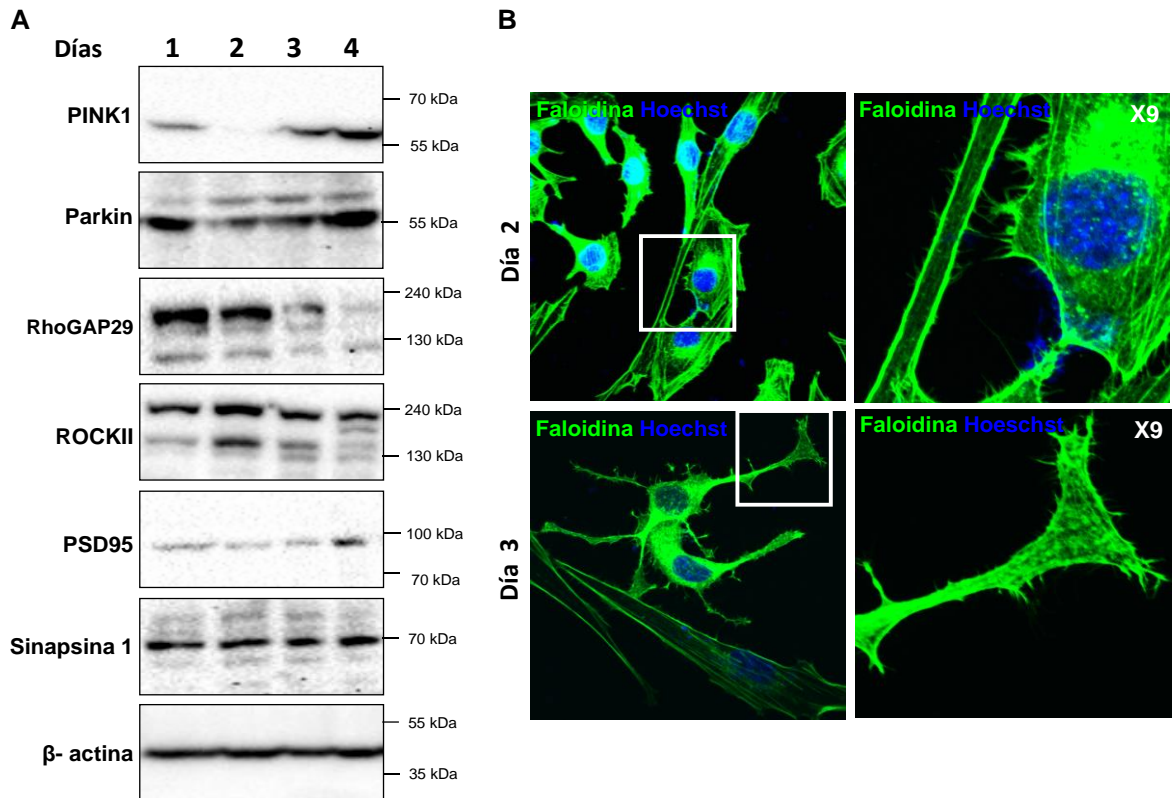
mantenimiento de espinas dendríticas [313], ROCKII la proteína efectora de la actividad de RhoA, PINK1 y Parkin.

Los resultados indicaron que luego de tres días de cultivo en medio de diferenciación las células CAD mostraron formación de procesos tipo neuritas, asociados a diferenciación neuronal (véase figura 4.5 B) y mayores niveles de expresión de PINK1 y Parkin, así mismo se apreció un incremento en la expresión de PSD95 (véase figura 4.5 A). Un hallazgo importante fue que luego del día tres los niveles del inhibidor de RhoA (RhoGAP29) disminuyeron, mientras que los de su efector (ROCKII) mostraron una leve tendencia a disminuir (véase figura 4.5 A). Este resultado sin duda fue inesperado ya que previos estudios han reportado que la inhibición de RhoA es un evento importante en la diferenciación neuronal [314]. En ese sentido nosotros esperábamos que a medida que el proceso de diferenciación se fuera estableciendo, se incrementaran los niveles del inhibidor de RhoA (RhoGAP29) y disminuyeran los de su efector corriente abajo ROCKII; sin embargo, observamos una disminución drástica en RhoGAP29 que no se asoció a un incremento en ROCKII. Esto nos hace pensar en dos cosas: (1) que RhoGAP29 en este modelo no es específica de RhoA, y por lo tanto su disminución no se asocia a un incremento en la actividad de RhoA, o (2) que el proceso de diferenciación de esta línea neuronal depende más de Rac, la cual actúa de forma opuesta a RhoA para regular la maduración neuronal (revisado en [315]).

Teniendo en cuenta que a partir del tercer día de supresión de SFB, las células CAD adquirirían morfología similar a neuronas, todos los experimentos de este trabajo (a menos que se especifique lo contrario), se realizaron entre el tercer y cuarto día de diferenciación, cuando las células CAD tuvieron mayor expresión de PINK1 y Parkin, morfológicamente presentaron prolongaciones citoplasmáticas tipo neuritas y adicionalmente mostraron expresión de proteínas pre y post-sinápticas.

#### **4.5.1 El silenciamiento de PINK1 afectó la diferenciación neuronal de las células CAD**

Basado en la información anterior se decidió conocer si el silenciamiento de PINK1 o de Parkin afectaba la diferenciación morfológica de las células CAD. Se apreció que las células silenciadas para PINK1, tuvieron menos prolongaciones tipo neuritas en comparación con las células CAD shControl (véase figura 4.6 A). En cuanto a las células silenciadas para Parkin, éstas también mostraron diferencias morfológicas comparadas con las células control, pero no fueron tan evidentes como en las silenciadas para PINK1. En ambos casos los cambios morfológicos no se relacionaron con diferencias en la expresión de ROCKII o RhoGAP29 al cuarto día de suprimir el SFB (véase figura 4.6 A).



**Figura 4.5** Las células CAD incrementan la expresión de PINK1 y Parkin luego del tercer día de diferenciación

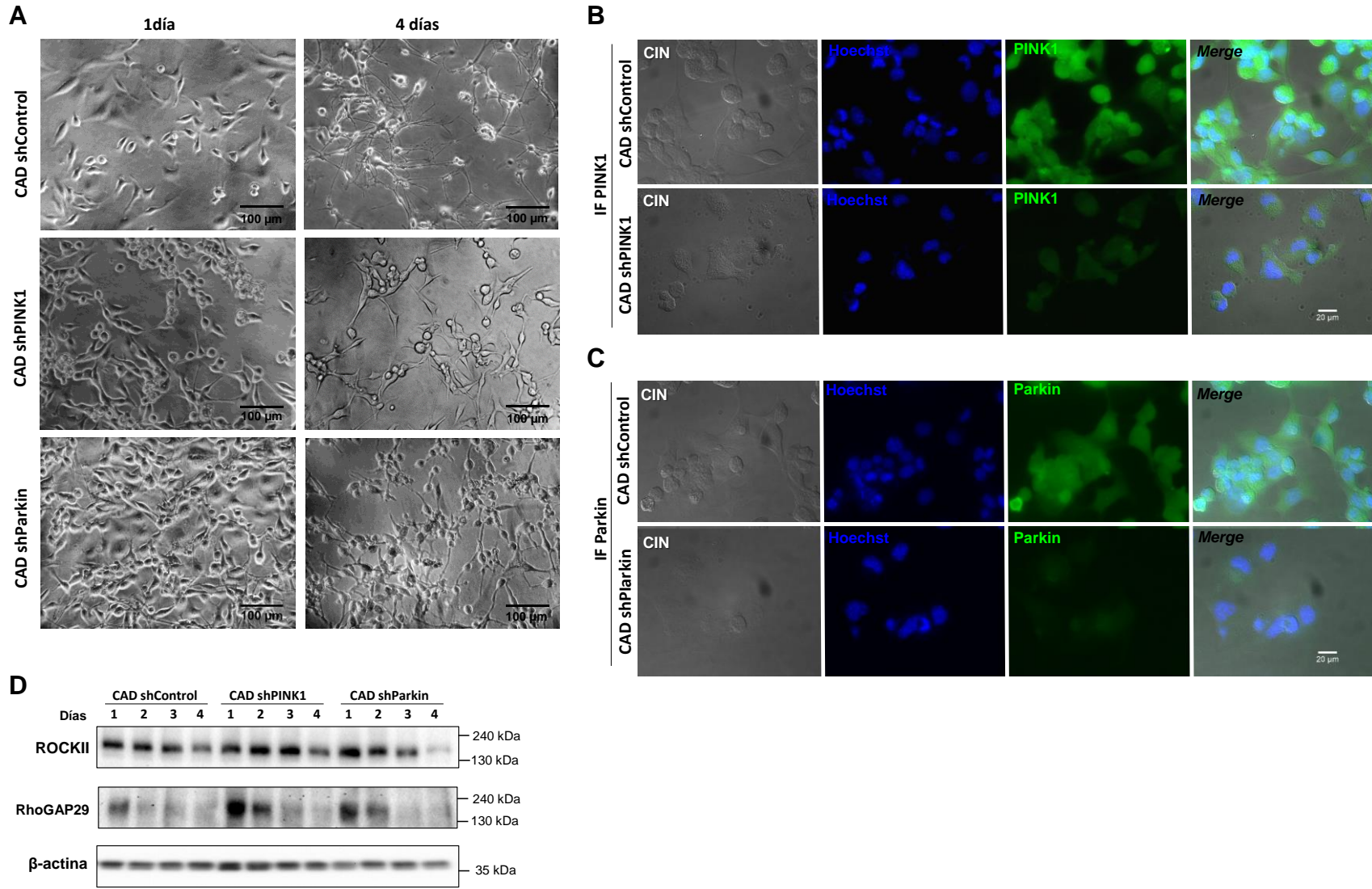
(A) *Western blot* de células CAD cultivadas durante 4 días en medio de diferenciación, se analizaron las siguientes proteínas: PINK1, Parkin, proteínas asociadas a remodelación de actina (RhoGAP29 y ROCKII), la proteína de postsinapsis PSD95 y la proteína de presinapsis, sinapsina 1. (B) Microfotografías confocales con objetivo 60X, de células CAD, luego de 2 y 3 días de diferenciación. En verde Faloidina, núcleos en azul marcados con *Hoescht*.

Se apreció que en los días 1 y 2 los niveles de ROCKII y RhoGAP29 estuvieron más elevados en las células silenciadas para PINK1 y Parkin; es posible que este hecho retarde el proceso de diferenciación morfológico en las neuronas CAD. Sin embargo, no se pudo realizar el análisis luego del quinto día, pues las células silenciadas se desprendieron, incluso cuando éstas fueron sembradas sobre polilisina o matrigel. Esto indicó que en nuestro modelo de estudio, el silenciamiento de PINK1 afectó la diferenciación morfológica de las neuronas CAD. Sin embargo, el mecanismo molecular que regula el proceso de diferenciación en las células CAD es desconocido lo cual dificultó la interpretación de los resultados. Por esta razón actualmente estamos evaluando el efecto del silenciamiento de PINK1 sobre la maduración de espinas dendríticas en cultivos primarios de neuronas hipocampales de ratón. Los resultados preliminares se muestran en el anexo F.

**Figura 4.6 El silenciamiento de PINK1 o Parkin altera la diferenciación de células CAD**

**(A)** Microfotografías de células CAD. Luego de 1 o 4 días en medio de diferenciación. **(B)** Verificación de la expresión de PINK1 por inmunofluorescencia (IF) de células CAD shControl y CAD shPINK1 luego de tres días de diferenciación. **(C)** Verificación de la expresión de Parkin por IF de células CAD shControl y CAD shParkin luego de tres días de diferenciación. **(D)** *Western blot* de ROCKII, RhoGAP29 y  $\beta$ -actina de células CAD shControl, CAD shPINK1 y CAD shParkin, cultivadas en medio de diferenciación hasta por 4 días. (Días: se refiere a los días de cultivo en medio de diferenciación). CIN: Contraste de interferencia de Nomarski. (Página siguiente)

Figura 4.6 (continuación)





### **4.5.2 El silenciamiento de PINK1 afecta la actividad mitocondrial y disminuye la tasa de crecimiento de las células CAD.**

El siguiente paso fue conocer el efecto que tenía el silenciamiento de PINK1 o Parkin, sobre la tasa de crecimiento de las células CAD, así como su actividad mitocondrial. Para esto se hizo una curva de crecimiento durante 6 días de cultivo en medio DMEM con glucosa o en DMEM sin glucosa suplementado con galactosa.

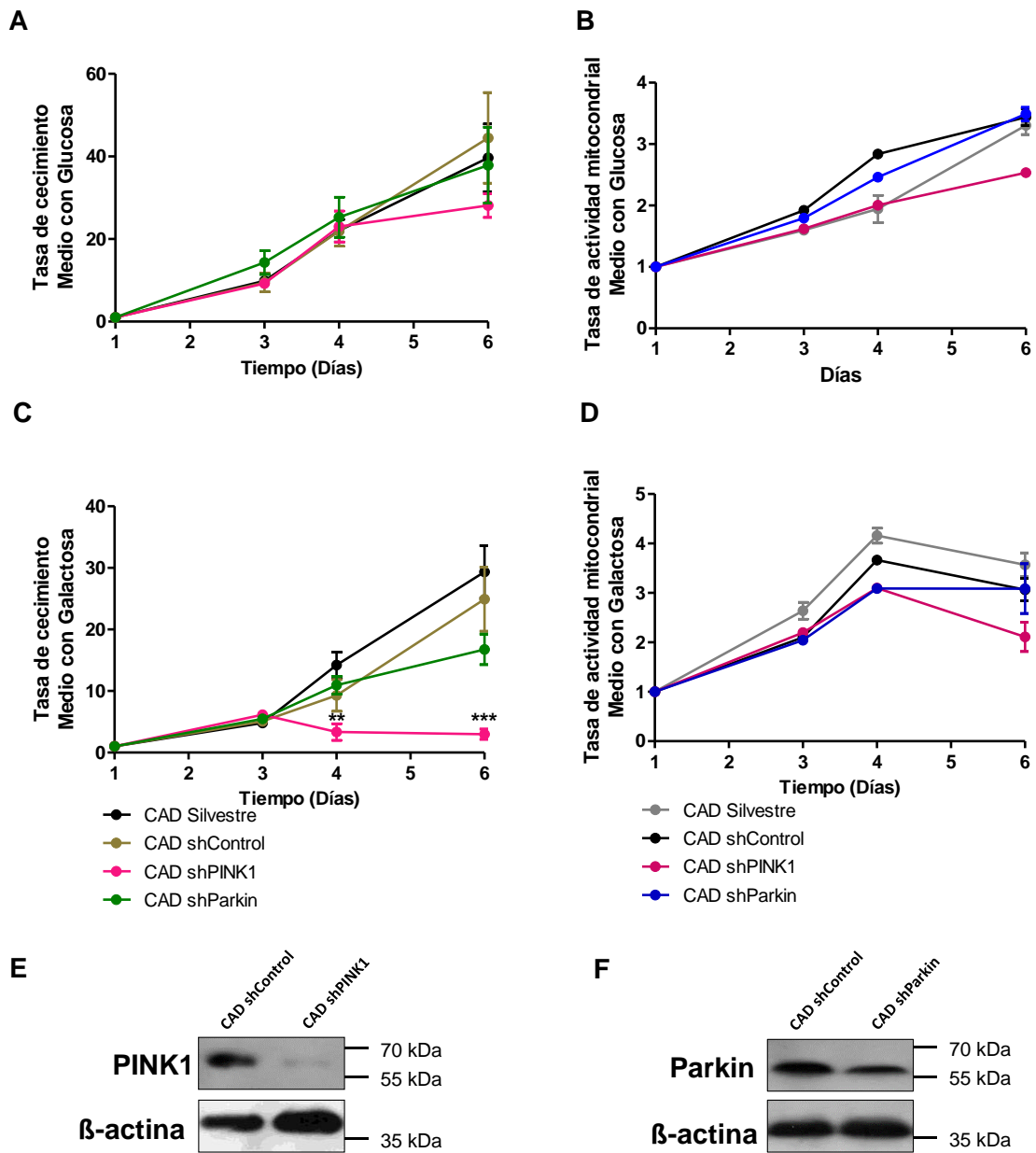
Las células en cultivo obtienen energía principalmente de la glicólisis, es así que aun cuando exista una alteración en la cadena respiratoria, éstas pueden crecer. El metabolismo de la galactosa por glicólisis es mucho más lento que el de la glucosa, esto hace que las células deban oxidar piruvato a través del ciclo de Krebs y produzcan ATP a través de la cadena respiratoria. Es decir, que células con cadenas respiratorias deficientes tendrán alteraciones en el crecimiento cuando se pongan en medio con galactosa ([316] y referencias allí citadas).

Los resultados de las curvas de crecimiento mostraron que las células CAD silenciadas para PINK1 luego del cuarto día de cultivo tuvieron una menor tasa de crecimiento en el medio con glucosa. Sin embargo, este hallazgo no fue significativo desde el punto de vista estadístico (véase figura 4.7 A). Este resultado se correlacionó con una menor actividad mitocondrial medida por la formación de formazán utilizando MTT (véase figura 4.7 B).

En general, cuando las células CAD se cultivaron en medio con galactosa, disminuyeron la tasa de crecimiento, comparada con la observada en los cultivos realizados en medio con glucosa (véase figura 4.7 A y C), resaltando la importancia del metabolismo de la glucosa en el de esta línea neuronal. Sin embargo, las células silenciadas para PINK1, luego del tercer día de cultivo detuvieron su crecimiento (véase figura 4.7 C). Este resultado es consistente con previos estudios que demostraron que la deficiencia de PINK1 altera la respiración mitocondrial y activa mecanismos metabólicos adaptativos como el incremento de la glicólisis [317-319]. Se ha reportado que el bloqueo de la glicólisis en MEF deficientes de PINK1 induce una rápida muerte celular [317].

En conclusión el silenciamiento de PINK1, retardó el crecimiento celular en presencia de glucosa e impidió la progresión del cultivo en presencia de galactosa. Estos cambios se asociaron a una menor actividad mitocondrial, lo cual fue un primer indicador, que en el modelo de células CAD, el silenciamiento de PINK1 alteró la función mitocondrial.

En cuanto a las células silenciadas para Parkin, éstas no mostraron diferencias en sus tasas de crecimiento o actividad mitocondrial comparadas con las células CAD silvestres y CAD shControl en las condiciones antes mencionadas (véase figura 4.7).



**Figura 4.7 El silenciamiento de PINK1 afecta la tasa de crecimiento de las células CAD**

Tasa de crecimiento de células CAD silvestres, CAD shControl, CAD shPINK1 y CAD shParkin en medio de cultivo con glucosa (**A**) o galactosa (**C**). Tasa de actividad mitocondrial medida por ensayo de MTT de células CAD silvestres, CAD shControl, CAD shPINK1 y CAD shParkin en medio de cultivo con glucosa (**B**) o galactosa (**D**), (**A**) y (**C**) los datos representan medias  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes ( $n=4$  por cada experimento) (**B**) y (**D**) los datos representan medias  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes ( $n=7$  por cada experimento). Verificación del silenciamiento por *western blot* de PINK1 (**E**) y Parkin (**F**).

### **4.5.3 El tratamiento con C2C produce fisión mitocondrial, alteraciones en la ultraestructura mitocondrial, inhibición de la vía PI3K/AKT y disminución de la movilidad de las mitocondrias**

Teniendo en cuenta que los objetivos de este trabajo involucraban un contexto neurotóxico inducido por C2-Ceramida. Era necesario conocer el efecto de la C2-ceramida sobre el modelo celular. Estos experimentos se realizaron durante una estancia corta en el laboratorio del *Institut für Neuropathologie Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf* en Alemania. Sin embargo, no fue posible realizarlos en el modelo de células CAD, debido a que para ese entonces esta línea celular no era comercial y el proceso administrativo de importación y traslado del material biológico no se pudo realizar. Por lo anterior se escogió el modelo de células SHSY5Y una línea celular derivada de neuroblastoma humano que expresa marcadores de neuronas dopaminérgicas y ha sido usada ampliamente en estudios de EP [320, 321].

Se estandarizó la metodología de diferenciación de la línea SHSY5Y, para lo cual se probaron diferentes concentraciones de SFB y ácido retinoico durante 10 días de cultivo, hasta encontrar la combinación que en el menor tiempo produjera menos desprendimiento celular y células con prolongaciones tipo neuritas. Luego de 5 días de cultivo en medio DMEM-F12 suplementado con 5% de SFB, 1% de Glutamax TM y 5 $\mu$ M de ácido retinoico (el medio se reemplazaba cada 48 horas) se obtuvieron cultivos con más del 90% de células con características morfológicas tipo neuronal (véase figura 4.8 A).

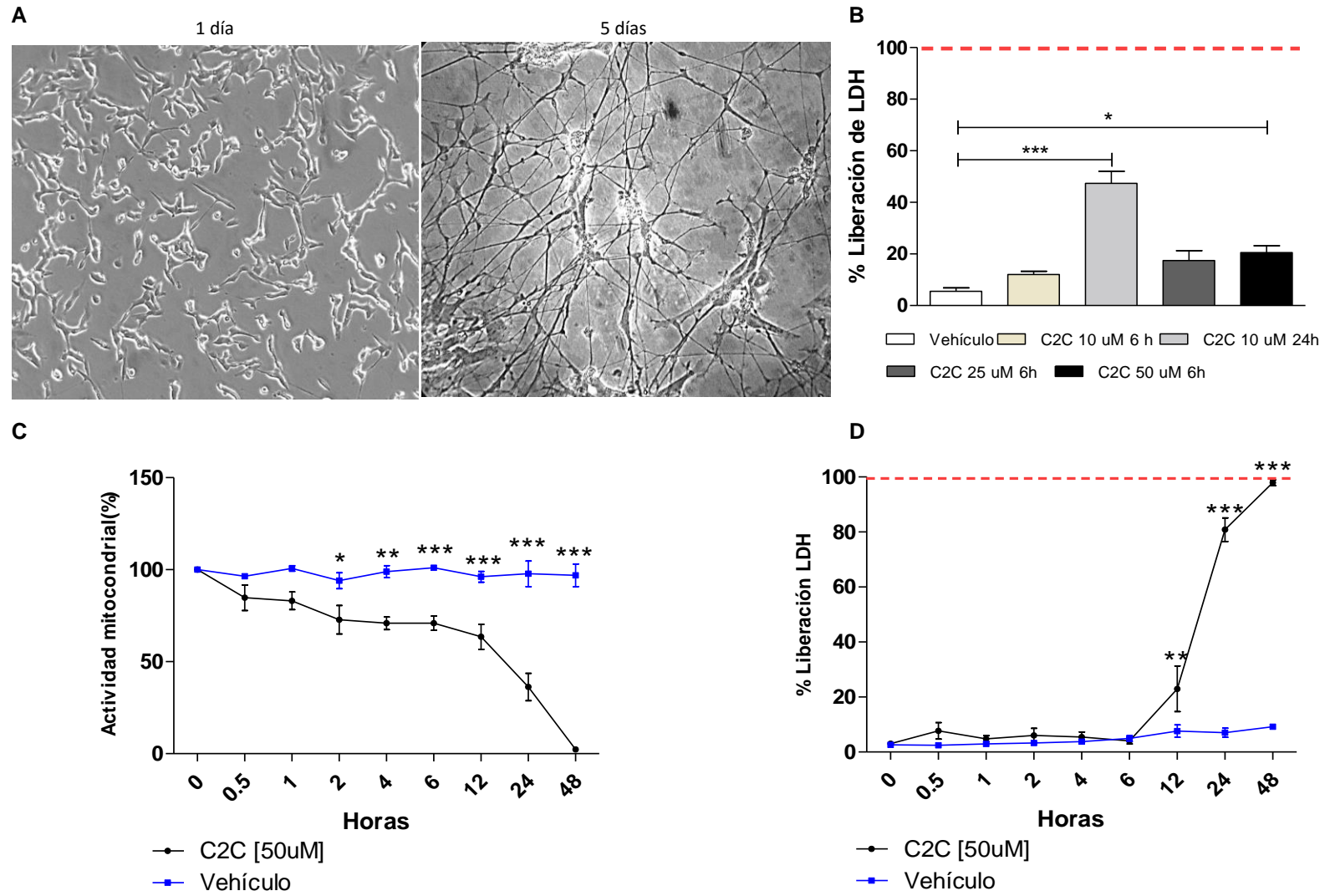
Una vez estandarizada la diferenciación de las células, se comenzaron los experimentos. Luego del quinto día de cultivo, se retiraba el medio de diferenciación, se lavaba la monocapa dos veces con PBS precalentado a 37°C y el medio era sustituido por DMEM-F12 libre de SFB; se esperaban dos horas para estabilizar el cultivo y se procedía a aplicar los tratamientos.

Se probaron dos dosis de C2C (10  $\mu$ M) y (50  $\mu$ M) durante 6 h, IGF1 (150 ng/ml) durante 6h; también se realizó un pre-tratamiento con IGF1 (150 ng/ml) durante 30 min antes de adicionar C2C (10  $\mu$ M) por 6 h. Se evaluó: (1) Viabilidad con el protocolo de LDH. (2) Actividad mitocondrial mediante ensayo de MTT. (3) Expresión por *western blot* de PINK1 y Parkin, proteínas de la vía PI3K/AKT y proteínas de dinámica y movilidad mitocondrial. (4) Morfología de la red mitocondrial por microscopía confocal usando mitotracker red. (5) Morfología mitocondrial por microscopía electrónica y (6) ensayos de movilidad mitocondrial, usando *Mitotracker Green* mediante microscopía confocal *in vivo*.

**Figura 4.8 El tratamiento con C2C induce muerte de las células SHSY5Y**

**(A)** Microfotografías de células SHSY5Y al día 1 y 5 de cultivo en medio de diferenciación, al día 5 se observan procesos tipo neuritas lo cual es un indicador de diferenciación neuronal. **(B)** % de liberación de LDH de células SHSY5Y diferenciadas tratadas con Vehículo (0,1 % DMSO), C2C 10  $\mu$ M por 6 h, C2C 10  $\mu$ M por 24 h, C2C 25  $\mu$ M por 6 h y C2C 50  $\mu$ M por 6 h. **(C)** Actividad mitocondrial medida por ensayo de MTT de células SHSY5Y diferenciadas y tratadas con C2C (50  $\mu$ M) o vehículo (DMSO 0,1 %) hasta por 48 h **(D)** % de liberación de LDH de células SHSY5Y diferenciadas y tratadas con C2C (50  $\mu$ M) o vehículo (DMSO 0,1 %) hasta por 48h. Los datos representan medias  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes. ANOVA de 1 vía \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ . (Página siguiente).

Figura 4.8 (continuación)



El efecto de la C2C sobre la viabilidad de las SHSY5Y, se evaluó midiendo la liberación de LDH, se probaron concentraciones de dosis letal 50 reportadas previamente para células CAD, (25  $\mu\text{M}$  durante 6 h y 10  $\mu\text{M}$  durante 24 h) [322], adicionalmente se ensayaron 10  $\mu\text{M}$  y 50  $\mu\text{M}$  durante 6 h (véase figura 4.8 B). La dosis de 10  $\mu\text{M}$  de C2C durante 24 h incrementó significativamente la liberación de LDH hasta 47 %, por otro lado la dosis de 50  $\mu\text{M}$  durante 6 h produjo un 20 % de liberación de LDH (véase figura 4.8 B).

Teniendo en cuenta los anteriores resultados se escogieron dos dosis cuyo efecto no superaba el 20% de muerte celular, la de 10  $\mu\text{M}$  durante 6 h que produjo alrededor de un 10 % de muerte y la de 50  $\mu\text{M}$  por 6 h que indujo un 20 % de muerte.

El tratamiento con 10  $\mu\text{M}$  de C2C incrementó el número de células con redes mitocondriales fraccionadas (véase figura 4.9 A) y el pre-tratamiento con IGF1 revirtió parcialmente tal efecto. Estos cambios no estuvieron asociados a modificaciones en los niveles de expresión de *PINK1* o *Parkin* (véase figura 4.10 A, E y F), tampoco a alteraciones en la expresión de proteínas asociadas a dinámica y movilidad mitocondrial como *OPA1* (del inglés, *optic atrophy 1*), *MFN1/2* (del inglés, *mitofusin 1 and 2*), *pDRP1* (del inglés, *dynamin-related protein 1*) y *MIRO* (véase figura 4.10 C, D, K-N).

Aun cuando se observó una disminución del 40% de la fosforilación de *AKT*, no se observaron cambios significativos estadísticamente en las proteínas de la vía de supervivencia *PI3K/AKT* (véase figura 4.10 B y G). Por otro lado, el tratamiento con IGF1, activó la vía de supervivencia *PI3K/AKT*, lo cual se evidenció por el incremento significativo en la fosforilación de *AKT* y algunos de sus blancos corriente abajo como *GSK3 $\beta$* , *mTOR* y *Rictor* (véase figura 4,10 B, G-J).

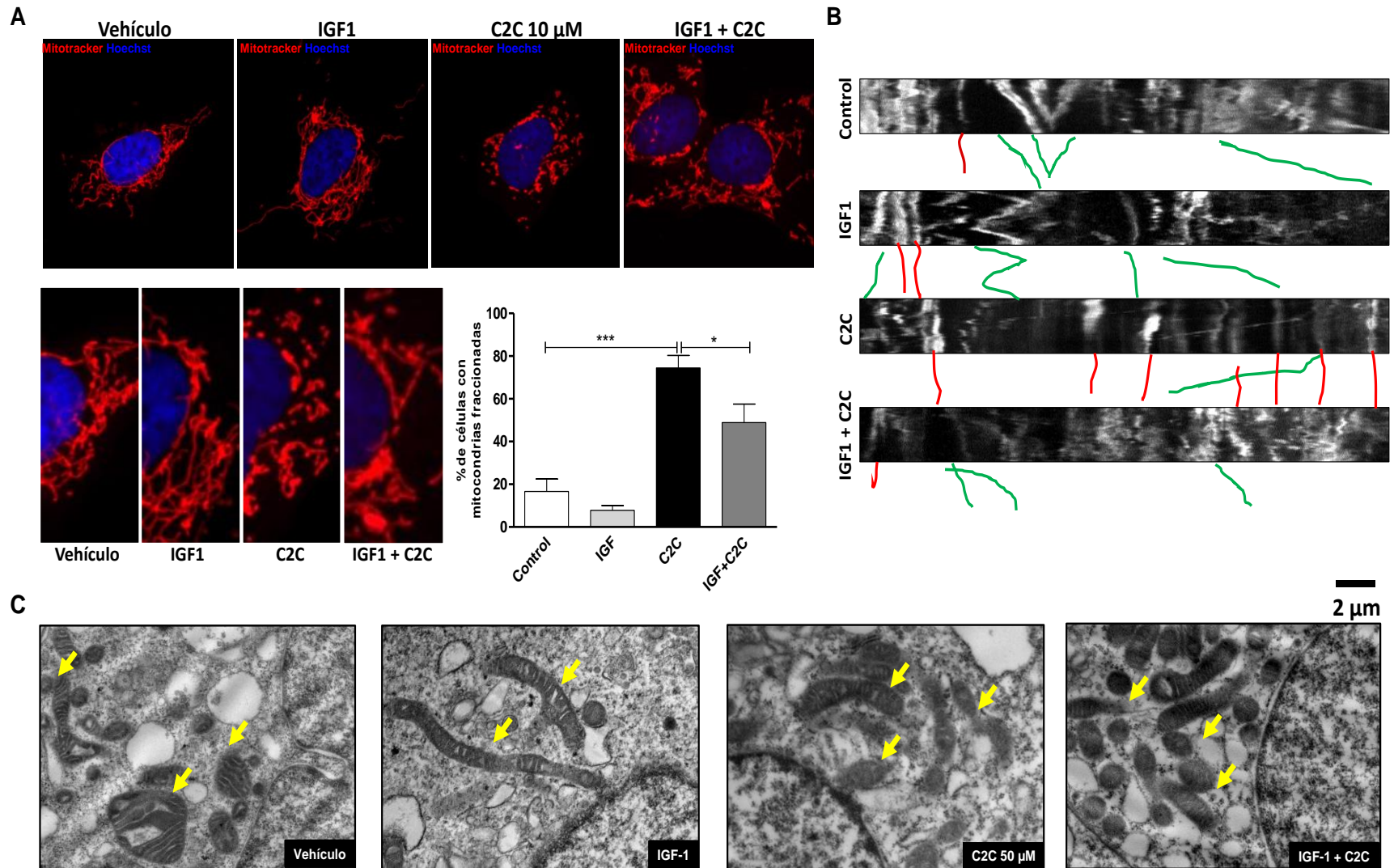
No se evidenciaron cambios en los niveles de expresión de la proteína *MIRO*. Un análisis cualitativo de la movilidad mitocondrial mostró que la dosis de 10  $\mu\text{M}$  de C2C por 6 h, disminuyó la movilidad general de las mitocondrias y que el pre-tratamiento con IGF1 rescató parcialmente el movimiento (véase figura 4.9 B).

Cuando se ensayó la dosis más alta de C2C (50  $\mu\text{M}$ ) se observó una disminución significativa ( $p < 0,05$ ) en el nivel de *PINK1*, que no fue impedida por el pre-tratamiento con IGF1; y no se observaron cambios en los niveles de *Parkin* en ninguno de los tratamientos (véase figura 4.11 A, E y F).

**Figura 4.9 El tratamiento con C2C produce fisión mitocondrial e inhibe la movilidad mitocondrial en células SHSY5Y y el pretratamiento con IGF1 previene parcialmente tal efecto.**

**(A)** Microfotografías representativas de células SHSY5Y, tratadas durante 6 horas con vehículo (0,01 % DMSO), IGF1 150 ng/ml, C2C 10  $\mu$ M o IGF1 por 30 min, seguido de C2C durante 6 h. Las mitocondrias fueron marcadas con MitoTracker® Red CMXRos y lo núcleos con *Hoescht*. % de células con mitocondrias fraccionadas. Los datos representan medias de 200 células contadas, provenientes de 2 experimentos independientes. **(B)** Quimogramas representativos generados a partir de películas de microscopía confocal *in vivo*, en el eje de las X se representa la posición de las mitocondrias y en Y está representado el tiempo (dos experimentos independientes). Las líneas verticales brillantes representan mitocondrias estacionarias y se representaron con trazos rojos, las mitocondrias en movimiento se ven como trazos diagonales que fueron representados con líneas verdes. **(C)** Microfotografías representativas de dos experimentos independientes, microscopía electrónica de transmisión de células SHSY5Y tratadas por 6 h con vehículo (DMSO 0,1%), IGF1 (150 ng/ml), C2C (50  $\mu$ M) e IGF1 durante 30 min seguido de C2C durante 6 h. Las flechas amarillas señalan mitocondrias. (Página siguiente).

Figura 4.9 (continuación)

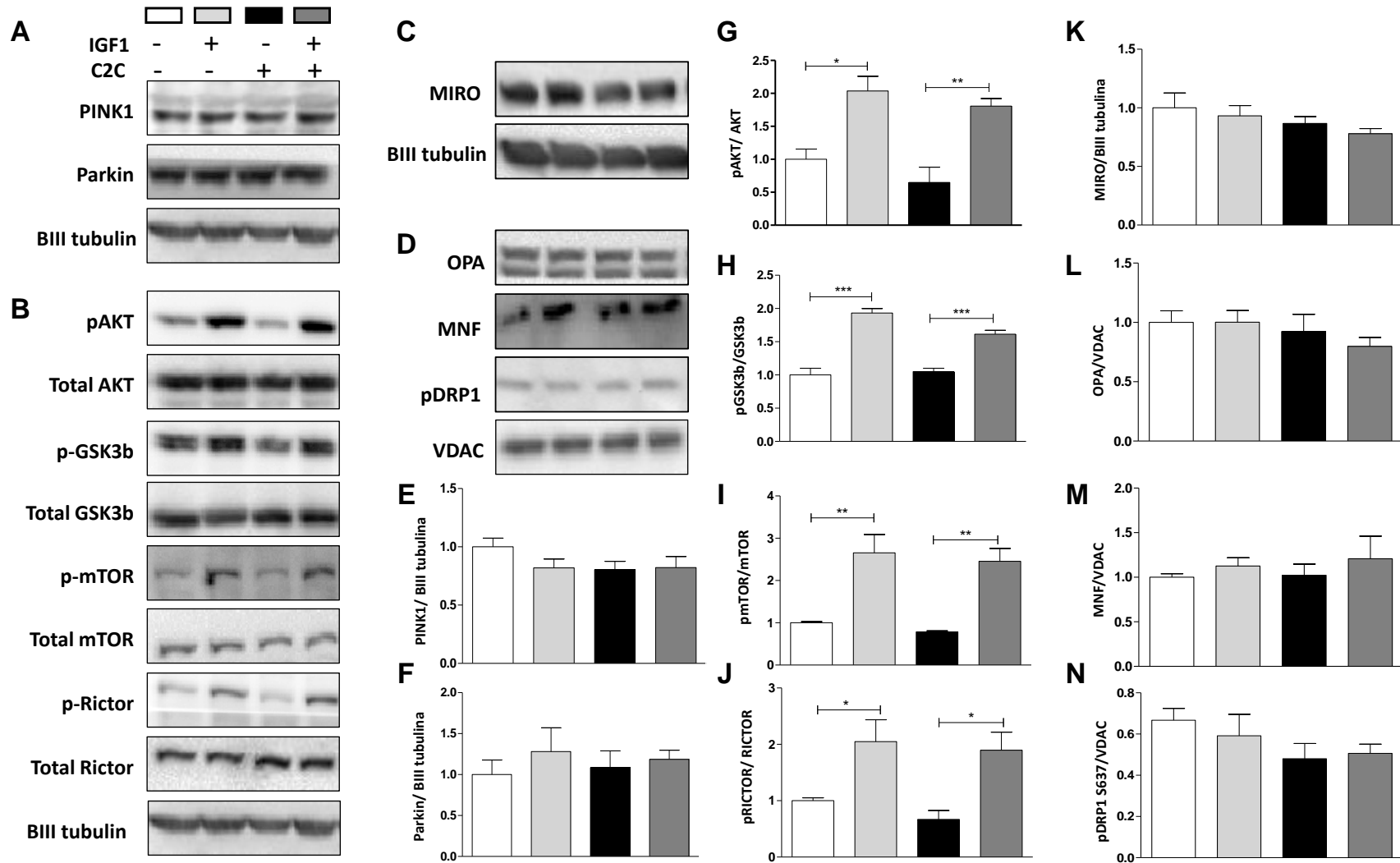




**Figura 4.10 El tratamiento con C2C (10  $\mu$ M) disminuye la fosforilación de AKT sin alterar las proteínas de dinámica mitocondrial en células SHSY5Y**

*Western blot* representativos de **(A)** PINK1 y Parkin **(B)** vía de señalización PI3K/AKT **(C)** MIRO y **(D)** proteínas de dinámica mitocondrial de células SHSY5Y tratadas durante 6 h con C2C 10  $\mu$ M. Desde (E) a (N) gráficas de densitometrías, todos los datos fueron normalizados respecto a las células SHSY5Y tratadas con vehículo y representan medias  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes. Se realizó Anova de una vía y para comparaciones múltiples se aplicó la prueba de contrastes *T* de Bonferroni \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  y \*\*\*  $p < 0,001$ . (Página siguiente).

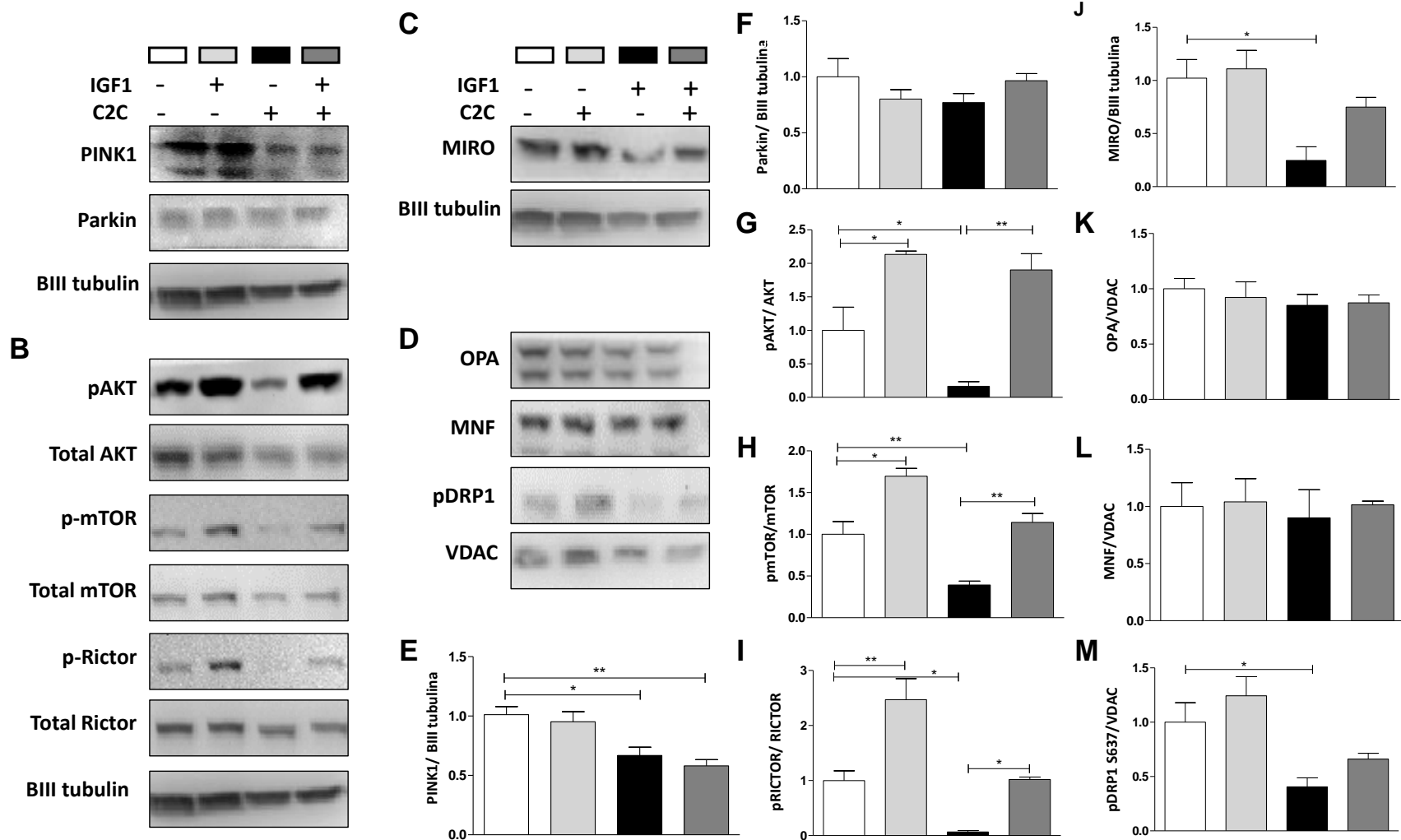
Figura 4.10 (continuación)



**Figura 4.11 El tratamiento con C2C (50  $\mu$ M) inhibe la vía PI3K/AKT y disminuye los niveles de MIRO, pDRP1 (S637) así como de PINK1 en células SHSY5Y**

*Western blot* representativos de **(A)** PINK1 y Parkin **(B)** vía de señalización PI3K/AKT **(C)** MIRO y **(D)** proteínas de dinámica mitocondrial de células SHSY5Y tratadas durante 6 h con C2C 50  $\mu$ M. Desde **(E)** a **(N)** gráficas de densitometrías, todos los datos fueron normalizados respecto a las células SHSY5Y tratadas con vehículo y representan medias  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes. Se realizó Anova de una vía y para comparaciones múltiples se aplicó la prueba de contrastes *T* de Bonferroni \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  y \*\*\*  $p < 0,001$ . (Página siguiente).

Figura 4.11 (continuación)



Adicionalmente esta dosis de ceramida inhibió la vía PI3K/AKT, observándose una caída estadísticamente significativa en la activación de AKT y de sus blancos corriente abajo mTOR y Rictor. En este caso el pre-tratamiento con IGF1 protegió parcialmente a las células SHSY5Y de la inhibición de la vía PI3K/AKT inducida por C2C (véase figura 4.11 B, G- I).

Con respecto a las proteínas de dinámica y movilidad mitocondrial, se observó una disminución significativa en los niveles de MIRO ( $p < 0,05$ ) así como en la fosforilación de DRP1 ( $p < 0,05$ ), y no se observaron cambios en OPA1 o MNF (véase figura 4.11 C, D, J- M). Adicionalmente se observaron alteraciones en la estructura mitocondrial. El análisis de microscopía electrónica mostró que el tratamiento con C2C indujo una pérdida de la definición de las crestas mitocondriales y estos cambios sólo fueron prevenidos parcialmente por el pre-tratamiento con IGF1 (véase figura 4.9 C).

Teniendo en cuenta que los cambios inducidos por la dosis de 50  $\mu$ M de C2C, sólo produjeron un 20% de liberación de LDH (véase figura 4.8 B), se decidió evaluar el efecto sobre la viabilidad de estas alteraciones a tiempos posteriores. Para esto se realizó la medición de la liberación de LDH y actividad mitocondrial por MTT hasta 48 h posteriores a la exposición con C2C. Se observó que luego de las 6 h, empieza un proceso de disminución de la actividad mitocondrial asociado a un incremento en la liberación de LDH, donde a las 24 h la muerte celular observada es de casi un 80 % (véase figura 4.8 C y D).

En conclusión la ceramida produce muerte neuronal inicialmente disminuyendo la activación de AKT e impactando negativamente la mitocondria al generar fisión mitocondrial y disminuir la movilidad mitocondrial. Dosis mayores afectan más drásticamente la vía PI3K/AKT, disminuyen MIRO y pDRP1, además altera la estructura de la MIM. La activación de AKT mediada por IGF1, es capaz de proteger a las neuronas SHSY5Y de la acción de la C2C a nivel de la vía PI3K/AKT, así como evitar parcialmente la disminución de MIRO. Adicionalmente el tratamiento con C2C disminuyó significativamente los niveles de PINK1.

Estos resultados demuestran una vez más, la relevancia de esta vía de señalización en la homeostasis neuronal y hace pensar que PINK1 es una proteína clave en la muerte celular inducida por ceramida. En este sentido, los mecanismos moleculares que aseguren la actividad de esta vía de supervivencia en las neuronas, deben ser estudiados como posibles blancos terapéuticos en enfermedades neurodegenerativas como la EP.

#### **4.5.4 El silenciamiento de PINK1 hace a las células CAD más susceptibles a la muerte celular inducida por C2C**

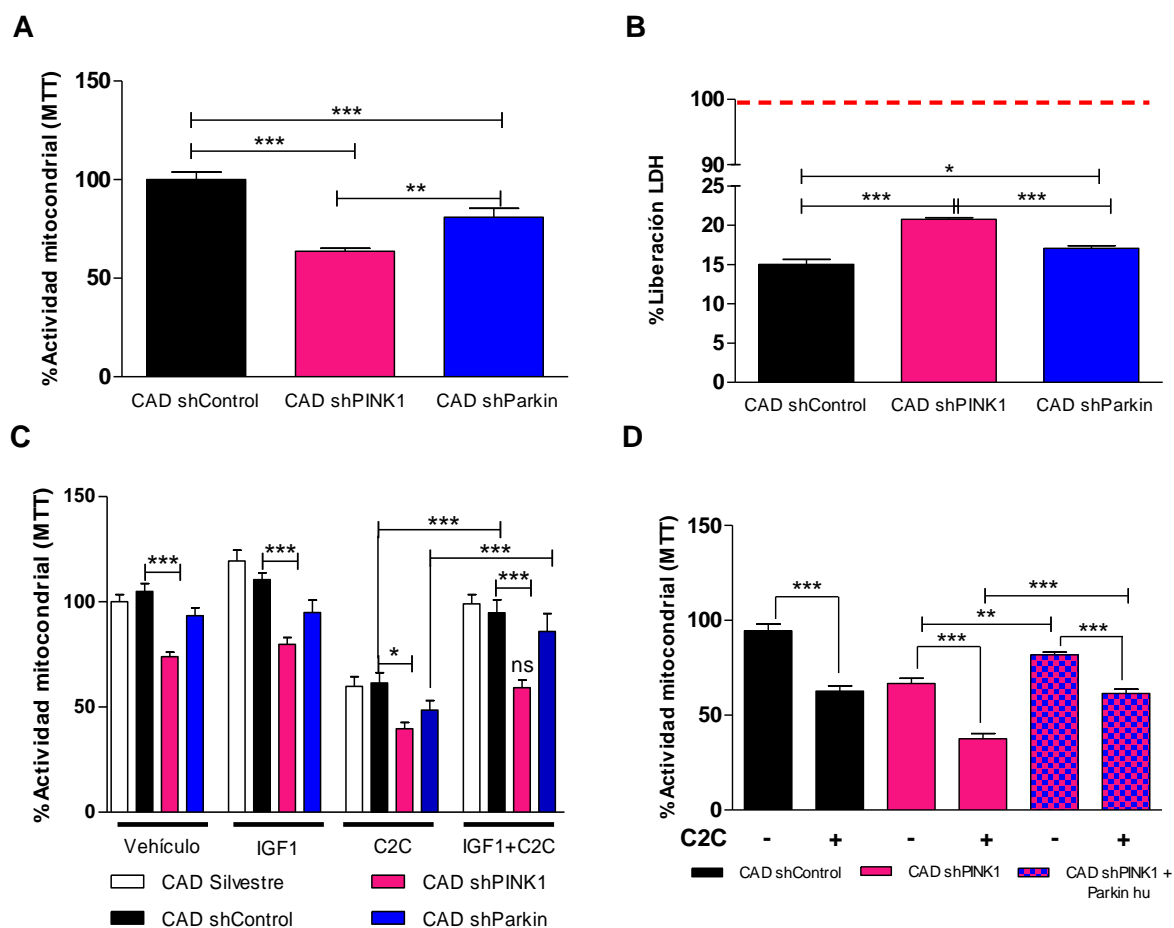
El abordaje metodológico que se utilizó para evaluar la viabilidad celular fue la medición de la actividad mitocondrial por el método de MTT y la liberación de LDH, además se realizó el análisis de muerte celular mediante citometría de flujo utilizando IP y AV. Se encontró que las células silenciadas para PINK1, luego de los 4 días de diferenciación tenían menos actividad mitocondrial y más liberación de LDH en comparación con las células control. Las células silenciadas para Parkin también presentaron menor actividad mitocondrial y mayor liberación de LDH, pero en menor proporción que aquellas silenciadas para PINK1 (véase figura 4.12 A y B). El análisis por citometría de flujo demostró un incremento significativo en la muerte celular (véase figura 4.13, vehículo).

Cuando las células CAD fueron tratadas con C2C, se observó que las silenciadas para PINK1 fueron más susceptibles al tratamiento que las control ( $p < 0,05$ ) (véase figura 4.12 C y 4.13 I, C2C 10  $\mu\text{M}$  y C2C 25  $\mu\text{M}$ ). Teniendo en cuenta que investigaciones previas en el grupo, demostraron que el pre-tratamiento con IGF1, a través de la activación de AKT, protegía a las células CAD de la muerte celular inducida por C2C [322], se quiso comprobar si en las células silenciadas para PINK1 y Parkin, ocurría lo mismo. Se observó que el pre-tratamiento con IGF1 no fue eficaz y no generó ningún cambio positivo en la viabilidad de estas células luego de los tratamientos con C2C (véase figura 4.12 C y 4.13 I, IGF1+ C2C 10).

Esto nos hizo pensar que posiblemente la señalización celular secundaria al tratamiento con IGF1 se encontraba alterada en las células silenciadas para PINK1 o Parkin, por lo cual inicialmente se decidió evaluar la activación de AKT y ERK, luego de la estimulación con IGF1 o del tratamiento con C2C.

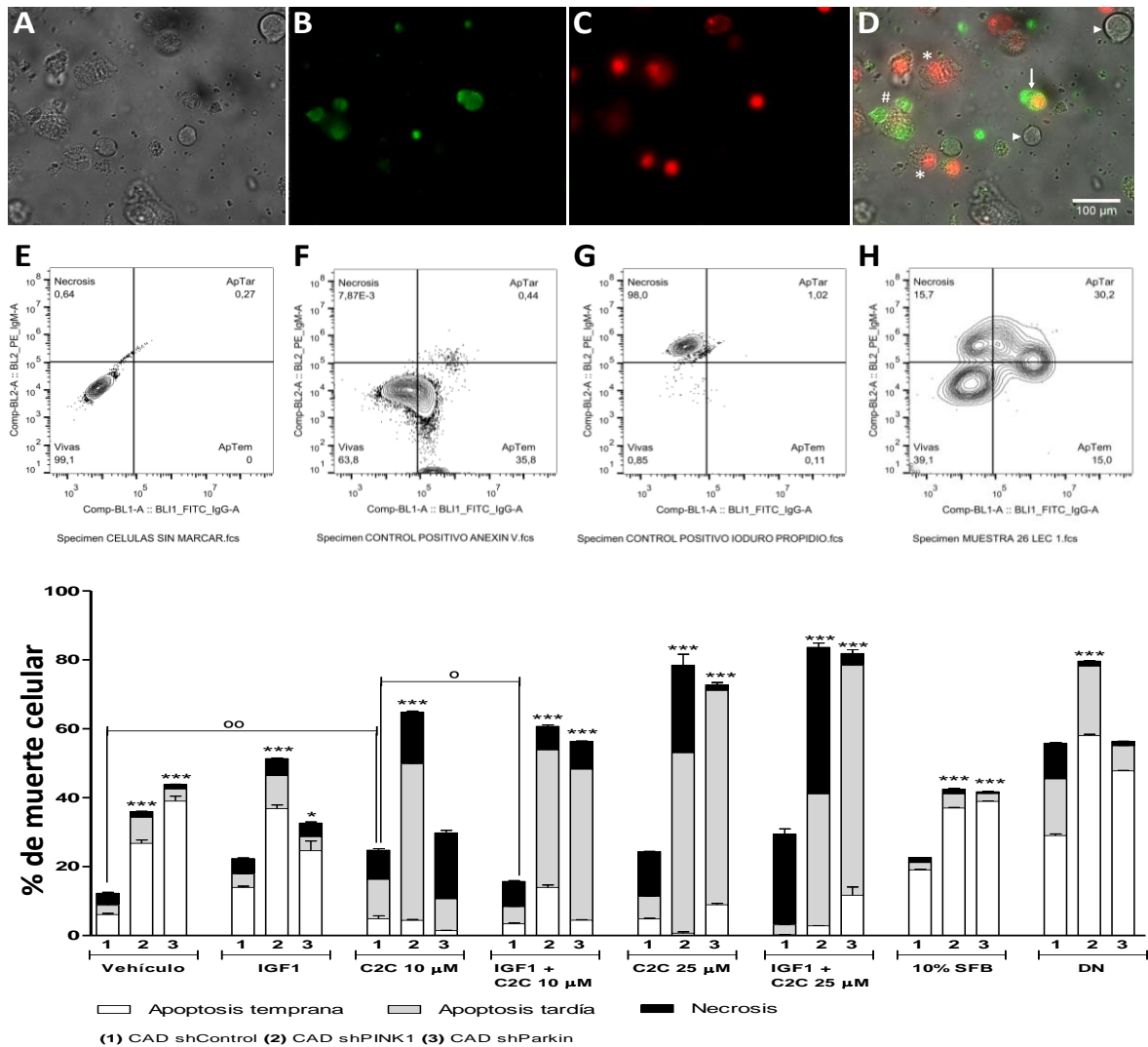
#### **4.5.5 La señalización celular secundaria a IGF1 se encuentra afectada en las células silenciadas para PINK1.**

Se observó que las células CAD shPINK1 tenían niveles menores de activación de AKT que las CAD shControl cuando se trataron con vehículo ( $p < 0,05$ ), y no activaron la vía cuando se estimularon con IGF1 ( $p < 0,01$ ) (véase figura 4.14 A y C). Mientras que las células CAD shParkin no mostraron diferencias significativas respecto a las células CAD shControl, en ninguno de los tratamientos. En cuanto al tratamiento con C2C, éste produjo una desfosforilación de AKT casi total en todos los tipos celulares, indicando que la desfosforilación de AKT es uno de los mecanismos determinantes en la muerte celular inducida por C2C en el modelo de células CAD.



**Figura 4.12 El silenciamiento de PINK1 o Parkin disminuye la actividad mitocondrial e incrementa la liberación de LDH en cultivos de células CAD**

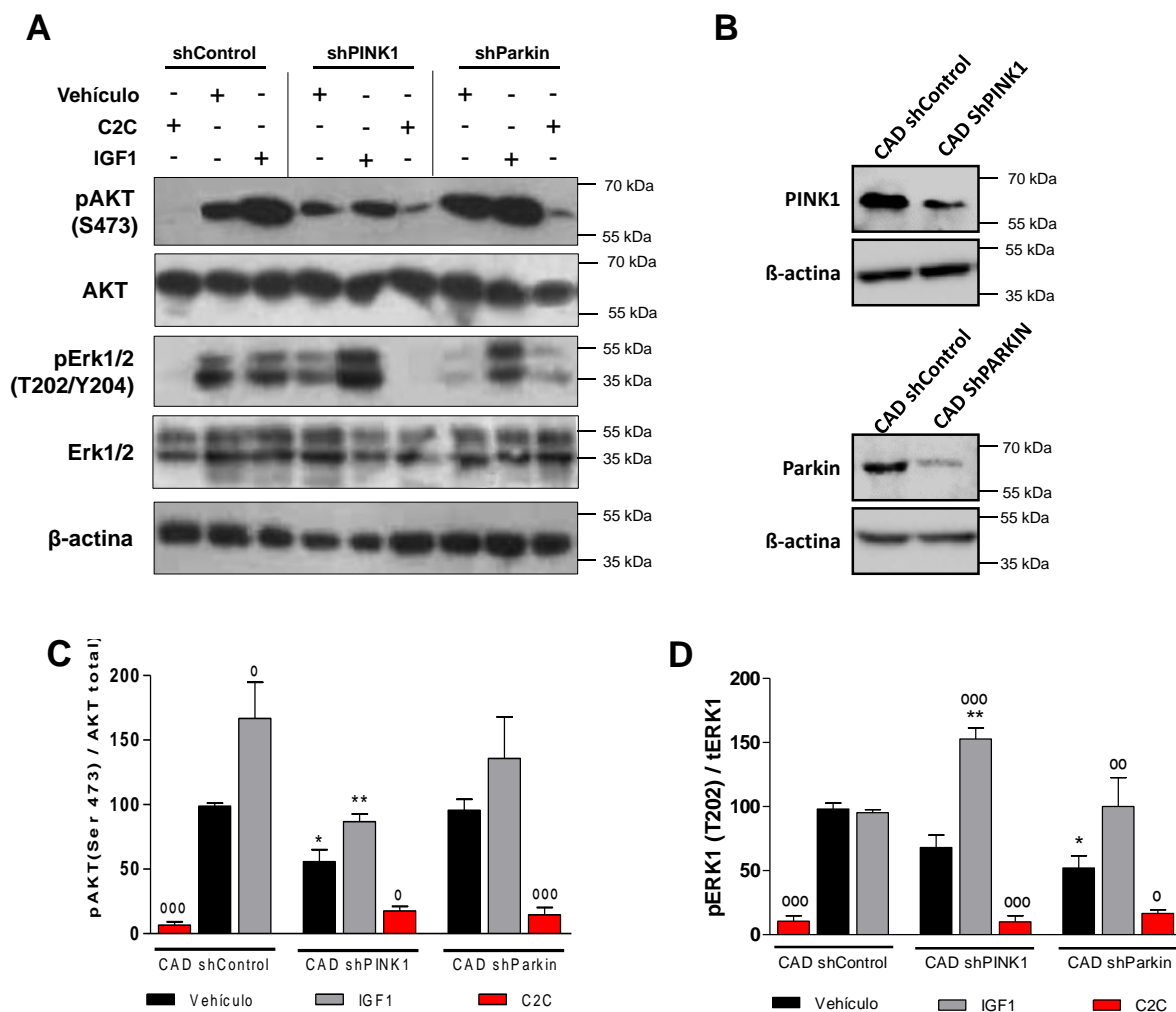
Células CAD shControl, CAD shPINK1 y CAD shParkin, luego de 4 días de diferenciación: **(A)** Porcentaje de viabilidad celular asociada a metabolismo mitocondrial por la técnica de MTT. **(B)** Porcentaje de liberación de LDH al medio. **(C)** MTT de los tres tipos celulares, tratados con C2C (25  $\mu$ M), IGF1 (100 ng/ml) o un pretratamiento con IGF por 30 min seguidos de 6 h de exposición a C2C (25  $\mu$ M) **(D)** MTT de células silenciadas para PINK1 con sobre-expresión de Parkin, en presencia de C2C. Los datos representan medias de tres experimentos independientes. Se realizó Anova de una vía y para comparaciones múltiples se aplicó la prueba de contrastes *T* de Bonferroni \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  y \*\*\*  $p < 0,001$ .



**Figura 4.13 El silenciamiento de PINK1 o Parkin incrementa la muerte de las células CAD en un contexto neurotóxico y de privación de nutrientes.**

Células CAD shControl, CAD shPINK1, CAD shParkin luego de 3 días de diferenciación, tratadas durante 6 h con vehículo (DMSO 0,1 %v/v), IGF1 (100 ng/ml), C2C (25  $\mu$ M), C2C (10  $\mu$ M) o pre-tratamiento con IGF1 (100 ng/ml) durante 30 min, seguido de 6 h de tratamiento con C2C (25  $\mu$ M) o C2C (10  $\mu$ M), 10% de SFB y DN en medio HBSS. Microfotografías (A) DIC. (B) Anxina V-FITC. (C) IP. (D) superposición de A, B y C: células vivas: puntas de flecha; necróticas: \*; apoptóticas: # y apoptosis tardía: flecha. Gráficos de citometría de flujo PE vs FITC de células CAD silvestres, apoptosis tardía (ApTar), apoptosis temprana (ApTem), necrosis y vivas. (E) células sin marcar, (F) control positivo de necrosis, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 mM por 2 h), (G) control positivo de apoptosis, estaurosporina (250 nM por 2 h), (H) ejemplo de células CAD shPINK1 tratadas con C2C (10  $\mu$ M por 6 h) la población se distribuyó en todos los cuadrantes. (I) % de células muertas en función de los diferentes tratamientos. Células CAD shControl (1), CAD shPINK1 (2) y CAD shParkin (3). Anova de una vía, prueba de contrastes *T* de Bonferroni \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  y \*\*\*  $p < 0,001$ .





**Figura 4.14 El silenciamiento de PINK1 o Parkin afecta la activación de AKT y ERK dependiente de IGF1**

(A) *Western blot* representativo de pAKT (S473), AKT total, pERK1/2, ERK1/2 total y  $\beta$ -actina de células CAD shControl, CAD shPINK1 y CAD shParkin, luego de 6 h de tratamiento con vehículo (DMSO 0,1 %v/v), IGF1 (100 ng/ml) o C2C (25  $\mu$ M). (B) comprobación del silenciamiento de PINK1 y Parkin en células CAD (C) Densitometría de pAKT/ AKT total y (D) densitometría de pERK1/ERK1 total. Todos los datos fueron normalizados respecto a las células CAD shControl tratadas con vehículo y representan medias  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes. Anova de una vía, para comparaciones múltiples se aplicó la prueba de contrastes *T* de Bonferroni. (\*) Indica diferencias significativas respecto a las células CAD shControl. (°) Indica diferencias significativas respecto a las células tratadas con el vehículo

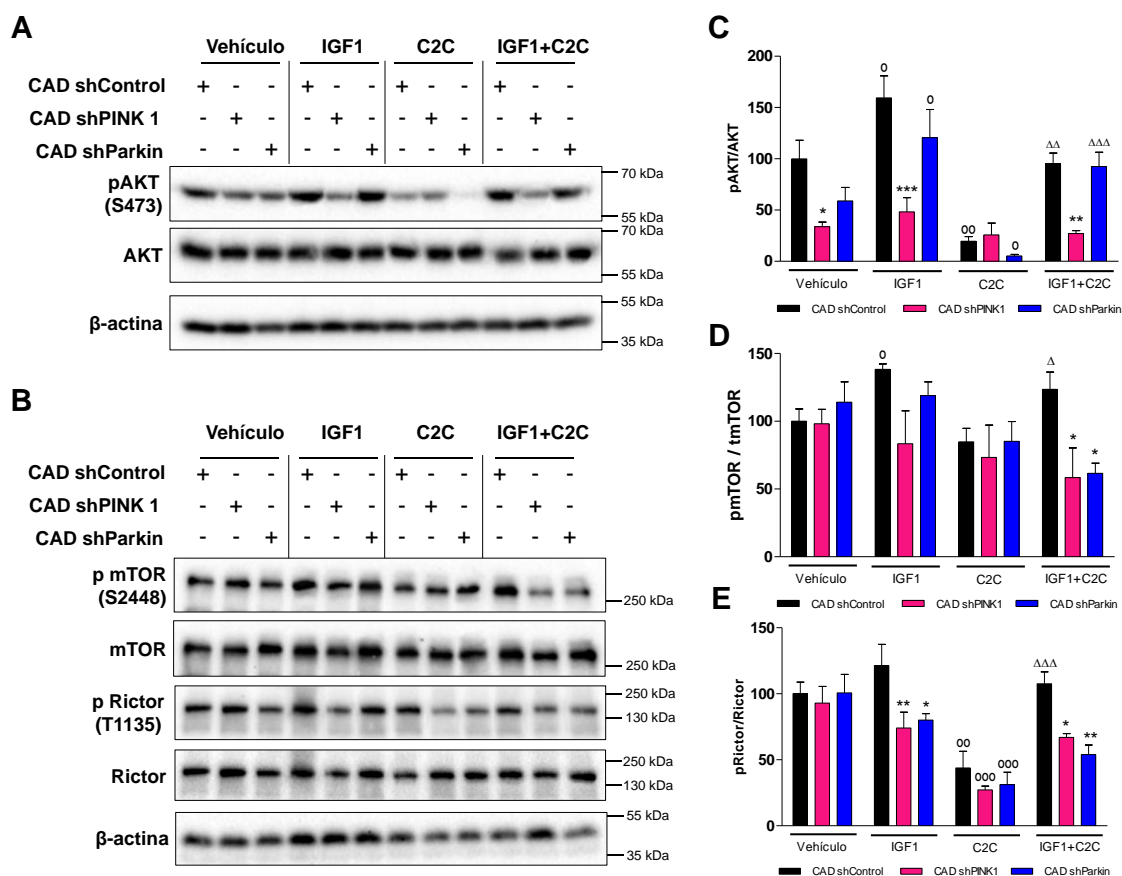
Con respecto a la activación de ERK, se apreció que las células CAD shPINK1 y CAD shParkin tuvieron mayores niveles de ERK1 fosforilado luego de la estimulación con IGF1. Al igual que la activación de AKT, el tratamiento con C2C comprometió la activación de ERK1 en todos los tipos celulares (véase figura 4.14 A y D).

El papel que desempeña ERK1/2 en los mecanismos de supervivencia y muerte celular es controversial; por una parte, existe evidencia de que su activación favorece la supervivencia neuronal [323-325], sin embargo Zhuang *et al.* identificaron la activación de ERK1/2 como un factor pro-apoptótico bajo ciertas condiciones de estrés como la isquemia [326].

No sabemos si la activación de ERK observada en las células silenciadas para PINK1 o Parkin en condiciones basales se trata de un evento protector activado para contrarrestar el daño celular inducido por el silenciamiento de estos genes o se trata de un mecanismo molecular asociado a muerte celular. Este resultado es consistente con un hallazgo reciente que muestra que la ausencia de PINK1 se asocia con un incremento en la activación de MEK1 y sus blancos corriente abajo [130]

Para conocer el mecanismo por el cual el silenciamiento de PINK1 y las alteraciones de las vías de supervivencia reguladas por AKT y ERK aumentaron la susceptibilidad a muerte neuronal, se investigaron mediante *western blot* algunas proteínas clave de estas vías de señalización, bajo la estimulación con IGF1 previa al tratamiento con ceramida. En este sentido los resultados que se obtuvieron mostraron que el pre-tratamiento con IGF1 no protegió a las células silenciadas para PINK1 de la desfosforilación de AKT inducida por C2C (véase figura 4.15 A y C). En cuanto a las células silenciadas para Parkin, éstas respondieron a la estimulación con IGF1 aumentando la fosforilación de AKT y esta estimulación protegió contra el efecto de la C2C al igual que en las células CAD shControl (véase figura 4.15 A y C).

Cuando se evaluó la fosforilación de mTOR dependiente de la vía PI3K/AKT, se observó que las células silenciadas para PINK1 tuvieron los mismos niveles de activación que las shControl en la condición basal, sin embargo el tratamiento con IGF1 no potenció dicha activación. En las células tratadas con C2C se observó una tendencia a disminuir la fosforilación de mTOR, pero ésta no fue significativa desde el punto de vista estadístico, mientras que el pre-tratamiento con IGF1 previno la desfosforilación inducida por C2C únicamente en las células CAD shControl (véase figura 4.15 B y D). Adicionalmente se evaluó la activación de Rictor un componente del complejo mTORC2. La fosforilación de Rictor en la T1135 depende de la activación de S6K1, una quinasa dependiente de mTORC1 [327]. Se observó que las células silenciadas para PINK1 y Parkin tuvieron menos niveles de Rictor fosforilado, luego de la estimulación con IGF1 que las células control ( $p < 0,01$  y  $p < 0,05$  respectivamente).



**Figura 4.15 El silenciamiento de PINK1 inhibe la activación de vía PI3K/AKT secundaria a estimulación con IGF1.**

Western blot representativo de células CAD shControl, CAD shPINK1 y CAD shParkin, luego de 6 h de tratamiento con vehículo (DMSO 0,1 %v/v), IGF1 (100 ng/ml), C2C (25  $\mu$ M) o pre-tratamiento con IGF1 (100 ng/ml) durante 30 min, seguido de 6 h de tratamiento con C2C (25  $\mu$ M). **(A)** de pAKT (S473), AKT total y  $\beta$ -actina **(B)** pmTOR(S2448), mTOR total, pRictor (T1135), Rictor total y  $\beta$ -actina. **(C)** Densitometría de pAKT (S473)/AKT total. ANOVA de dos vías (tipo de célula:  $p < 0,0001$ ; tratamiento:  $p < 0,0001$ ; interacción  $p = 0,0084$ ). **(D)** Densitometría de pmTOR (S2448)/mTOR total. ANOVA de dos vías (tipo de célula:  $p = 0,0130$ ; tratamiento:  $p = 0,0228$ ; interacción  $p = 0,1556$ ). **(E)** Densitometría de pRictor (T1135)/Rictor total. ANOVA de dos vías (tipo de célula:  $p = 0,0005$ ; tratamiento:  $p < 0,0001$ ; interacción  $p = 0,1414$ ). Todos los datos fueron normalizados respecto a las células CAD shControl tratadas con vehículo y representan medias  $\pm$  SEM de mínimo 3 experimentos independientes. Para comparaciones múltiples se aplicó la prueba de contrastes *T* de Bonferroni. (\*) Indica diferencias significativas respecto a las células CAD shControl. (°) Indica diferencias significativas respecto a las células tratadas con el vehículo ( $\Delta$ ) Indica diferencias significativas respecto a las células tratadas con C2C. (\* / ° /  $\Delta$   $p < 0,05$ ; \*\* / °° /  $\Delta\Delta$   $p < 0,01$ ; \*\*\* / °°° /  $\Delta\Delta\Delta$   $p < 0,001$ ).

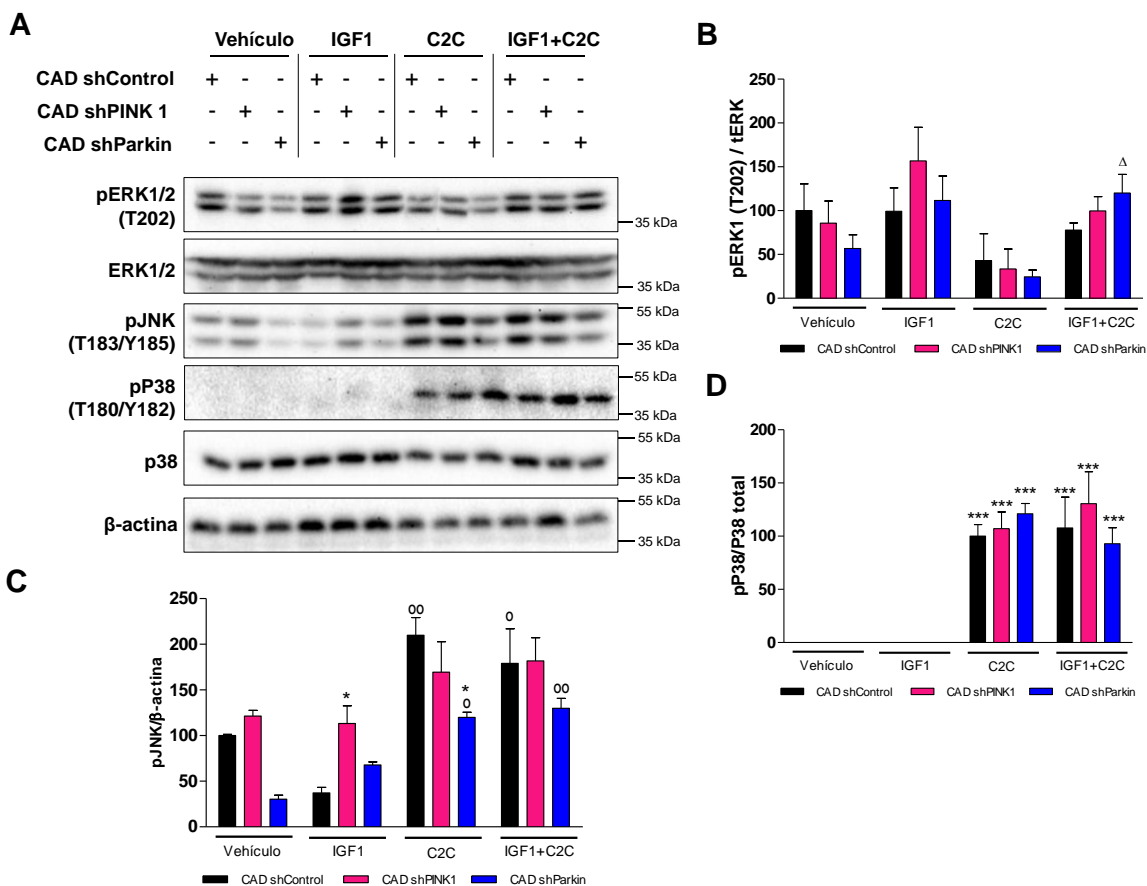
El tratamiento con C2C disminuyó significativamente la fosforilación de Rictor en las líneas celulares, y esta disminución fue prevenida por el tratamiento con IGF1 sólo en las células control (véase figura 4.15 B y E).

En cuanto a ERK, como en los resultados anteriores (véase figura 4.14 A y D), se observó que las células silenciadas para PINK1 tienden a incrementar la activación de ERK posterior al tratamiento con IGF1, pero no se observó significancia estadística. También se observó que en todos los tipos celulares el tratamiento con C2C disminuyó la activación de ERK y que el pre-tratamiento con IGF parece proteger a las células de la inhibición de ERK (véase figura 4.16 B).

Con respecto a la quinasa JNK se observó que el factor silenciamiento y el factor tratamiento influyen en la activación de esta proteína y que además interactúan entre sí para modular sus niveles (véanse resultados del Anova en la leyenda de la figura 4.16). Claramente el *western blot* mostró que el tratamiento con C2C incrementó la fosforilación de JNK con respecto a las células tratadas con vehículo, y que el pre-tratamiento con IGF1 no previno tal evento. En el caso de la activación de P38, fue claro que el tratamiento con C2C incrementó su activación en todas las células y que al igual que en el caso de JNK, el pre-tratamiento con IGF no previno su activación (véase figura 4.16 A y D). Todo esto indicó que en nuestro modelo de células CAD, la C2C puede inducir muerte celular por dos vías diferentes y posiblemente independientes, la primera a través de la desfosforilación de AKT y la segunda a través de la activación de JNK y P38. IGF1 protege de esta muerte al prevenir la desfosforilación de AKT, pero no disminuye la activación de JNK y p38; en las células deficientes de PINK1 este mecanismo de protección parece estar bloqueado.

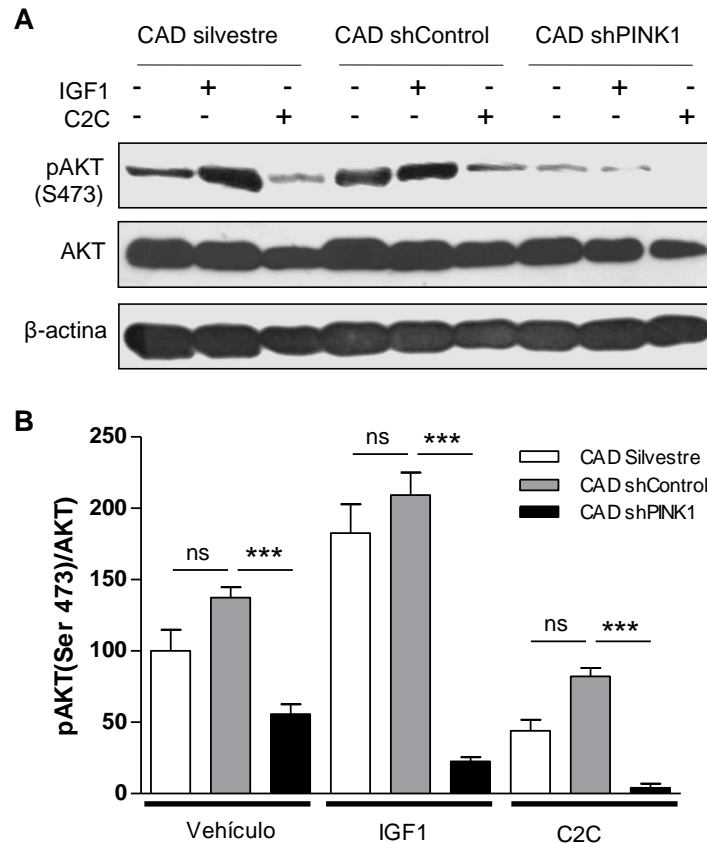
#### **4.5.6 El silenciamiento de PINK1 alteró la activación del receptor de IGF1.**

Por lo anterior, se decidió investigar más a fondo el efecto de silenciar PINK1, sobre la activación de AKT inducida por IGF1, para lo cual células sin transfectar, CAD shControl y CAD shPINK1 se trataron con IGF1 (100 ng/ml) o C2-ceramida (25  $\mu$ M) durante 6 h. Las CAD sin transfectar y las CAD shControl mostraron un nivel basal de fosforilación de AKT, el cual fue mantenido por la producción autocrina de neurotrofina-3 [204]. Este nivel basal estuvo reducido significativamente en las células CAD shPINK1 (Figura 4.17 A y B). La estimulación con IGF-1 indujo un incremento significativo en el nivel de la fosforilación de AKT tanto en las CAD sin transfectar como en las CAD shControl (Figura 4.17 A, líneas 2, 5); sin embargo, el silenciamiento de PINK1 bloqueó la fosforilación de AKT mediada por IGF1 (Figura 4.17, línea 8).



**Figura 4.16 El silenciamiento de Parkin disminuye la fosforilación de ERK y el tratamiento con C2C incrementa la activación de JNK y P38.**

*Western blot* representativo de células CAD shControl, CAD shPINK1 y CAD shParkin, luego de 6 h de tratamiento con vehículo (DMSO 0,1 %v/v), IGF1 (100 ng/ml), C2C (25  $\mu$ M) o pre-tratamiento con IGF1 (100 ng/ml) durante 30 min, seguido de 6 h de tratamiento con C2C (25  $\mu$ M). **(A)** de pJNK (T183/Y185), pP38 (T180/Y182), P38 total y  $\beta$ -actina. **(B)** Densitometría de pERK1/ERK ANOVA de dos vías (tipo de célula:  $p=0,6154$ ; tratamiento:  $p=0,0050$ ; interacción  $p=0,5089$ ). **(C)** Densitometría de pJNK /  $\beta$ -actina. ANOVA de dos vías (tipo de célula:  $p=0,0020$ ; tratamiento:  $p<0,0001$ ; interacción  $p=0,0712$ ). **(D)** Densitometría de pP38 (T180/Y182)/ P38 total. ANOVA de dos vías (tipo de célula:  $p=0,7404$  tratamiento:  $p<0,0001$ ; interacción  $p=0,6692$ ). Todos los datos de ERK y JNK fueron normalizados respecto a las células CAD shControl tratadas con vehículo, mientras que los datos de P38 fueron normalizados respecto a las células CAD shControl tratadas con C2C. En todos los datos representan medias  $\pm$  SEM de mínimo 3 experimentos independientes. Para comparaciones múltiples se aplicó la prueba de contrastes *T* de Bonferroni. (\*) Indica diferencias significativas respecto a las células CAD shControl. (°) Indica diferencias significativas respecto a las células tratadas con el vehículo ( $\Delta$ ) Indica diferencias significativas respecto a las células tratadas con C2C. (\* $^{\circ}/\Delta$   $p<0,05$ ; \*\* $^{\circ\circ}/\Delta\Delta$   $p<0,01$ ; \*\*\* $^{\circ\circ\circ}/\Delta\Delta\Delta$   $p<0,001$ ).



**Figura 4.17 El silenciamiento de PINK1 inhibe la fosforilación de AKT mediada por IGF1**

**(A)** *Western blots* representativos pAKT (S473), AKT total y B-actina de células CAD sin transfectar, CAD shControl y CAD shPINK1 en condiciones basales o luego de 6 h tratamiento con IGF1 (100 ng/ml) o C2C (25  $\mu$ M). **(B)** Densitometría de pAKT/AKT total. Los datos fueron normalizados respecto a las células sin transfectar y sin tratamiento y representan medias  $\pm$  SEM de mínimo 3 experimentos independientes. ANOVA de una vía, para comparaciones múltiples se aplicó la prueba de contrastes *T* de Bonferroni. (ns: no significativo, \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ). Figura tomada y modificada de [328].

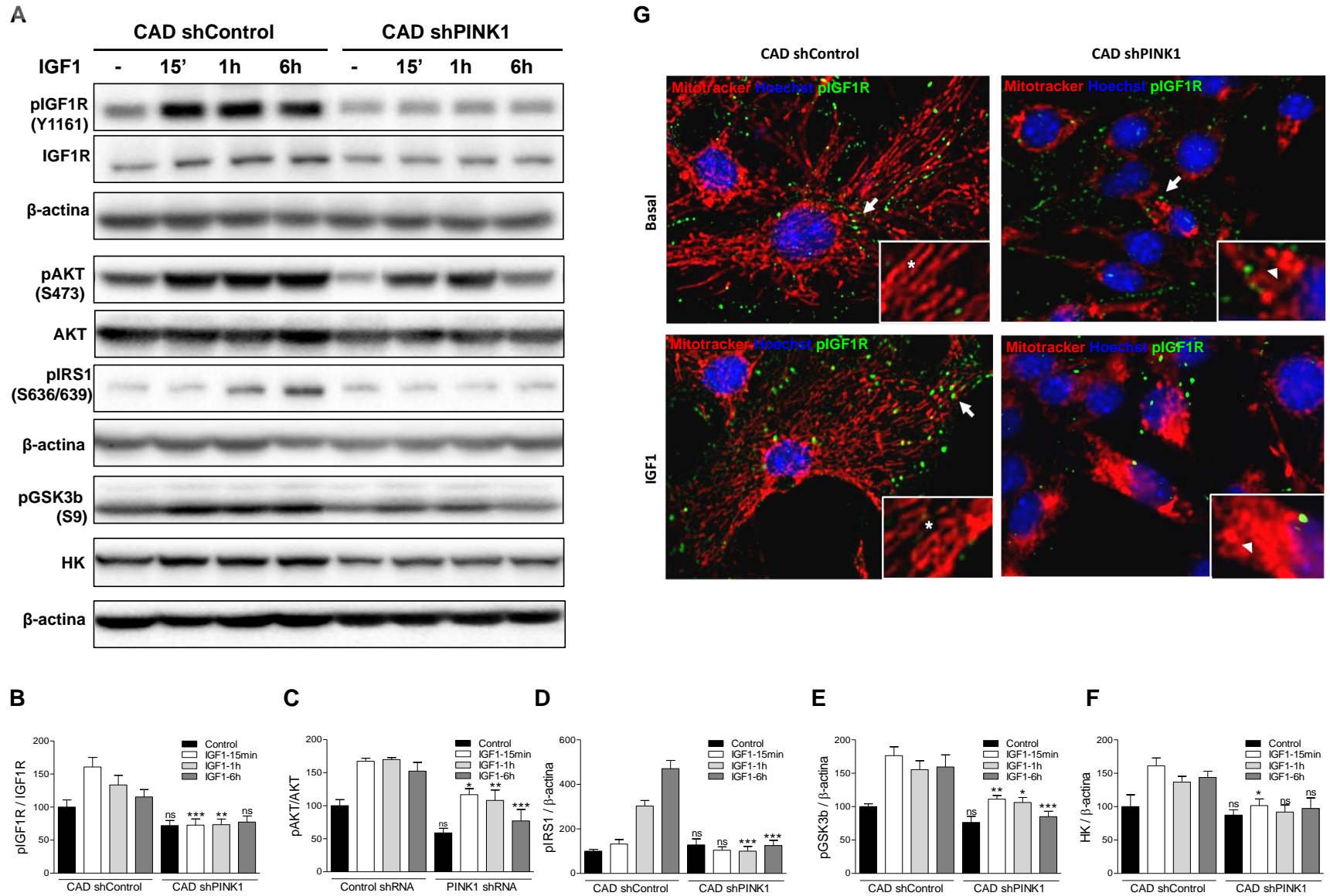
El tratamiento con C2C causó una disminución en el nivel de AKT fosforilado y esta disminución fue significativamente mayor en las células silenciadas para PINK1 ( $p < 0,001$ ) (Figura 4.17, línea 9).

A continuación, se analizó la activación de IGF1R y algunas moléculas de señalización corriente abajo. Para esto, células CAD shControl y CAD shPINK1 se trataron con IGF1 (100 ng/ml) durante 15 min, 1 h y 6 h. Las células silenciadas para PINK1 mostraron niveles más bajos de IGF1R que las células de CAD shControl (Figura 4.18 A).

**Figura 4.18 El silenciamiento de PINK1 inhibe la activación de IGF1R mediada por IGF1**

CAD shControl y CAD shPINK1 fueron tratadas con IGF1 (100 ng/ml) durante 15 min, 1 y 6 h. **(A)** *Western blots* representativos de pIGF1R (Y1161), IGF1R total, pIRS1 (S636/639), pAKT (S473), AKT total, pGSK3- $\beta$  (S9), y hexoquinasa;  $\beta$  actina fue usada como control de carga. Densitometrías **(B)** pIGF1R/IGF1R. **(C)** pAKT/AKT total. **(D)** pIRS1/ $\beta$ -actina. **(E)** pGSK3 $\beta$ / $\beta$ -actina. **(F)** Hexoquinasa/ $\beta$ -actina. Todos los datos fueron normalizados respecto a las células CAD shControl sin tratamiento y representan medias  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes. ANOVA de una vía, para comparaciones múltiples se aplicó la prueba de contrastes *T* de Bonferroni. (ns: no significativo, \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ). **(G)** microfotografías representativas de microscopía de fluorescencia de CAD shControl y Cad shPINK1 tratadas o no con IGF1 (100 ng/ml) durante 6 h. En rojo mitocondrias marcadas con MitoTracker Red CMXRos, verde pIGF1R, azul, núcleos marcados con *Hoescht*. Flechas blancas indican grupos de pIGF1R. En recuadros blancos se observa morfología de la red mitocondrial. Punta de flechas indican redes fraccionadas y asteriscos muestran redes interconectadas. (Página siguiente).

Figura 4.18 (continuación)





Por otra parte, la relación de pIGF1R/IGF1R total fue significativamente menor que en las células de CAD shControl después de 15 min ( $p < 0,001$ ) y 1 h ( $p < 0,01$ ) de estimulación con IGF1 (Figura 4.18 B). Este resultado es consistente con las imágenes de microscopía de fluorescencia donde las células silenciadas para PINK1 mostraron menor inmunotinción y redistribución de pIGF1R que las CAD shControl luego de la estimulación con IGF1 (100 ng/ml) (véase figura 4.18 G).

La inhibición de la activación de IGF1R en las células CAD shPINK1 causó una disminución significativa en la fosforilación de AKT y su blanco corriente abajo GSK3 $\beta$ , así como menores niveles de HK (véase figura 4.18 A y F), como ha sido reportado recientemente [329]. Adicionalmente las células CAD shControl mostraron un incremento en la fosforilación de IRS1 en los residuos S636/S639 (véase figura 4.18 A y D) lo cual se esperaba dado que estas fosforilaciones están asociadas a un proceso de regulación negativa de la vía por un mecanismo regulado por mTOR [330]. Sin embargo, las células silenciadas para PINK1 no mostraron ningún cambio en los niveles de fosforilación de IRS1 luego de la estimulación con IGF1 (véase figura 4.18 A y D), este resultado se asoció a una alteración de la vía IGF1/PI3K/AKT/mTOR en nuestro modelo de estudio.

## 4.6 Discusión

La vía PI3K/AKT se conoce por desarrollar señales anti-apoptóticas y de proliferación. Es así que en neuronas, esta vía puede regular proliferación o diferenciación neuronal dependiendo de los niveles de activación de AKT. Se ha reportado que altos niveles de activación se asocian a proliferación de precursores neuronales, mientras que niveles más bajos están asociados a diferenciación [331, 221, 332].

En las células CAD, el silenciamiento de PINK1 disminuyó los niveles basales de AKT activado, y esto se asoció a una disminución en la tasa de crecimiento de células CAD sin diferenciar (véase curvas de crecimiento figura 4.9 A). La causa primaria de esta observación, pudo ser la disminución en la proliferación o el incremento en la muerte celular, o incluso la suma de ambas condiciones. El hecho de que las células silenciadas para PINK1 tuvieran mayores niveles de liberación de LDH, así como un aumento en el marcaje con anexina V, indicó que el silenciamiento de PINK1 induce muerte celular. Sin embargo, no se descarta la posibilidad de que también se encuentre afectada la proliferación celular. En modelos animales, se conoce que la ausencia de PINK1 disminuye la neurogénesis durante el desarrollo embrionario (revisado en [333]).

Por otro lado, se observó que las células CAD silenciadas para PINK1 no adquieren la morfología neuronal típica luego de 4 días en medio de diferenciación. Se conoce que PINK1 aumenta sus niveles durante el proceso de diferenciación de células madre

neurales humanas a neuronas dopaminérgicas. Sin embargo, Wood-Kaczmar *et al.* demostraron que la función de PINK1 no determina el proceso de diferenciación como tal, sino que se asocia a supervivencia neuronal, en donde su pérdida resulta en un incremento de la muerte neuronal a medida que el cultivo envejece [131].

Un análisis proteómico reveló que ratones PINK1 (-/-) tienen niveles mucho menores de dos proteínas asociadas a la diferenciación neuronal y crecimiento neurítico: EF2 (del inglés, *elongation factor 2*) y DRP2 (del inglés, *dihydropyrimidase-related protein 2*) [130]. EF2 actúa como regulador de la traducción de proteínas y regula el desarrollo neurítico permitiendo el avance de los conos de crecimiento; mientras que DRP2 se asocia a múltiples funciones que incluyen retracción y crecimiento de neuritas, guía del cono de crecimiento, transporte axonal dependiente de quinesina, liberación de neurotransmisores, endocitosis, ensamblaje de vesículas sinápticas y homeostasis de calcio; con lo cual participan en la diferenciación neuronal y organización del árbol dendrítico ([130] y referencias allí citadas). En nuestro modelo de células CAD, la expresión de PINK1 se incrementó considerablemente a partir del tercer día de diferenciación y su silenciamiento afectó el desarrollo de prolongaciones tipo neuritas. Tal evento se asoció a mayores niveles de RhoGAP29 y ROCKII en los dos primeros días de diferenciación (véase figura 4.6 D).

La familia de las RhoGTPasas, está constituida por 7 subfamilias, y sus miembros más estudiados son RhoA, Rac1 y Cdc42, los cuales regulan la organización de microtúbulos y fibras de actina en el citoesqueleto. En neuronas estas proteínas son esenciales para el establecimiento de la morfología neuronal, ya que regulan la arborización dendrítica, la morfogénesis de espinas, así como el desarrollo del cono de crecimiento y la guía axonal (revisado en [315]). Se conoce que la dinámica natural del citoesqueleto neuronal requiere una regulación espacio temporal de las GTPasas de la familia Rho que a su vez depende de la activación espacio temporal de sus reguladores GEFs (del inglés, *guanine nucleotide exchange factors*) y GAPs (del inglés, *GTPase activating proteins*) (revisado en [334]).

RhoA es una de las pequeñas GTPasas de la familia Rho que coordina la dinámica de microtúbulos y filamentos de actina en la morfología neuronal. La inactivación de RhoA por GAPs, favorece la estabilidad de filamentos de actina lo cual resulta en la iniciación del surgimiento de neuritas (revisado en [313, 335, 315]). El hecho de que la disminución de un inhibidor de RhoA (RhoGAP29) no estuviera asociado a un incremento de ROCKII, posiblemente indica que en nuestro modelo la inhibición de RhoA está mediada por otra proteína GAP diferente a RhoGAP29; también es posible considerar que sea la activación de Rac1 la principal responsable, ya que Rac1 estimula la vía PI3K/AKT (revisado en [315]) y es precisamente esta vía la que se encuentra comprometida en las células silenciadas para PINK1. En este sentido, se conoce que la sobre-expresión de Rac1 en células SHSY5Y, rescata la retracción de neuritas y muerte celular causada por mutantes de

LRRK2 (otro de los genes determinísticos en el desarrollo de EP) [336]. Por esto es necesario estudiar a fondo el proceso de diferenciación de las células CAD.

Aparte de la superfamilia RhoGTPasas, se conoce que la activación de PKA y PI3K son esenciales para la diferenciación de células SHSY5Y a neuronas [337]. Recientemente *Dagda et al.* reportaron que la forma citosólica de PINK1 regula la activación de PKA lo cual favorece neuritogénesis en células SHSY5Y y dendritogénesis en neuronas dopaminérgicas y corticales; además mejora el transporte mitocondrial anterógrado lo cual incrementa la densidad mitocondrial en las dendritas y la expresión de las proteínas de diferenciación neuronal. Sin embargo, a la fecha no se conoce el mecanismo por el cual PINK1 regula la actividad de PKA [121].

Las funciones de PINK1, en particular su impacto en las vías de supervivencia neuronal como la vía PI3K/AKT, aún no se han aclarado. Con este trabajo, se demostró que el silenciamiento de PINK1 bloquea la activación de AKT mediada por IGF1 debido a una alteración en la activación del receptor de IGF1, comprometiendo las respuestas metabólicas y de supervivencia asociadas a su actividad. Esta observación se suma a la actual comprensión de los mecanismos neuroprotectores conferidos por PINK1, mediante la regulación directa o indirecta de la supervivencia neuronal. La pregunta que surge es ¿cómo PINK1 regula AKT y cuáles son sus efectos corriente abajo en la dinámica mitocondrial, autofagia, metabolismo y supervivencia neuronal?

Se conoce que la sobre-expresión del tipo silvestre PINK1 ejerce un efecto neuroprotector al activar la vía PI3K/AKT [338, 339], frente a algunas toxinas involucradas en la patogénesis de la EP, como MPTP, 6-OHDA, rotenona y C2C, las cuales regulan negativamente la activación de AKT [182, 340-343].

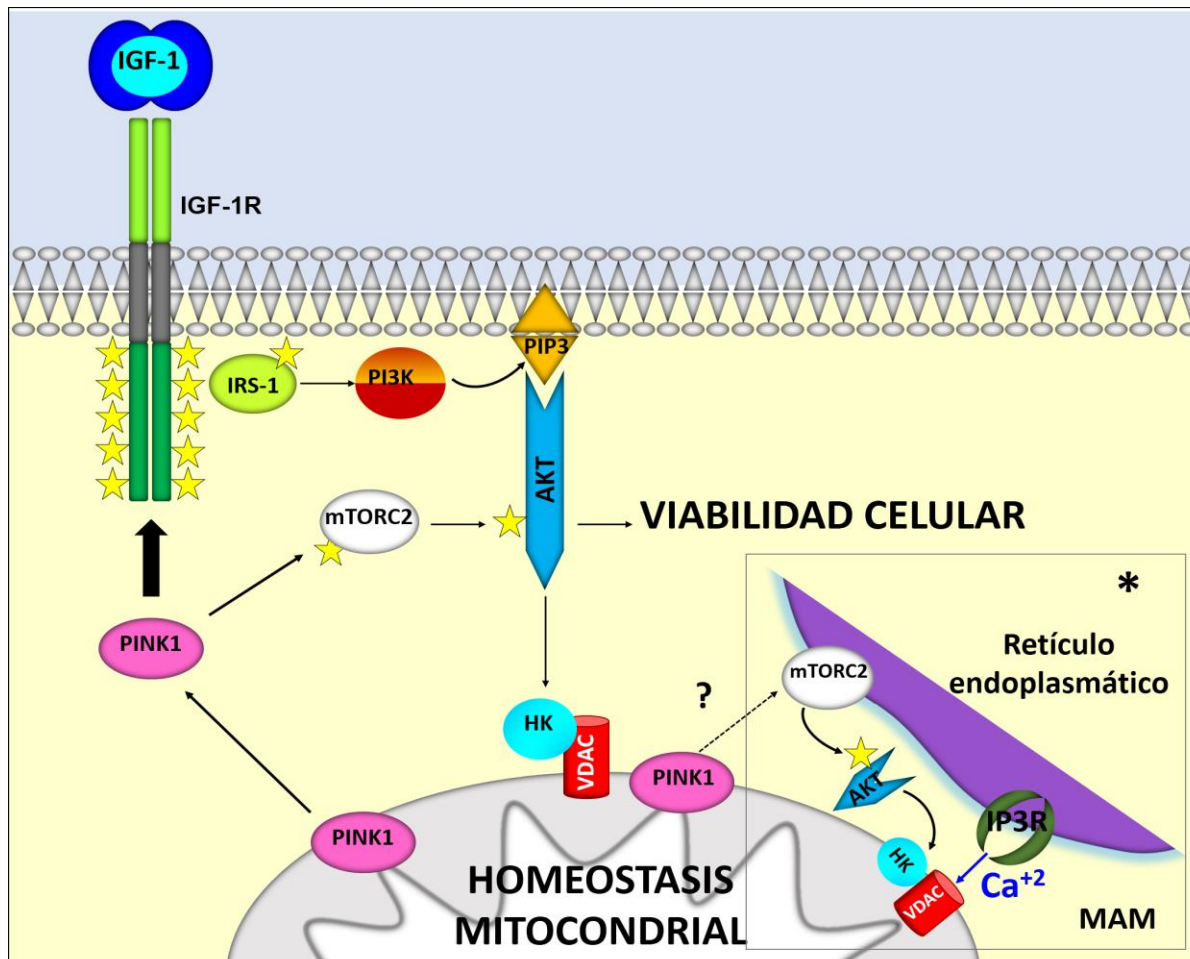
PINK1 puede regular la actividad de AKT por dos rutas diferentes: (1) Mediante la activación de mTORC2 el cual es responsable de la fosforilación AKT en la S473. Específicamente, se da a través de la fosforilación de Rictor (un componente de mTORC2), de esta manera PINK1 activa mTORC2 para fosforilar AKT de forma independiente de la activación de PI3K [123]. Adicionalmente, se ha reportado que la regulación que ejerce PINK1 sobre el complejo I es crucial para la actividad mTORC2 [344]. (2) Estudios recientes indican que PINK1 puede regular la activación de AKT después de la estimulación con factores tróficos tales como IGF1, insulina, y factor de crecimiento epidérmico (EGF). Se demostró que la activación de AKT por el IGF1 y la insulina depende de la presencia de PINK1, y se sugiere que los "componentes corriente arriba de la fosforilación de AKT están comprometidos en las células deficientes de PINK1" [345]. Con respecto a esto, se demostró que astrocitos de ratones *knockout* para PINK1, tienen niveles más bajos de expresión del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) que los ratones silvestres y esto conduce a una disminución de la activación de AKT y a una alteración en la proliferación celular [346]. Los resultados acá obtenidos apoyan estas

observaciones. Con este trabajo se demostró que la deficiencia de PINK1 disminuye la activación de IGF1R lo cual condujo a la alteración en la fosforilación AKT y a la disminución en la supervivencia celular.

Varios estudios han demostrado la asociación de PINK1 con la homeostasis mitocondrial. neuronas deficientes de PINK1 muestran mayores niveles de radicales libres asociados con la disminución de los niveles de glutatión [131], aumento de calcio mitocondrial [140] y la reducción del  $\Delta\Psi_m$  [133], que se asocian con una disminución del consumo de oxígeno lo cual conduce a una deficiencia en la síntesis de ATP, el deterioro del proteosoma y la agregación de  $\alpha$ -sinucleína [110]. La deficiencia de PINK1 también provoca alteraciones en la morfología mitocondrial [347], como se describe más adelante en el presente documento (véase capítulo 5). Además, varios estudios han descrito la importancia del papel de la vía de IGF1R/AKT en el control de proteínas asociadas con la función mitocondrial como Bax [348], mediante el mantenimiento de la integridad de la cadena de transporte de electrones mitocondrial, así como de su actividad, a través de la supresión de la FoxO1/HMOX1 y el mantenimiento de la relación  $NAD^+/NADH$  (revisado en [349]).

Adicionalmente, se ha descrito que mTORC2 se localiza en las membranas asociadas a mitocondrias (MAMs). En MAMs, mTORC2 regula la activación de AKT y contribuye a su integridad, permitiendo así una adecuada regulación del flujo de calcio entre RE y mitocondria, así como también mediando la función mitocondrial por regulación de la HK II [350].

Debido a que nuestros resultados mostraron que las células silenciadas para PINK1 tienen alterada la activación de IGF1R y sus blancos corriente abajo (incluyendo una disminución en los niveles de expresión de la HK), es posible que la regulación de las MAMs por mTORC2 se realice a través de la activación local de AKT dependiente de PINK1, o como consecuencia de cascadas de señalización asociadas a la activación de receptores de tirosina quinasa en la membrana citoplasmática. Para aclarar estas observaciones, se requiere el análisis de la presencia y actividad de PINK1 en las MAMs. En este sentido se propone un modelo en el que PINK1 participa en la regulación de la vía PI3K/AKT en diferentes puntos (véase figura 4.19): (1) a nivel citosólico donde se requiere PINK1 para la actividad de IGF1R o por la regulación de la fosforilación y activación de AKT; y (2) en la mitocondria donde puede activar a mTORC2 ubicado en el RE y así regular la homeostasis mitocondrial a través de las MAMs. Se propone que es el impacto negativo de PINK1 sobre AKT lo que ocasiona alteraciones a nivel mitocondrial y de diferenciación celular que finalmente concluyen en muerte neuronal.



**Figura 4.19 Regulación de la actividad de AKT mediada por PINK1**

Representación esquemática de la función de PINK1 como reguladora de la activación de AKT dependiente de IGF1. Tomada de [328]. PINK1 regula la activación de receptor IGF1, además activa AKT vía mTORC2 [123]. mTORC2 ubicado en el RE controla la integridad de MAMs donde a través de la activación de AKT y HK con lo cual se controla la homeostasis de calcio [350]. En este modelo se propone que PINK1 puede regular mTORC2 en MAMs (flecha punteada). Estrellas representan aminoácidos fosforilados. Asterisco señala modelo tomado y modificado de [350].

Ahora bien, con respecto al silenciamiento de Parkin éste también indujo un incremento en la muerte celular, que se evidenció por un aumento en la liberación de LDH y marcaje con AV e hizo a las células más susceptibles a la apoptosis inducida por C2C 25  $\mu$ M. Sin embargo, la activación basal de la vía PI3K/AKT, así como la respuesta positiva luego de la estimulación con IGF1, indicó que en estas células, el mecanismo molecular y celular alterado es diferente al observado en ausencia de PINK1.

## 4.7 Conclusiones

- El silenciamiento de PINK1 o Parkin induce muerte celular y hace a las neuronas CAD más susceptibles al tratamiento con C2C.
- La muerte celular observada en las células silenciadas para PINK1 se relaciona con una disminución de la activación de AKT.
- El silenciamiento de PINK1 disminuye la activación de IGF1R.
- La muerte celular observada en las células silenciadas para Parkin no se asocia con una disminución de la activación de AKT.

# 5. Capítulo 5: Morfología mitocondrial

## 5.1 Introducción

Las mitocondrias son organelos de doble membrana donde se realiza la fosforilación oxidativa que es el proceso más importante para la producción de ATP (revisado en [351]). Adicionalmente conforman el centro de muchas vías de señalización, participan en la homeostasis del calcio, al amortiguar las descargas desde el retículo endoplasmático (RE) a través de sitios de unión especializados llamados MAMs (del inglés, *mitochondria-associated endoplasmic reticulum membranes*) (revisado en [352, 353]); además actúan en varias reacciones anabólicas y catabólicas involucradas en la acumulación y eliminación de metabolitos celulares esenciales [354]. Como bioproducto de su actividad respiratoria, son la principal fuente de producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) [355, 356] y son el núcleo de componentes apoptóticos que amplifican las señales de muerte celular tanto externas como internas (revisado en [357]).

Su morfología y ubicación dentro de la célula es dinámica. Las mitocondrias se organizan en filamentos y redes que resultan de la actividad de procesos de fusión y fisión, que en conjunto constituyen la dinámica mitocondrial [358]. Constantemente están moviéndose desde regiones perinucleares a regiones periféricas unidas a elementos del citoesqueleto (microtúbulos, filamentos de actina y filamentos intermediarios) (revisado en [359]) para lo cual deben disgregarse en cuerpos mitocondriales aislados, trasladarse al lugar de requerimiento y volver a fusionarse para establecer redes de mayor capacidad energética (revisado en [360]).

Lo anterior hace que el tamaño mitocondrial sea muy variable; es así que en cultivos primarios de neuronas de *Drosophila*, utilizando microscopía de fluorescencia de reflexión interna total, se reportó un rango de longitud mitocondrial de un orden de magnitud (de 0,4 a 5  $\mu\text{m}$ ) [361]. Este estudio, también permitió establecer la relación entre tamaño y movilidad, en donde mitocondrias más pequeñas se mueven más rápido y más lejos [361].

Estos procesos dinámicos regulan la función mitocondrial y aseguran la acumulación de mitocondrias en compartimentos subcelulares críticos, permiten el intercambio de contenido mitocondrial asegurando la integridad del genoma, la conectividad bioquímica y eléctrica, así como la homeostasis del calcio celular, síntesis de ATP y del  $\Delta\Psi_m$ ; en

neuronas además son indispensables para el transporte mitocondrial axonal y dendrítico (revisado en [362, 363]). Por lo cual, alteraciones en estos procesos de dinámica mitocondrial, recientemente se han asociado a enfermedades neurodegenerativas (revisado en [141, 364-366]).

Adicionalmente, el balance entre la tasa de fusión y fisión que se produce durante el ciclo celular [367], la diferenciación y el desarrollo embrionario [368, 369], la respuesta a estrés oxidativo, la apoptosis [370] y la mitofagia [371], contribuye al control de calidad mitocondrial y por lo tanto a la homeostasis celular.

Las proteínas encargadas de ejecutar los procesos de fusión y fisión son grandes GTPasas de la familia dinamina, DRP1, OPA1 y MFN1/2, donde diferentes modificaciones postraduccionales como fosforilación, ubiquitinación, sumoilación, s-nitrosilación y procesamiento proteolítico, regulan sus actividades y permiten el balance entre estos dos procesos [372-376]. Además, en mamíferos existen cuatro proteínas integrales de la MEM, FIS1 (del inglés, *mitochondrial fission protein 1*), Mff (del inglés, *mitochondrial fission factor*), MiD49 y MiD51 (del inglés, *mitochondrial dynamics proteins of 49 and 51 kDa* respectivamente), que actúan como receptores o proteínas adaptadoras para reclutar DRP1 a la superficie de la mitocondria e inducir fisión [377].

El proceso de fusión de membranas en general, comprende varios pasos: 1) el acercamiento de las dos membranas, el cual es mediado por Rab GTPasas (esta asociación es reversible), 2) el anclaje mediado por proteínas SNARE (del inglés, *soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor*) presentes en ambas membranas que establece una estructura muy estable y 3) la fusión propiamente dicha (revisado en [378]). Este proceso se asocia a perturbaciones locales en la integridad de las membranas en forma de agujeros lipídicos, los cuales hacen que el proceso de fusión sea termodinámicamente favorable [379].

Entre mitocondrias, el mecanismo de fusión involucra dos eventos distintos, la fusión de la MEM dada por las MFNs y la fusión de la membrana interna mitocondrial (MIM) regulada por OPA1 (revisado en [380]). Estos procesos están coordinados y en condiciones fisiológicas ocurren casi simultáneamente (revisado en [380]). Por otro lado durante el proceso de fisión mitocondrial la dinamina DRP1 es reclutada desde el citoplasma a sitios clave sobre la MEM donde se ensambla alrededor de la mitocondria y usa la hidrólisis de GTP para generar la fuerza necesaria para constreñir y romper la mitocondria (revisado en [380]).



## 5.2 Proteínas efectoras de los mecanismos de dinámica mitocondrial

### 5.2.1 Mitofusinas

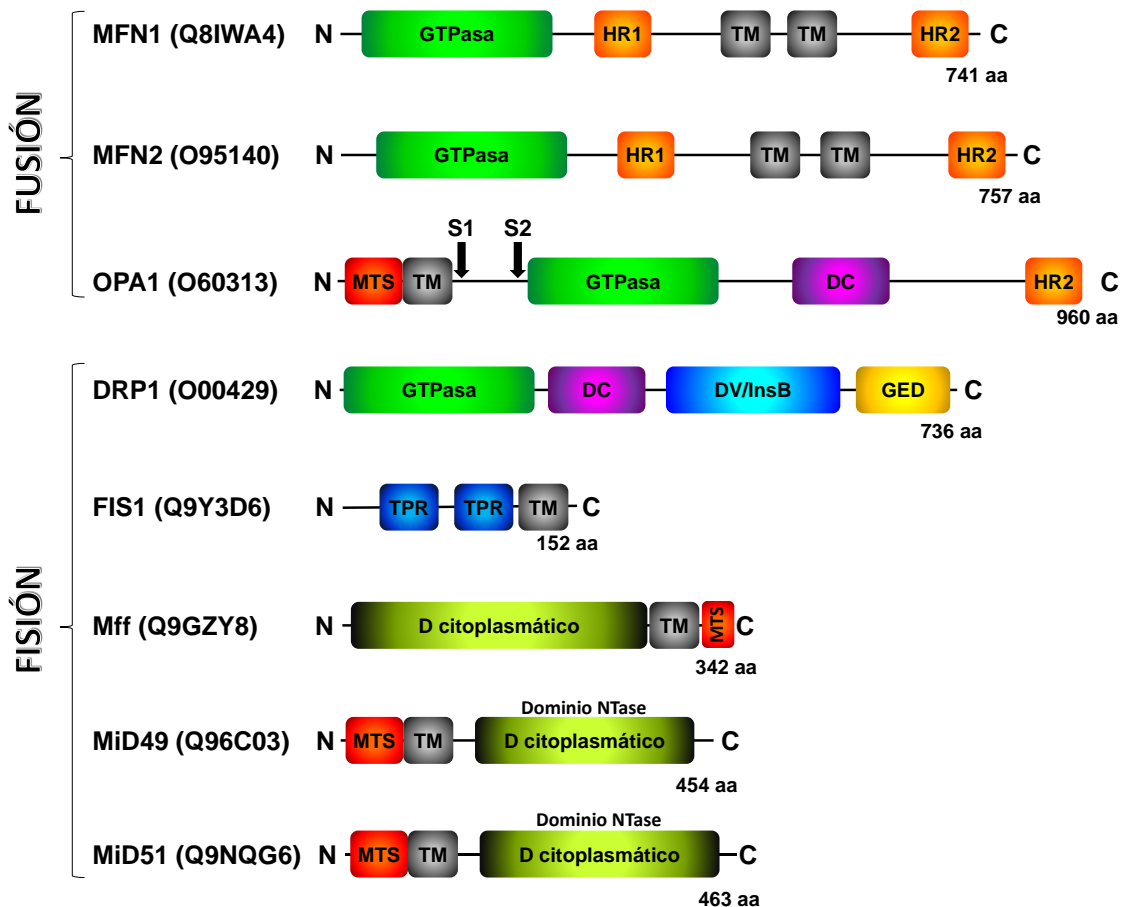
Las mitofusinas 1 y 2 (MFN1 y MFN2) son proteínas transmembranales que unen e hidrolizan GTP para inducir la fusión de la MEM [379]. Se requiere que estén presentes en mitocondrias adyacentes para formar oligómeros que actúen en *trans* y establezcan el acercamiento de los organelos para inducir la fusión de las dos membranas [381]. Estas proteínas son esenciales para el desarrollo embrionario [382, 383].

MFN1 y MFN2 comparten una estructura conservada que contiene un dominio GTPasa en el extremo N-t, dos regiones hidrofóbicas HR1, HR2 (del inglés, *repeat regions 1, 2*) y dos dominios transmembrana en tándem cerca del extremo C-t [381] (véase figura 5.1). Experimentalmente se ha demostrado que la interacción homotípica HR2/HR2 de MNF1 es importante para el acercamiento de mitocondrias vecinas mientras que el dominio GTPasa es necesario para la fusión completa [381]. Es así que MFN1 junto con OPA1 median la fusión mitocondrial [384], mientras que MNF2 es la encargada del acercamiento de las mitocondrias previo al evento de fusión [381], también se ha reportado que MNF2 permite la unión de las mitocondrias con el RE donde se establecen los sitios MAMs [385].

Al estudiar las interacciones moleculares de MFN2 se identificó una interacción entre dominios HR1 y HR2 que es inhibidora de la fusión; además existe una interacción entre HR1 de MFN2 y el C-t de la proteína de fisión DRP1, la cual está implicada en la promoción de la fusión mitocondrial [386].

Los mecanismos moleculares que regulan la actividad de MFNs son poco conocidos (véase figura 5.2), sin embargo recientemente se ha descrito que bajo estímulos pro-apoptóticos, ERK fosforila la T562 de MFN1 en el dominio HR1 lo cual afecta su habilidad para formar oligómeros, y se favorece la fisión y posterior apoptosis [376]. Además, en respuesta a estrés genotóxico, JNK fosforila MNF2 (en el residuo S27) y favorece la ubiquitinación mediada por Huwe1 (del inglés, *HECT, UBA and WWE domain containing 1, E3 ubiquitin protein ligase*) y final degradación proteosomal [387].

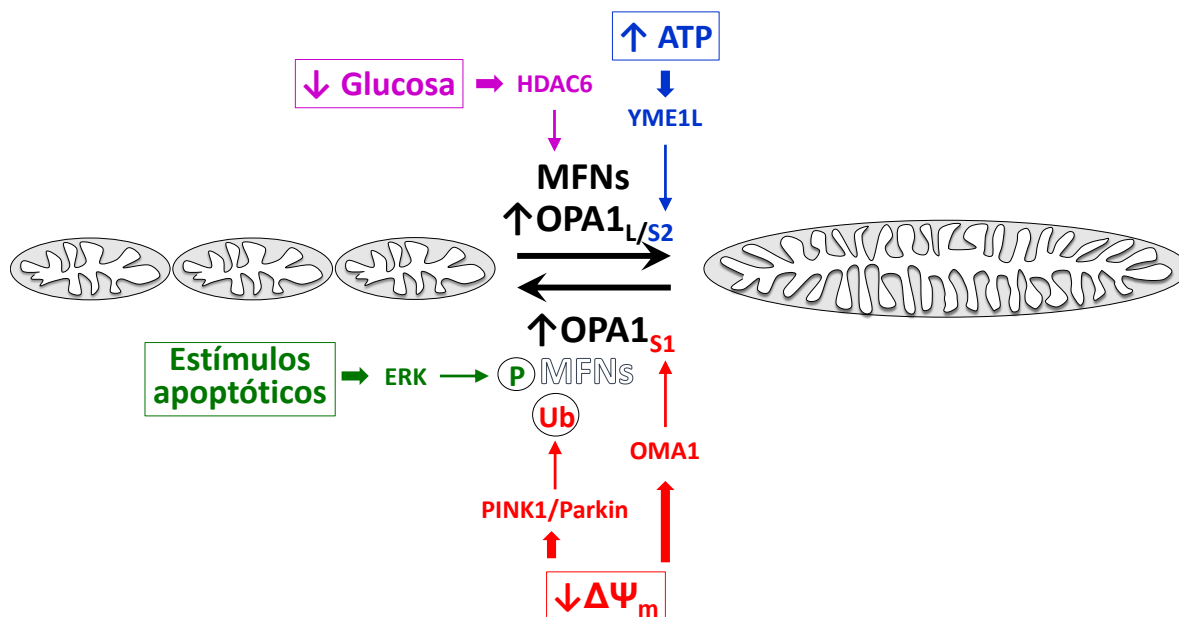
En *Drosophila sp* y células de mamíferos se ha reportado que las MFNs son sustratos de Parkin, [388-391] y que la acción de Parkin es promovida por la fosforilación que ejerce PINK1 sobre MFN2 (en los residuos T111 y S442) [392]. Al parecer, esta degradación de MFNs es necesaria para la mitofagia [393].



**Figura 5.1** Proteínas de dinámica mitocondrial

Representación gráfica de los dominios estructurales de las proteínas implicadas en los procesos de fisión y fusión mitocondrial en humanos. N (extremo amino terminal), C (extremo carboxi terminal), GTPasa (dominio con actividad GTPasa), HR1 yHR2 (repeticiones hidrofóbicas), TM (dominio transmembranal), MTS (señal de localización mitocondrial), DC (dominio medio o central), DV (dominio variable o dominio B, InsB), TPR (repeticiones hidrofóbicas de tetratricopéptidos), NTase (nucleotidil transferasa), S1 (sitio de clivaje 1), S2 (sitio de clivaje 2). Al final de cada esquema se especifica el número total de aminoácidos de cada secuencia. La mayoría de la información fue recopilada de la base de datos de secuencias de proteínas UniProtKB sección Swiss-Prot (<http://www.uniprot.org/>) [394]. Entre paréntesis se especifica el número identificador de UniProtKB. Para las proteínas MiDs, Mff y FIS la información fue complementada con publicaciones recientes [377, 380].

La actividad de MFN1 también puede ser regulada vía procesos de acetilación/deacetilación. La deacetilación mediada por HDAC6 (del inglés, *histone deacetylase 6*) induce fusión mitocondrial debido a estrés metabólico, al parecer el residuo implicado es la K222 ubicada en el dominio GTPasa [395].



**Figura 5.2 Regulación de la fusión mitocondrial**

Diversas condiciones celulares como niveles de glucosa, disponibilidad de ATP, estímulos apoptóticos y disminución del  $\Delta\Psi_m$  favorecen modificaciones postraduccionales de las proteínas MFNs y OPA1, que regulan el proceso de fusión mitocondrial. La presencia de MNFs, la deacetilación de MFN1 (mediada por HDAC6), así como la isoforma OPA1<sub>L</sub> o su clivaje en el sitio S2 (ejecutado por YME1L) regulan positivamente el proceso. Por el contrario bajo estímulos apoptóticos, la fosforilación de MFNs (mediada por ERK), o su ubiquitinación y posterior degradación, dependiente de la actividad de PINK1 y Parkin así como el aumento del clivaje en el sitio S1 de OPA1 inhiben el proceso de fusión mitocondrial, con lo cual se favorece su contraparte.

## 5.2.2 OPA1

Es la encargada de regular el proceso de fusión de la MIM, además está asociada con diferentes funciones como el mantenimiento de la cadena respiratoria y  $\Delta\Psi_m$ , la organización de las crestas mitocondriales y el control de la apoptosis [396]. Esta GTPasa de la familia dinamina tiene una secuencia de localización mitocondrial N-t, y se expresa ubicuamente en todas las células, siendo una proteína altamente conservada desde levaduras hasta humanos [397]. En humanos es codificada por el gen *OPA1* ubicado en el cromosoma 3q28-q29, el cual está compuesto por 30 exones (exón 1 al 28, exón 4b, exón 5b) que por mecanismo de *splicing* alternativo da origen a 8 secuencias de mRNA [398]. Sin embargo un análisis de mitocondrias de células HeLa, por *western blot* permitió la identificación de 5 isoformas de 95, 92, 88, 84 y 81 kDa [399]

La función de OPA1 está asociada a su procesamiento proteolítico. Luego de su importación dentro de la mitocondria, peptidasas mitocondriales clivan la señal de localización mitocondrial (MTS) después del aminoácido 87, originando una forma larga

denotada como OPA1<sub>L</sub> la cual queda anclada a la MIM [368]. Evidencia experimental demuestra que OPA1<sub>L</sub> es la encargada de la fusión de la MIM y del mantenimiento de la ultraestructura de las crestas mitocondriales [400], por lo cual la sobre-expresión de OPA1 confiere resistencia a la apoptosis [401, 400]. OPA1<sub>L</sub> puede ser clivada en el aminoácido 195 (sitio de clivaje S1) resultando una isoforma corta, OPA1<sub>S</sub> que debido a que está desprovista del dominio TM (véase figura 5.1), se localiza en el EIM [368], lo cual se asocia con inhibición de la fusión y por ende con aumento de la fragmentación mitocondrial [400]. El clivaje en S1 depende del  $\Delta\Psi_m$ . Cuando la mitocondria se despolariza, la metaloendopeptidasa OMA1 (del inglés, *overlapping activity with m-AAA protease*) ubicada en la MIM, se autocliva y es la responsable de clivar OPA1<sub>L</sub> en S1; sin embargo, el mecanismo por el cual la caída del  $\Delta\Psi_m$  induce la activación de OMA1 aún no se conoce [402].

Todas las isoformas de OPA1 tienen el sitio S1, y las isoformas 4, 6, 7 y 8 tienen un segundo sitio de clivaje llamado S2 ubicado entre los aminoácidos 217-223; el clivaje en S2 favorece la fusión de la MIM, y es llevado a cabo por YME1L [397, 403], un tipo de metaloproteasa dependiente de ATP asociada al EIM que forma oligómeros en la MIM y cuya actividad depende de la disponibilidad de ATP y de la fosforilación oxidativa; por lo tanto, en condiciones donde se alteran estos procesos, YME1L es degradada y se potencia la fisión mitocondrial [404, 405].

### 5.2.3 DRP1

Es la proteína que ejecuta la fisión mitocondrial. Se trata de una GTPasa citoplasmática perteneciente a la familia dinamina de ~80 kDa codificada por el gen *DNML1* que tiene 20 exones [406]. Dependiendo de modificaciones postraduccionales se traslada a la mitocondria uniéndose a receptores de la MEM como FIS1 [407], Mff [408, 377], MiD49 y MiD51 [409, 410]. Una vez ubicada en la MEM, se polimeriza en forma de espiral y genera un anillo de constricción que por hidrólisis de GTP puede producir la división de la mitocondria [411].

DRP1 tiene cuatro dominios: (1) un dominio GTPasa ubicado en el extremo N-t, (2) un dominio medio o central (DC) necesario para la oligomerización, (3) un dominio variable (DV) donde ocurren la mayoría de las modificaciones postraduccionales (este dominio también puede ser denotado como dominio B) y (4) un dominio GED (del inglés, *GTPase effector domain*) en el extremo C-t el cual interactúa con el dominio GTPasa y el DC (véase figura 5.1) (revisado en [412]).

En humanos, por mecanismo de *splicing* alternativo de los exones 15 y 16 se han reportado 4 variantes de DRP1 que presentan especificidad de tejido; la isoforma más grande que

contiene los 20 exones y codifica una proteína de 736 aa es la más abundante en el cerebro [413, 406].

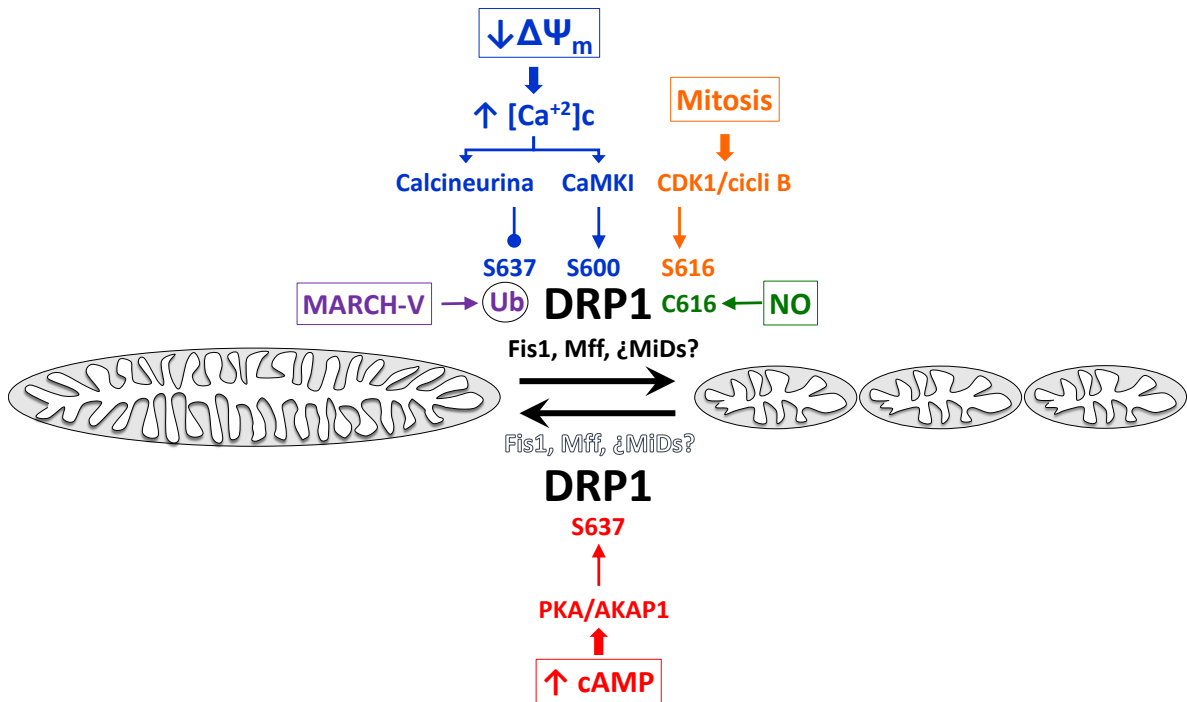
La actividad de DRP1 es regulada por modificaciones postraduccionales como fosforilación [372, 373, 414, 367], sumoilación [415, 375, 416], ubiquitinación [417-419], glicosilación [420] y S-nitrosilación [421, 422], que en general modulan interacciones proteína-proteína, degradación proteica y activación de vías de señalización. Es importante tener en cuenta que debido a las diferentes variantes de *splicing* las modificaciones postraduccionales de DRP1 pueden ser diferentes [412].

La desfosforilación del residuo S637 (dependiendo de la variante de *splicing* puede ser S656) ubicado en la unión entre el DV y el GED, provoca el traslado de DRP1 a la mitocondria y consecuentemente la fisión mitocondrial, aumento de la permeabilidad de la MEM y apoptosis [373, 374]. Tal evento es mediado por la fosfatasa calcineurina, cuya actividad es dependiente del aumento del calcio intracelular, inducido por pérdida del  $\Delta\Psi_m$  y disminución abrupta de los niveles de ATP, entre otras (véase figura 5.3) [373, 374].

Este evento también puede ser influenciado por otra modificación postraduccional la O-N-acetil-glucosamina-glicosilación en las T585 y T586 del DV de DRP1 lo cual disminuye la fosforilación en la S637 [420]. La señalización dependiente de calcio también puede activar la proteína quinasa CaMKI $\alpha$  (del inglés, *Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase I*) y ésta a su vez fosforilar el residuo S600 (ubicado en el DV) lo cual se asocia también con un aumento de la localización mitocondrial de DRP1 y al parecer mayor afinidad por FIS1 [423].

Por el contrario la fosforilación de la S637 por PKA, inhibe su actividad GTPasa al disminuir la interacción de los dominios de unión a GTP y dominio central (DC) con el dominio GED inhibiendo la división mitocondrial [414].

Por otro lado, la fosforilación del residuo S616 por el complejo CDK1 (del inglés, *cyclin-dependent kinase/ciclinaB*) regula la fisión mitocondrial durante la división celular [367]. Kashatus *et al.* reportaron que este proceso es mediado junto a otra quinasa mitótica llamada Aurora A quien activa (por fosforilación en el residuo S194) a la pequeña GTPasa tipo Ras (RalA) permitiendo que se relocalice en la MEM y concentre RalBP1 (proteína efectora) para que actúe como proteína andamio de CDK1/ciclina B para que pueda acceder y fosforilar a DRP1 [424].



**Figura 5.3 Regulación de la fisión mitocondrial**

La fisión mitocondrial es regulada principalmente por modificaciones postraduccionales de DRP1 y por la presencia de las proteínas FIS1, Mff y MiDs. El aumento de la concentración de calcio citoplasmático ( $[Ca^{2+}]_c$ ) activa la fosfatasa calcineurina y la quinasa CaMKI, las cuales actúan sobre DRP1 desfosforilando y fosforilando respectivamente DRP1 en residuos diferentes de serinas. Tales cambios favorecen el proceso de fisión. Adicionalmente el aumento de óxido nítrico (NO), la actividad de CDK1 y la ubiquitinación mediada por MARCH-V sobre DRP1 también inducen fisión. Por el contrario la fosforilación en el residuo S637 mediado por PKA/AKAP1 y la ausencia de FIS1, Mff y MiDs se asocia a inhibición de la fisión y consecuente fusión mitocondrial. MiDs, entre símbolos de interrogación, representa su participación controvertida como reguladoras de dinámica mitocondrial.

La mayoría de los estudios asociados a DRP1 evalúan la significancia biológica y los mecanismos de fosforilación/desfosforilación que la regulan, pero se han reportado otras modificaciones como la sumoilación, ubiquitinación, glicosilación y la s-nitrosilación que también impactan la función de DRP1. Sin embargo los mecanismos moleculares aún no son bien conocidos.

La unión de proteínas SUMO (del inglés, *small ubiquitin-like modifier*) frecuentemente altera la localización subcelular de las proteínas, así como también las protege de degradación mediada por ubiquitina [425]. Actualmente se conoce que DRP1 es sustrato de MAPL (del inglés, *mitochondria-associated protein ligase*) [426], una Sumo E3 ligasa, así como de la sumoproteasa SenP5 [416], sin embargo el efecto de la sumoilación de

DRP1 aún no es claro, pero el hecho de que esta modificación ocurra en el DV de la proteína sugiere que puede afectar interacciones de DRP1 con la MEM o con otras proteínas para estabilizarla [427, 375].

Adicionalmente DRP1 puede ser ubiquitinada por la E3 ubiquitin ligasa mitocondrial MARCH-V (del inglés, *membrane-associated RING finger protein 5*) [428]. Estudios han demostrado que MARCH-V es importante para que se dé el evento de fisión mitocondrial pues su regulación a la baja conduce a la presencia de mitocondrias alargadas [417-419]; sin embargo el mecanismo por el cual lo regula aun no es claro.

Por último, se conoce que la adición covalente de óxido nítrico a residuos cisteína de las proteínas desempeña un papel general en la modulación fisiológica y fisiopatológica de funciones de las proteínas de mamíferos [429]. Se conoce que DRP1 puede ser blanco de S-nitrosilación en el residuo C644 lo cual resulta en una hiperactividad GTPasa y fragmentación mitocondrial reportada en enfermedad de Alzheimer así como enfermedad de Huntington [421, 422]

### 5.2.4 Proteínas adaptadoras de DRP1

Las proteínas adaptadoras reclutan y favorecen la actividad GTPasa de DRP1 y así su ensamblaje en la MEM. Específicamente en vertebrados se han identificado cuatro proteínas integrales de MEM que funcionan como adaptadoras: una proteína conservada en levaduras (FIS1), una proteína que está conservada en metazoarios (Mff) y dos proteínas específicas de vertebrados (MiD49 y MiD51), todas ellas, al interactuar con DRP1 forman un puente con la MEM estableciendo lo que se conoce como complejos de fisión (revisado en [430] y referencias allí citadas).

FIS1 se distribuye en toda la MEM anclada a través de su dominio C-t y contiene dos repeticiones hidrofóbicas de tetratricopéptidos (TPR) (véase figura 5.1) motivos que se asocian a interacciones proteína-proteína; posiblemente FIS1 pueda formar dímeros en la MEM, todo esto contribuiría a su interacción con DRP1 [431, 432]. Su función en el proceso de fisión ha sido muy discutido y aun cuando al principio se consideró clave en el proceso, posteriores hallazgos determinaron que no es indispensable para que ocurra [377]. Por otro lado Mff es considerado un factor esencial para la función de DRP1 durante la fisión en células de mamíferos [408].

MiD49 y MiD51 son proteínas de MEM que reclutan DRP1 a la superficie mitocondrial, su intervención como moduladores positivos o negativos de la fisión ha sido controversial [410, 409, 433]. Modelos celulares con sobre-expresión de MiDs se han asociado a elongación, lo cual parece depender de su capacidad de unir y favorecer la fosforilación inhibitoria de DRP1 (S637); pero bajo condiciones de estrés mitocondrial provocado por

CCCP (carbonilcianuro-m-clorofenilhidrazona) las MiDs pueden reclutar DRP1 y mediar la fisión en ausencia de Fis1 y Mff [377].

MiD51 forma dímeros y adquiere un plegamiento típico de las nucleotidil transferasas (probablemente enzimáticamente inactiva) que le permite unir ADP y en menor medida GDP que actúan como cofactores; de esta manera, MiD51 aumenta la actividad GTPasa de DRP1 e induce su oligomerización y posterior fisión mitocondrial, sin embargo el reclutamiento de DRP1 es independiente de la unión de ADP o GDP [434]. Por otro lado MiD49 parece no formar dímeros y aun cuando también tiene un dominio nucleotidil transferasa, el bolsillo de unión a ADP no permite la unión del nucleótido, por lo cual se especula que posiblemente una un ligando aún desconocido y que su forma monomérica pueda facilitar una disposición de DRP1 diferente, lo cual impacte su actividad de fisión [435, 436].

Claramente como menciona Bui *et al.*, la existencia de varios adaptadores que se expresan simultáneamente, complica el estudio de su contribución en el reclutamiento de DRP1 y se requieren estudios adicionales para determinar si combinaciones diferentes de proteínas adaptadoras trabajan juntas para mediar el reclutamiento de DRP1 bajo determinadas circunstancias, si su función y disponibilidad varía dependiendo del tipo celular y si son modulados por diferentes vías de señalización celular [430].

## 5.3 Objetivo específico

Evaluar el efecto del silenciamiento de los genes *PINK1* o *Parkin* en la dinámica mitocondrial de células CAD tratadas con C2-ceramida.

## 5.4 Metodología

### 5.4.1 Evaluación de la morfología mitocondrial

- **Marcaje con MitoTracker® Red:**

Las células CAD shControl, CAD shPINK1 y CAD shParkin fueron cultivadas sobre cubreobjetos pretratados con Poli-L-Lisina dispuestos en cajas de 2 cm de diámetro (100.000 células/caja) durante 3 días en medio de diferenciación, antes de aplicar cualquier tratamiento.

- Como control de fusión se usó Forskolina (20  $\mu$ M) durante 6 h en células CAD shControl.



- Células CAD shControl, CAD shPINK1 y/o CAD shParkin fueron tratadas con C2C (10  $\mu$ M) durante 6 h.
- Cumplidos los tiempos de incubación, el medio de cultivo fue sustituido por DMEM-F12 puro (sin antibióticos y sin SFB) precalentado a 37 °C. Las mitocondrias fueron marcadas con *MitoTracker® Red CMXRos* a una concentración final previamente estandarizada de 188 nM durante 1 h (véase anexo F).
- Luego de transcurrido el tiempo de marcaje, se preparó el control de fisión, que consistió en células CAD shControl tratadas con CCCP (10  $\mu$ M) durante 2 min.
- Luego se hicieron dos lavados con 2 ml de DMEM F-12 puro precalentado a 37 °C y las células se incubaron durante 10 min, este proceso se repitió 4 veces.
- Las células fueron fijadas con paraformaldehído al 4 % durante 10 min y permeabilizadas con acetona fría durante 120 s exactos, luego se lavaron 2 veces con 1 ml de PBS y una vez con agua destilada-desionizada estéril, los vidriecillos se montaron en portaobjetos con el medio de montaje con *Hoescht* y los bordes se fijaron con esmalte de uñas.
- Las láminas fueron guardadas en oscuridad a -20 °C hasta el momento de tomar las fotos.
  
- **Adquisición de imágenes:**
- Las imágenes, se adquirieron usando un microscopio confocal Nikon C1 Plus ECLIPSE Ti con objetivo de 60X de inmersión en aceite, con una apertura numérica de 1,4; y distancia de trabajo de 0,13 mm. Se capturaron imágenes de células únicas con un *zoom* de 2X, se registraron 11 secciones ópticas cada 0,4  $\mu$ m, usando de forma independiente el láser HeNe 1 MW (543 nm) para el *MitoTracker® Red* y el láser diodo 17 MW (408 nm) para *Hoescht*. Por cada condición, se seleccionaron aleatoriamente 30 células que estuvieran aisladas. Las secciones ópticas de cada célula fueron fusionadas con la proyección de máxima intensidad usando el programa ImageJ, compilación ConfocalUniovi ImageJ. versión 1.51.
  
- **Conteo celular y análisis de imágenes**
- El conteo de las células se realizó por observación directa en el microscopio confocal, con el objetivo de 60X de inmersión en aceite, usando los filtros respectivos para observar *MitoTracker® Red* y los núcleos marcados con *Hoescht*.
- Se contaron los campos necesarios hasta completar mínimo 100 células por cada experimento.
- Teniendo en cuenta la morfología observada en los controles de fisión y fusión, se consideraron células con mitocondrias fisionadas, aquellas que no presentaban una morfología como el control de fusión con Forskolina. No se diferenció entre fisión total y fisión parcial.

- Para analizar la morfología mitocondrial en cada una de las fotos de células únicas, se utilizó el macro *Mito-Morphology* desarrollado por Ruben K. Dagda el cual funciona con la versión 1.44 de ImageJ [347]. Se realizaron algunas modificaciones en el macro para facilitar el análisis (véase anexo G). Las modificaciones realizadas fueron discutidas vía correo electrónico con el autor del mismo.
- El contenido mitocondrial (CM) se calculó dividiendo el área ocupada por mitocondrias sobre el área celular.
- El índice de interconectividad mitocondrial se calculó dividiendo el contenido mitocondrial sobre el perímetro mitocondrial total. A medida que aumenta el fraccionamiento mitocondrial, el perímetro se incrementa y por lo tanto el índice disminuye.
  
- **Western blot de proteínas de dinámica mitocondrial**
- Las células CAD shControl, CAD shPINK1 y CAD shParkin se cultivaron durante 3 días en medio de diferenciación, sobre cajas pre-tratadas con Poli-L-Lisina de 3,5 cm de diámetro (250.000 células/caja) y luego se procedió a aplicar los tratamientos.
- Los tratamientos consistieron en IGF1 (100 ng/ml), C2C (25  $\mu$ M) o pre-tratamiento con IGF1 (100 ng/ml) durante 30 min, seguido de 6 h de tratamiento con C2C (25  $\mu$ M), adicionalmente como control de tratamiento, las células se incubaron con 0,1 % v/v de DMSO (vehículo donde se diluyó la C2C).
- Siguiendo el protocolo estándar de *western blot*, se analizaron las proteínas de fisión FIS1 y pDRP1 (S637), y de fusión OPA1 y MFN1.

#### 5.4.2 Evaluación del potencial de membrana mitocondrial usando JC-1.

La transferencia de electrones a través de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial produce energía que se conserva como un gradiente de protones (energía potencial) que consiste en un potencial eléctrico transmembranal negativo en el interior; en cultivos de neuronas corticales de rata el  $\Delta\Psi_m$  en reposo es de -139 mV el cual puede variar entre -108 mV y -158 mV dependiendo de la demanda de ATP y del metabolismo dependiente de  $Ca^{+2}$  [437].

JC-1 es un catión lipofílico (yoduro de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetil benzimidazol carbocyanina) que se acumula en organelos que poseen un potencial de membrana negativo, esto lo hace ideal para determinar el  $\Delta\Psi_m$ . La medición de dicho parámetro se basa en el cambio en la energía de la fluorescencia emitida por el fluoróforo, luego de ser excitado a 490 nm. Dependiendo de la forma en la que se disponga (monómeros o agregados) JC-1 tiene dos longitudes de onda de emisión: 527 nm cuando está en forma

de monómero (fuera de la mitocondria) y 590 nm cuando está agregado (dentro de la mitocondria con  $\Delta\Psi_m$  desde -100 mV) [438, 439].

En este proyecto el  $\Delta\Psi_m$  se determinó de manera relativa usando JC-1 (Molecular Probes® M-34152) utilizando un protocolo de células adherentes en placas de 96 pozos, y por citometría de flujo. Se reportó el cociente entre la intensidad de la fluorescencia roja sobre la verde.

#### Protocolo de células adherentes en placas de 96 pozos:

- Las células CAD silvestres, CAD shControl, CAD shPINK1 y CAD shParkin se cultivaron durante 3 días en 200  $\mu$ l de medio de diferenciación, en placas de 96 pozos pretratados con Poli-D-Lisina (7.000 células/pozo). Para cada experimento se sembraron 9 pozos por tratamiento.
- Los tratamientos se aplicaron sin cambiar el medio de cultivo. Consistieron en IGF1 (100 ng/ml), C2C (25  $\mu$ M) o pre-tratamiento con IGF1 (100 ng/ml) durante 30 min, seguido de 6 h de tratamiento con C2C (25  $\mu$ M).
- Se prepararon tres controles en cada experimento: (1) Control sin tinción (usado como blanco de la técnica); (2) Control con tinción y vehículo de la C2C (0,1 %v/v de DMSO por 6 h, usado como control de los tratamientos) y (3) control positivo de despolarización que consistió en la adición del desacoplador de membrana mitocondrial CCCP (50  $\mu$ M durante 5-10 min antes de la lectura).
- Luego de cumplidos los tiempos de incubación de los tratamientos, se adicionaron 4  $\mu$ l de una solución de trabajo de JC-1 (50  $\mu$ g/ml), para obtener una concentración final de 0,10  $\mu$ g/ml en cada pozo. Las cajas fueron incubadas durante 15 min, a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> y en oscuridad.
- Una vez cumplido el tiempo de incubación se retiró el medio y se hicieron dos lavados con 100  $\mu$ l PBS a 37 °C.
- Luego del último lavado se adicionaron 100  $\mu$ l PBS a 37 °C y a los pozos correspondientes al control positivo de despolarización se les adicionó 0,5  $\mu$ l de CCCP (5 mM) para una concentración final de 25  $\mu$ M. Luego se procedió a leer la placa lo más rápido posible. (Nota: la placa se mantuvo en oscuridad y siempre a 37 °C antes de la lectura).
- Se utilizó un fluorómetro *Twinkle LB 970* de *Berthold Technologies* con un filtro de excitación de 485 nm y uno de emisión de 600 nm para detectar los agregados de JC-1 (rojo), mientras que los monómeros de JC-1 (verde) se detectaron con un filtro de emisión de 535 nm.
- Para realizar los cálculos relativos del  $\Delta\Psi_m$ , se determinó la intensidad de fluorescencia (IdF) corregida (IdF registrada - IdF control sin tinción) y se calculó el cociente entre la señal rojo/verde.

### Protocolo JC-1 por citometría de flujo

- Las células CAD shControl, CAD shPINK1 y CAD shParkin se cultivaron durante 3 días en medio de diferenciación, sobre cajas pre-tratadas con Poli-L-Lisina de 6 pozos (250.000 células/caja) y luego se procedió a aplicar los tratamientos.
- Los tratamientos consistieron en IGF1 (100 ng/ml), C2C (25  $\mu$ M) o pre-tratamiento con IGF1 (100 ng/ml) durante 30 min, seguido de 6 h de tratamiento con C2C (25  $\mu$ M), adicionalmente como control de tratamiento, las células se incubaron con 0,1 %v/v de DMSO (vehículo donde se diluyó la C2C).
- Se prepararon tres controles: (1) Control sin tinción (para ubicar la población de estudio en la gráfica FSC-SSC); (2) Control con tinción y vehículo de la C2C (0,1 %v/v de DMSO por 6 h, usado como control de los tratamientos) y (3) control positivo de despolarización que consistió en la adición del desacoplador de membrana mitocondrial CCCP (50  $\mu$ M durante 5-10 min antes de la lectura).
- Luego de cumplidos los tiempos de incubación de los tratamientos, se adicionaron 20  $\mu$ l de una solución de trabajo de JC-1 (50  $\mu$ g/ml), para obtener una concentración final de 0,10  $\mu$ g/ml en cada pozo. Las cajas fueron incubadas durante 15 min, a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> y en oscuridad.
- Una vez cumplido el tiempo de incubación se retiró el medio y se hizo un lavado con 500  $\mu$ l PBS a 37 °C.
- Para desprender las células, se adicionaron 200  $\mu$ l de tripsina 1X a cada pozo, y las células se recogieron en 1 ml de DMEM-F12 suplementado con 1% de SFB para inactivar la tripsina (es importante que todo el proceso se haga a 37 °C), se centrifugaron a 900 rpm
- Se descartó el sobrenadante y el pellet (el cual debía tener un color rosado, que indicara que la tinción fue exitosa) se resuspendió en 500  $\mu$ l de PBS
- Se procedió a leer, se usó el láser de argón (488 nm) para excitar y los filtros de emisión de 525 nm para FITC (color verde) y 620 para PE-TxRed (ficoeritrina-rojo Texas) para el color rojo. Como control de compensación, se usaron las células tratadas con CCCP.

## 5.5 Resultados

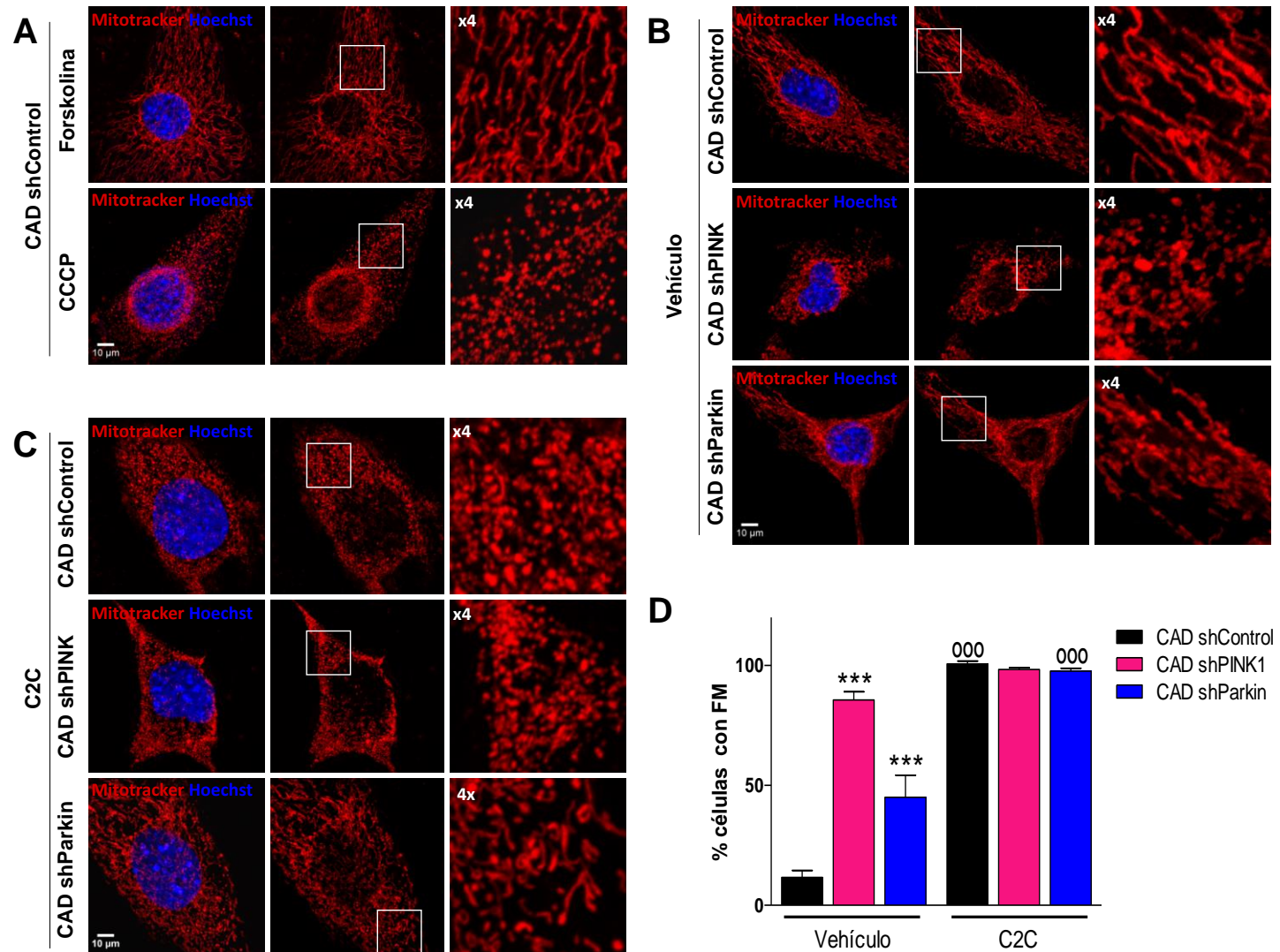
### 5.5.1 El silenciamiento de PINK1 o Parkin altera la morfología mitocondrial favoreciendo la fisión

Según el conteo directo de células marcadas con *MitoTracker® Red*, el 85,67 % de las células CAD shPINK1 y el 45% de las CAD shParkin mostraron un fenotipo mitocondrial fisionado, significativamente diferente a las células CAD shControl (véase figura 5.4 B y D).

**Figura 5.4 El silenciamiento de PINK1 o Parkin incrementa el número de células con redes mitocondriales fisionadas**

Microfotografías representativas de células CAD shControl, CAD shPINK1 y CAD shParkin, las mitocondrias fueron marcadas con *MitoTracker® Red CMXRos* y lo núcleos con *Hoescht*. **(A)** células CAD shControl luego de exposición a Forskolina (20  $\mu$ M) durante 6 h (control de fusión mitocondrial) o CCCP 10  $\mu$ M durante 30 min (control de fisión mitocondrial). **(B)** células CAD shControl, CAD shPINK1 y CAD shParkin en medio de diferenciación + vehículo (0,01% DMSO). **(C)** células CAD shControl, CAD shPINK1 y CAD shParkin tratadas con C2C (10  $\mu$ M) durante 6 h. **(D)** Gráfica del porcentaje de células con fisión mitocondrial (FM). Las barras representan medias  $\pm$  SEM de 100 células provenientes de 3 experimentos. ANOVA de dos vías (tipo de células:  $p < 0,0001$ ; tratamiento:  $p < 0,0001$ ; interacción:  $p < 0,0001$ ), para comparaciones múltiples se aplicó la prueba de contrastes *T* de Bonferroni. (\*) Indica diferencias significativas respecto a las células CAD shControl de cada grupo de tratamiento y (°) indica diferencias significativas respecto a las células tratadas con el vehículo (\*  $p < 0.05$ ; °°  $p < 0.01$ ; \*\*\*/°°°  $p < 0.001$ ). (Página siguiente).

Figura 5.4 (continuación)



Sin embargo la fisión no fue tan marcada como la observada en las células tratadas con el desacoplador mitocondrial CCCP (véase figura 5.4 A). Adicionalmente el tratamiento con C2C provocó alrededor de un 100 % de células con mitocondrias fisionadas en todos los tipos celulares, caracterizándose por una fisión similar a la que se observó en presencia de CCCP (véase figura 5.4 C). Así mismo el aumento en la fisión mitocondrial de las células CAD shPINK1 y aquellas tratadas con C2C, se relacionó con una tendencia a incrementar el número de mitocondrias por célula, en comparación con las CAD shControl y con aquellas tratadas con vehículo (véase figura 5.5 A).

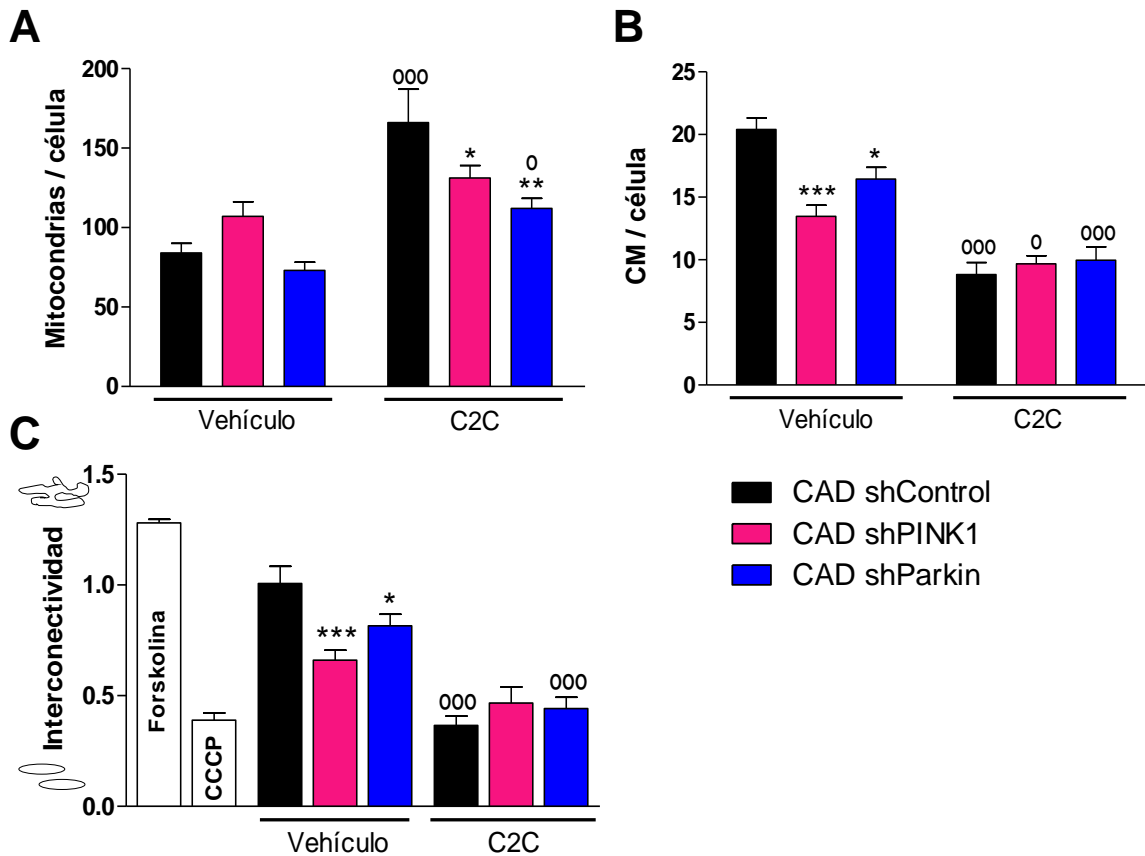
Los resultados del ANOVA de dos vías mostraron que tanto el silenciamiento de los genes, como el tratamiento con C2C afectaron significativamente el número de mitocondrias por célula ( $p=0,0065$  y  $p<0.0001$  respectivamente), además se demostró que el efecto de la exposición a C2C cambia dependiendo del tipo celular ( $p=0,0219$ ) (véase figura 5.5 A).

### **5.5.2 El silenciamiento de PINK1 o Parkin disminuyen el contenido y la interconectividad mitocondrial**

A pesar del incremento en el número de mitocondrias observado en las CAD shPINK1 y en aquellas tratadas con C2C (véase figura 5.5 A), el contenido total de masa mitocondrial por célula se vio significativamente disminuido en los casos antes mencionados. Tanto las CAD shPINK1 como las CAD shParkin tienen menos área celular ocupada por mitocondrias, 13 % y 16 % respectivamente, en comparación con las CAD shControl donde más del 20 % del área corresponde a mitocondrias (véase figura 5.5 B). El ANOVA de dos vías mostró que tanto el silenciamiento de los genes, como el tratamiento con C2C afectaron significativamente el contenido mitocondrial por célula ( $p=0,0044$  y  $p<0.0001$  respectivamente), además se demostró que el efecto de la exposición a C2C cambia dependiendo del tipo celular ( $p=0,0001$ ).

Respecto a la interconectividad mitocondrial, el silenciamiento de cualquiera de los dos genes, en ausencia de C2C la disminuyó significativamente, PINK1 ( $p<0,0001$ ) y Parkin ( $p<0,05$ ) (véase figura 5.5 C). Sin embargo, el tratamiento con C2C fue la causa principal de la disminución en la interconectividad mitocondrial observada ( $p<0,0001$ ).

Para entender cuál era el mecanismo molecular asociado a la fisión mitocondrial observada en las células CAD shPINK1 y CAD shParkin, se evaluaron los niveles de expresión de proteínas claves de los procesos de fusión y fisión mitocondrial, en presencia o no del neurotóxico C2C. Por otro lado, teniendo en cuenta los resultados mostrados en el capítulo 4, así como en los previamente publicados por el grupo, donde se demostró que la sobreexpresión de PINK1 protege contra la muerte celular inducida por C2C a través de la activación AKT [338], se decidió utilizar IGF1 como activador de la vía PI3K/AKT y constatar si tal activación protegía contra los cambios asociados al silenciamiento de los genes PINK1 o Parkin.



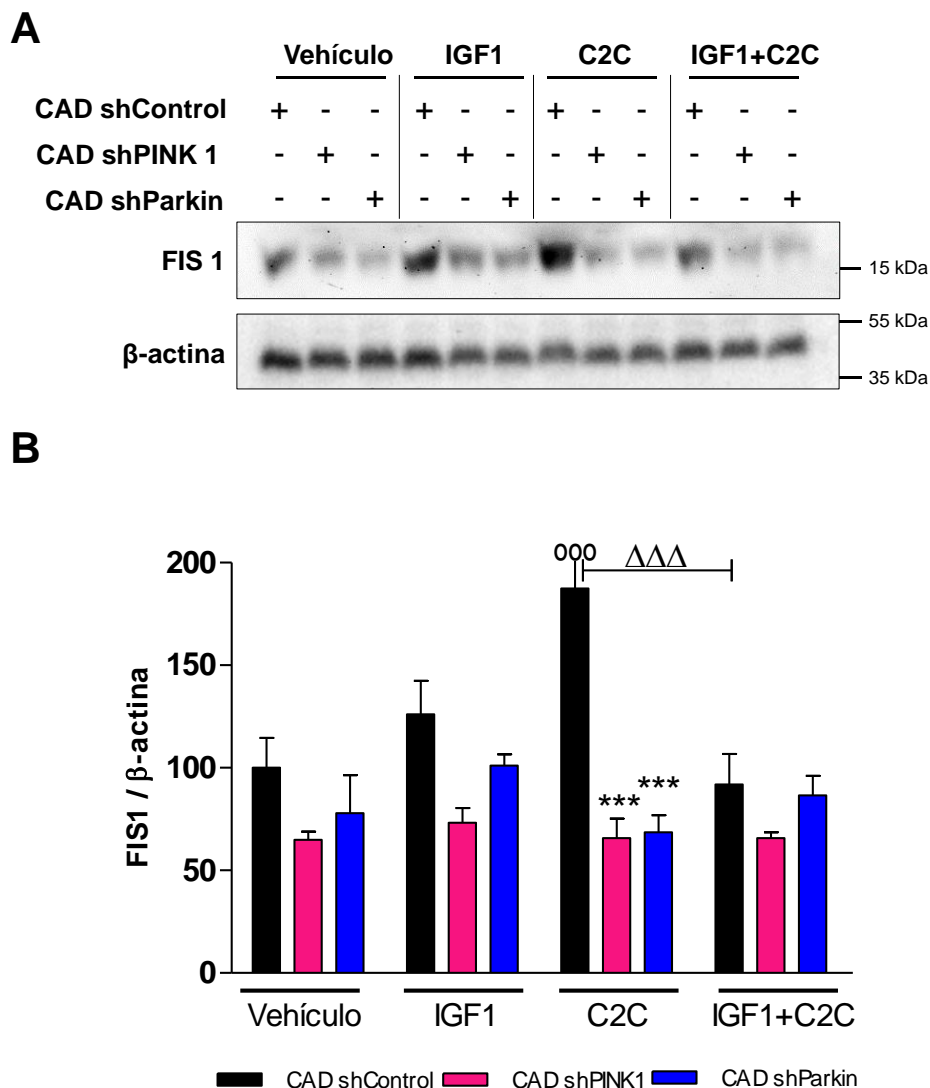
**Figura 5.5** El silenciamiento de *PINK1* o *Parkin* disminuyen el contenido y la interconectividad mitocondrial

(A) Número de mitocondrias por célula. ANOVA de dos vías (tipo de células:  $p=0,0065$ ; tratamiento:  $p<0,0001$ ; interacción:  $p=0,0219$ ). (B) Contenido mitocondrial (CM) por célula. ANOVA de dos vías (tipo de células:  $p=0,0044$ ; tratamiento:  $p<0,0001$ ; interacción:  $p=0,0001$ ) (C) Interconectividad mitocondrial por célula. ANOVA de dos vías (tipo de células:  $p=0,1111$ ; tratamiento:  $p<0,0001$ ; interacción:  $p=0,0008$ ). Las barras representan medias  $\pm$  SEM de 30 células provenientes de 3 experimentos. Para comparaciones múltiples se aplicó la prueba de contrastes *T* de Bonferroni. (\*) Indica diferencias significativas respecto a las células CAD shControl de cada grupo de tratamiento y (°) indica diferencias significativas respecto a las células tratadas con el vehículo (\*<sup>/°</sup>  $p<0,05$ ; \*\*<sup>/00</sup>  $p<0,01$ ; \*\*\*<sup>/000</sup>  $p<0,001$ ).

### 5.5.3 El silenciamiento de *PINK1* o *Parkin* disminuyen la expresión de FIS1

Independientemente de los tratamientos a las que se sometieron las diferentes células, la expresión de FIS1 fue significativamente menor en las células CAD shPINK1 y CAD shParkin en comparación con las CAD shControl, ( $p<0,0001$ ) (véase figura 5.6 A y B).





**Figura 5.6 El silenciamiento de PINK1 o Parkin disminuyen la expresión de FIS1.**

**(A)** *Western blot* representativo de FIS1 y  $\beta$ -actina de células CAD shControl, CAD shPINK1 y CAD shParkin, luego de 6 h de tratamiento con vehículo (DMSO 0,1 %v/v), IGF1 (100 ng/ml), C2C (25  $\mu$ M) o pre-tratamiento con IGF1 (100 ng/ml) durante 30 min, seguido de 6 h de tratamiento con C2C (25  $\mu$ M). **(B)** Densitometría de FIS 1/ $\beta$ -actina. ANOVA de dos vías (tipo de célula:  $p < 0,0001$ ; tratamiento:  $p = 0,0868$ ; interacción  $p = 0,0087$ ). Todos los datos fueron normalizados respecto a las células CAD shControl tratadas con vehículo y representan medias  $\pm$  SEM de cuatro experimentos independientes. Para comparaciones múltiples se aplicó la prueba de contrastes *T* de Bonferroni. (\*) Indica diferencias significativas respecto a las células CAD shControl de cada grupo de tratamiento y (°) indica diferencias significativas respecto a las células tratadas con el vehículo (\*<sup>°</sup>  $p < 0,05$ ; \*\*/<sup>00</sup>  $p < 0,01$ ; \*\*\*/<sup>000</sup>  $p < 0,001$ ).

Por su parte, el tratamiento con C2C aumentó significativamente la expresión de FIS1 en las células CAD shControl ( $p < 0,0001$ ) y tal incremento fue impedido por el pre-tratamiento

con IGF1 ( $p < 0,0001$ ). Finalmente se concluyó que la fisión mitocondrial observada en las células silenciadas para PINK1 o Parkin no depende de la expresión de FIS1 mientras que la observada en las células shControl tratadas con C2C depende del aumento de la proteína adaptadora FIS1, por lo tanto en ausencia de PINK1 o de Parkin esta fisión debe ser regulada por otra proteína.

#### **5.5.4 El silenciamiento de PINK1 o Parkin aumenta la desfosforilación de DRP1 (S637)**

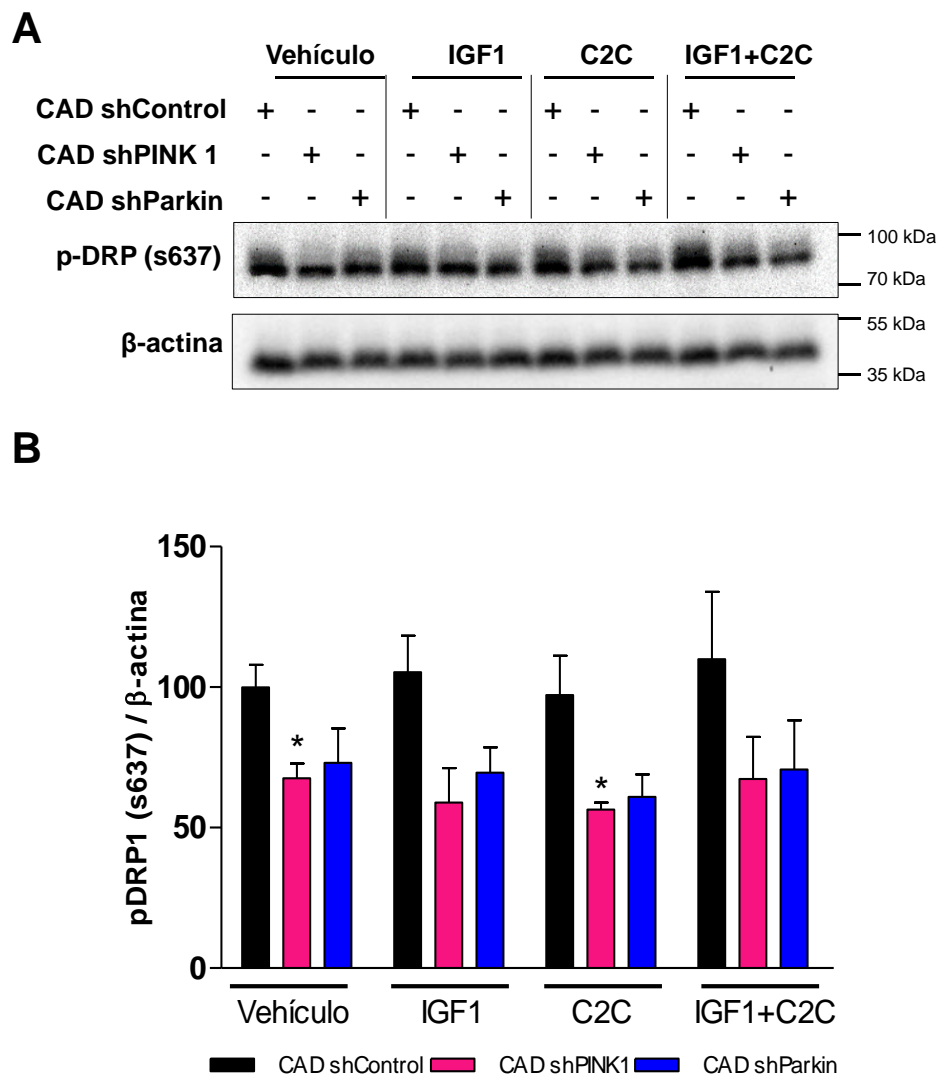
Teniendo en cuenta que la fisión mitocondrial observada en las células silenciadas tanto para PINK1 como Parkin, fue independiente del receptor de MEM, FIS1 y conociendo que la fosforilación o desfosforilación de DRP1 en el residuo S637 es una de las principales modificaciones postraduccionales que regulan la fisión mitocondrial; se decidió estudiar los niveles de esta fosforilación en todos los grupos celulares.

Los resultados del *western blot* mostraron que el silenciamiento de los genes PINK1 ( $p < 0,001$ ) y Parkin ( $p < 0,01$ ) inducen una disminución significativa en la fosforilación de DRP1 independientemente del tratamiento (véase anexo H). Cabe destacar que los tratamientos con C2C y/o IGF1 no afectaron el estado de fosforilación en ningún tipo celular ( $p = 0,745$ ) (véase figura 5.7 A y B). En este sentido se piensa que la fisión mitocondrial observada en las células CAD shPINK1 y CAD shParkin es producto de la desfosforilación de DRP1 y que el tratamiento con C2C no parece afectar los niveles de pDRP1 (S637).

#### **5.5.5 El silenciamiento de PINK1 aumenta el clivaje de OPA1<sub>L</sub>**

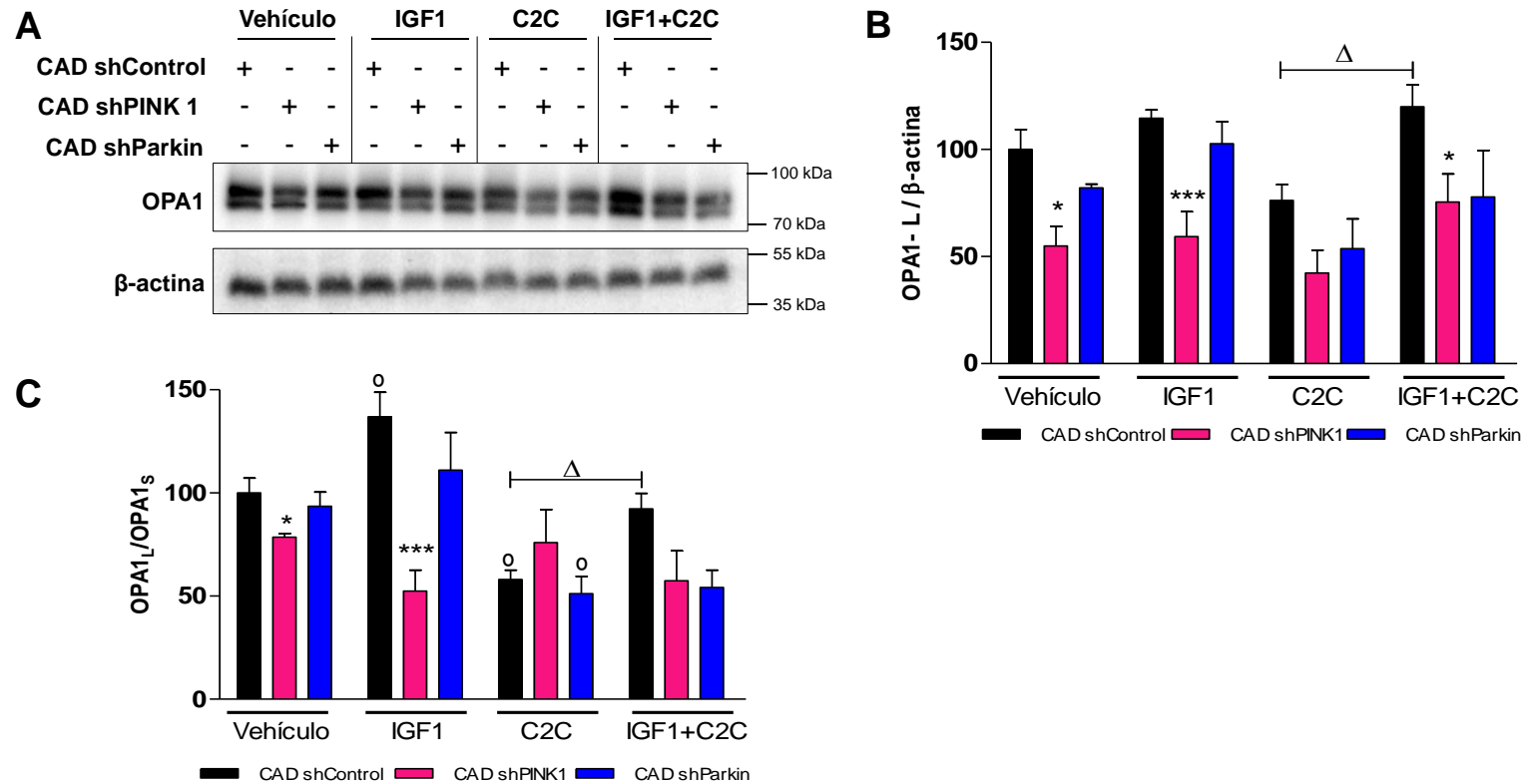
Teniendo en cuenta que la morfología fisionada de las mitocondrias puede ser producto no sólo de un incremento en la fisión propiamente dicha sino también de una disminución en la fusión mitocondrial, se determinó la expresión de la proteína de fusión de MIM, OPA1. El análisis de los resultados del *western blot* demostró que el silenciamiento de PINK1 disminuyó significativamente la isoforma OPA1<sub>L</sub>,  $p < 0,05$  (véase figura 5.8 A y B), además de incrementar el clivaje de la misma (véase figura 5.8 C). No obstante el silenciamiento de Parkin no parece influir en los niveles de OPA1<sub>L</sub> ni en su procesamiento proteolítico.

Así mismo, es importante resaltar que el tratamiento con C2C indujo una disminución de OPA1<sub>L</sub> debido a un aumento significativo en su procesamiento,  $p < 0,05$  (véase figura 5.8 C), mientras que el tratamiento con IGF1 previno el clivaje de OPA1<sub>L</sub> a tal punto que fue capaz de proteger contra el efecto de la C2C ( $p < 0,05$ ) (véase figura 5.8 B y C).



**Figura 5.7 El silenciamiento de PINK1 o Parkin aumenta la desfosforilación de DRP1 (S637)**

**(A)** *Western blot* representativo de pDRP1 (S637) y  $\beta$ -actina de células CAD shControl, CAD shPINK1 y CAD shParkin, luego de 6 h de tratamiento con vehículo (DMSO 0,1 %v/v), IGF1 (100 ng/ml), C2C (25  $\mu$ M) o pre-tratamiento con IGF1 (100 ng/ml) durante 30 min, seguido de 6 h de tratamiento con C2C (25  $\mu$ M). **(B)** Densitometría de pDRP1 (S637)/ $\beta$ -actina. ANOVA de dos vías (tipo de célula:  $p=0,0003$ ; tratamiento:  $p=0,7465$ ; interacción  $p=0,9982$ ). Todos los datos fueron normalizados respecto a las células CAD shControl tratadas con vehículo y representan medias  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes. Para comparaciones múltiples se aplicó la prueba de contrastes *T* de Bonferroni. (\*) Indica diferencias significativas respecto a las células CAD shControl de cada grupo de tratamiento (\* $p < 0.05$ ).



**Figura 5.8 El silenciamiento de PINK1 aumenta el clivaje de OPA1L**

**(A)** Western blot representativo de OPA1 y  $\beta$ -actina de células CAD shControl, CAD shPINK1 y CAD shParkin, luego de 6 h de tratamiento con vehículo (DMSO 0,1 %v/v), IGF1 (100 ng/ml), C2C (25  $\mu$ M) o pre-tratamiento con IGF1 (100 ng/ml) durante 30 min, seguido de 6 h de tratamiento con C2C (25  $\mu$ M). **(B)** Densitometría de OPA1<sub>L</sub>/ $\beta$ -actina. ANOVA de dos vías (tipo de célula:  $p < 0,0001$ ; tratamiento:  $p = 0,0031$ ; interacción  $p = 0,6188$ ). **(C)** Densitometría de OPA1<sub>L</sub>/OPA1<sub>s</sub>. ANOVA de dos vías (tipo de célula:  $p = 0,0004$ ; tratamiento:  $p = 0,0016$ ; interacción  $p = 0,0024$ ). Todos los datos fueron normalizados respecto a las células CAD shControl tratadas con vehículo y representan medias  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes. Para comparaciones múltiples se aplicó la prueba de contrastes *T* de Bonferroni. (\*) Indica diferencias significativas respecto a las células CAD shControl de cada grupo de tratamiento y (°) indica diferencias significativas respecto a las células tratadas con el vehículo (\*<sup>o</sup>  $p < 0.05$ ; \*\*<sup>oo</sup>  $p < 0.01$ ; \*\*\*<sup>ooo</sup>  $p < 0.001$ ).

### **5.5.6 El silenciamiento de PINK1 disminuye la expresión de MNF1**

Adicional al efecto del silenciamiento de PINK1 sobre la proteína de fusión OPA1, las células CAD shPINK1 mostraron una disminución significativa en los niveles de expresión de MNF1 independientemente de los tratamientos (véase figura 5.9 A y B y anexo I). Esta disminución no se presentó en las células silenciadas para Parkin ni tampoco en las CAD shControl tratadas con C2C. Todo lo anterior indica que los procesos moleculares que determinan la fisión mitocondrial observada en las células silenciadas para PINK1 o Parkin, así como la inducida por el tratamiento con C2C son diferentes.

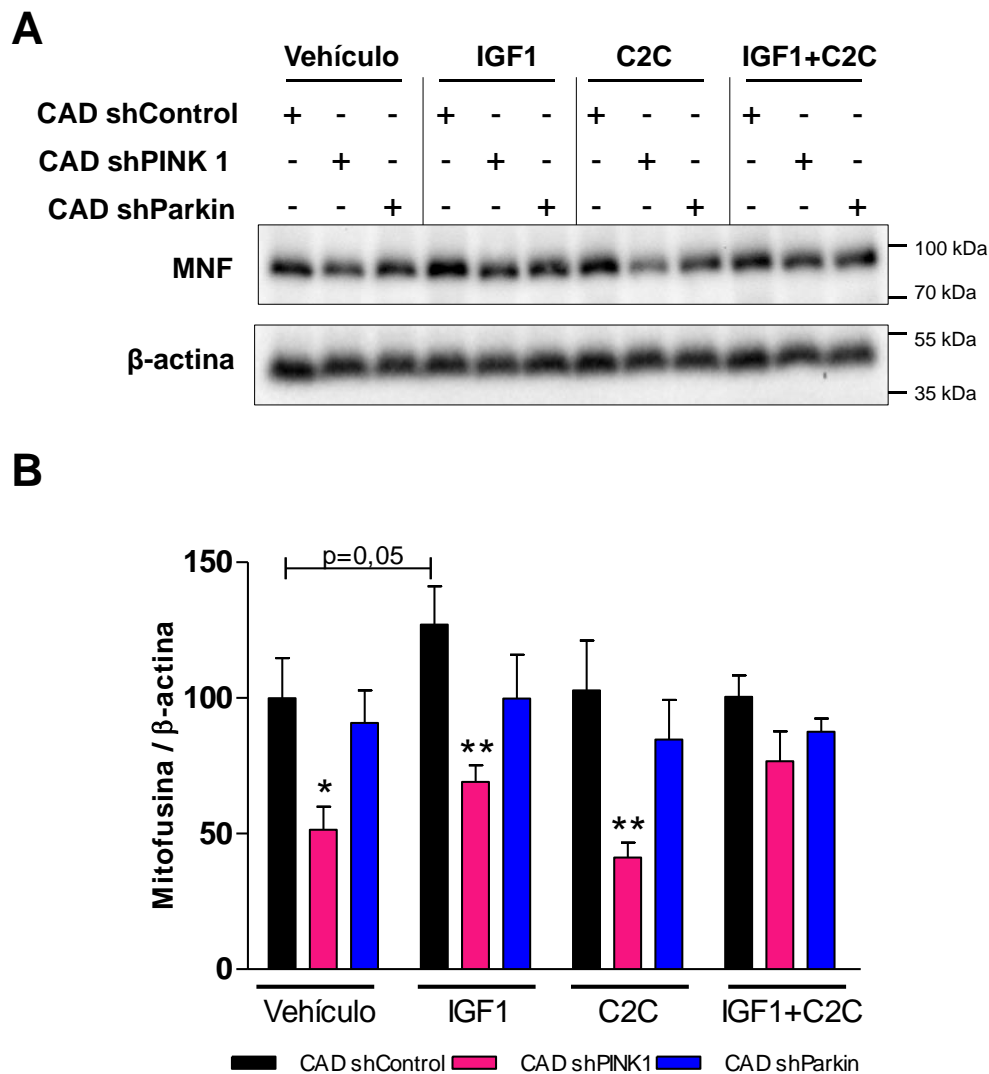
### **5.5.7 El silenciamiento de PINK1 disminuye el potencial de membrana mitocondrial**

Puesto que muchas de las modificaciones postraduccionales de las proteínas de dinámica mitocondrial dependen del estado del  $\Delta\Psi_m$ , se decidió evaluar el cambio relativo de éste en todos los grupos celulares y en presencia del inductor de muerte neuronal C2C, así como también el efecto que tiene la activación de AKT por IGF1 y su posible efecto protector en el mantenimiento de la integridad mitocondrial (véase figura 5.10).

En este orden de ideas, se encontró que las células CAD shPINK1 tienen cocientes rojo/verde inferiores que las células CAD shControl, lo cual fue un indicativo de que el silenciamiento de PINK1 en las células CAD disminuye el  $\Delta\Psi_m$ . Estos resultados fueron comprobados mediante un ensayo adicional con JC-1 pero por medición con citometría de flujo (véase anexo J). De igual manera el tratamiento con C2C indujo una despolarización mitocondrial que fue evitada solamente en las células CAD shControl previo tratamiento con IGF1  $p < 0,001$ .

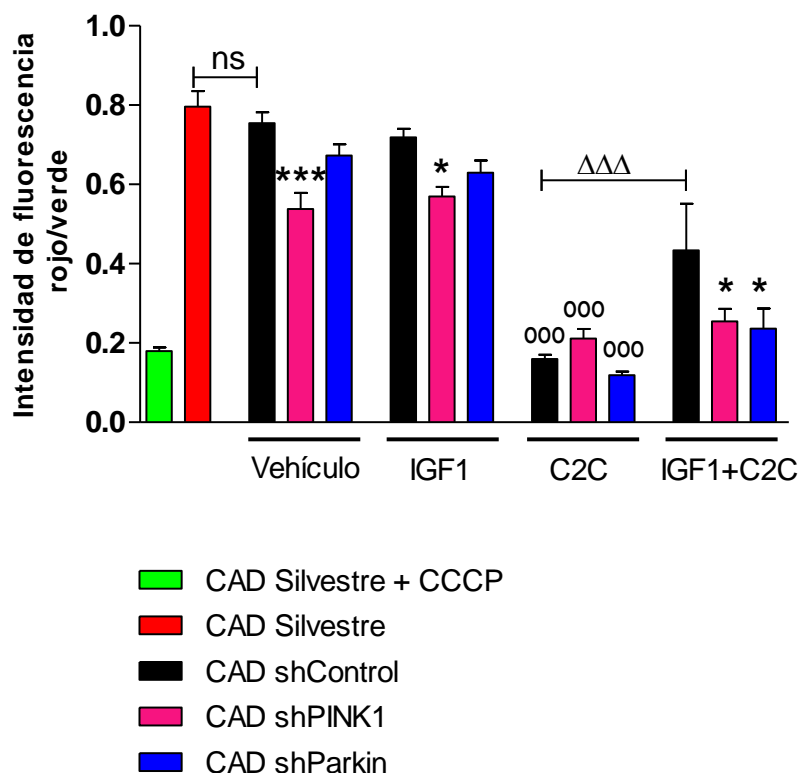
## **5.6 Discusión**

Alteraciones en la homeostasis mitocondrial se han asociado a muerte neuronal en varios desórdenes neurodegenerativos incluyendo la EP [440]. La función de PINK1 como reguladora de la morfología mitocondrial ha sido ampliamente debatida dependiendo del modelo de estudio, incluso en células de mamíferos los resultados son contradictorios. Es así que en neuronas hipocámpales de rata con sobre-expresión de formas mutantes de PINK1 humano (donde se compromete su actividad tirosina quinasa), se caracterizan por presentar mitocondrias fusionadas [441], mientras que en líneas celulares humanas derivadas de neuroblastoma como SHSY5Y y M17, el silenciamiento de PINK1 induce un fenotipo mitocondrial fraccionado [442, 136].



**Figura 5.9 El silenciamiento de PINK1 disminuye la expresión de MNF**

**(A)** *Western blot* representativo de Mitofusina1 y  $\beta$ -actina de células CAD shControl, CAD shPINK1 y CAD shParkin, luego de 6 h de tratamiento con vehículo (DMSO 0,1 %v/v), IGF1 (100 ng/ml), C2C (25  $\mu$ M) o pre-tratamiento con IGF1 (100 ng/ml) durante 30 min, seguido de 6 h de tratamiento con C2C (25  $\mu$ M). **(B)** Densitometría de MNF1/ $\beta$ -actina. ANOVA de dos vías (tipo de célula:  $p < 0.0001$ ; tratamiento:  $p = 0,1397$ ; interacción  $p = 0,6844$ ). Todos los datos fueron normalizados respecto a las células CAD shControl tratadas con vehículo y representan medias  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes. Para comparaciones múltiples se aplicó la prueba de contrastes *T* de Bonferroni. (\*) Indica diferencias significativas respecto a las células CAD shControl de cada grupo de tratamiento (\* $p < 0.05$ ).



**Figura 5.10 El silenciamiento de PINK1 disminuye el potencial de membrana mitocondrial**

La gráfica representa la relación entre la intensidad de fluorescencia roja/verde de la sonda JC-1 de células CAD shControl, CAD shPINK1 y CAD shParkin luego de 6 h de tratamiento con vehículo (DMSO 0,1 %v/v), IGF1 (100 ng/ml), C2C (25  $\mu$ M) o pre-tratamiento con IGF1 (100 ng/ml) durante 30 min, seguido de 6 h de tratamiento con C2C (25  $\mu$ M). CAD silvestres tratada con CCCP (control de despolarización). ANOVA de dos vías (tipo de célula:  $p < 0,0001$ ; tratamiento:  $p < 0,0001$ , interacción  $p = 0,0004$ ). Los datos son medias  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes. Para comparaciones múltiples se aplicó la prueba de contrastes *T* de Bonferroni. (\*) Indica diferencias significativas respecto a las células CAD shControl de cada grupo de tratamiento y (°) indica diferencias significativas respecto a las células tratadas con el vehículo (\*<sup>o</sup>  $p < 0,05$ ; \*\*<sup>o</sup>  $p < 0,01$ ; \*\*\*<sup>o</sup>  $p < 0,001$ ).

Exner *et al.* mostraron que el silenciamiento de PINK1 en células HeLa, causó fraccionamiento mitocondrial asociado a una disminución en el número y tamaño de las crestas mitocondriales, junto a una caída del  $\Delta\Psi_m$ ; además este fenotipo fue comparado con el observado en cultivos de fibroblastos de pacientes con EP, portadores de las mutaciones PINK1<sup>Q126P</sup> o PINK1<sup>G309D</sup> donde la severidad clínica del desorden se relacionó con mayor fisión mitocondrial [134]. Aun cuando ellos no evaluaron los niveles de OPA1 y su clivaje, se conoce que OPA1<sub>L</sub> es la responsable de mantener la estructura de las crestas mitocondriales [400].

En nuestro modelo, las células CAD silenciadas para PINK1 mostraron un fenotipo mitocondrial fragmentado que se asoció a la desfosforilación de DRP1 y al aumento del clivaje de OPA1, lo anterior se considera resultado de la pérdida del  $\Delta\Psi_m$ , y coincide con publicaciones anteriores donde se resalta el hecho de que la despolarización de la membrana mitocondrial es la causa y no la consecuencia de la fisión mitocondrial dependiente de DRP1 [136].

Adicionalmente las CAD shPINK1 tienen menos niveles de MNF1, algo que no esperábamos, teniendo en cuenta que la ubiquitinación y consecuente degradación de esta proteína, depende de PINK1 y Parkin [389-391]. Esto hace pensar que PINK1 podría regular de forma positiva la expresión o la estabilidad de las MNFs en la MEM; también podría indicar que existe una degradación de MNF independiente de PINK1 y Parkin.

Con relación a esto último se conoce que MNF1 es sustrato de MARCH-V [418] que favorece su degradación vía sistema ubiquitin proteosoma (UPS) e induce apoptosis [443]. Además se sabe que la fisión mitocondrial inducida por el tratamiento con rotenona, el incremento de la presión, o la inducción de hipoxia/reperfusión, depende en gran medida de la actividad de MARCH-V [419]. Por otro lado la degradación de MNF2 en presencia de genotóxicos parece ser mediada por HUWE1, otra E3 ubiquitin ligasa [387].

La fisión mitocondrial inducida por el tratamiento con C2C fue independiente de la vía PINK1/Parkin; adicionalmente el hecho de que este tratamiento no disminuyera los niveles de MNF en las CAD shControl, indica que el evento principal que regula la fisión mitocondrial es el clivaje proteolítico de OPA1.

Si bien es cierto que la función de PINK1 ha sido principalmente asociada a su relación directa con la mitocondria, a la fecha, se conoce que participa positivamente en la regulación de la vía de supervivencia PI3K/AKT [123]. En este sentido, nosotros y otros grupos de investigación hemos observado que la sobre-expresión de la forma silvestre de PINK1, ejerce un efecto neuroprotector frente a toxinas como MPTP, 6-OHDA, rotenona y C2C [338, 137, 135], las cuales regulan de forma negativa la actividad de AKT [444, 340, 341, 182, 342, 343].

Además, nuestras observaciones están soportadas por estudios que muestran que mutaciones en el dominio quinasa de PINK1, comprometen la activación de AKT dependiente de IGF1 [338], lo cual se relaciona con la disminución de la activación del IGF1R [328]. Por otra parte en las células CAD shControl, el tratamiento con IGF1 incrementó moderadamente los niveles de MNF ( $p=0,05$ ), lo cual podría explicar la disminución de MNF en las células silenciadas para PINK1 donde la vía PI3K/AKT está disminuida. Lo anterior está respaldado por estudios que demostraron que ratas obesas y humanos obesos, con resistencia a la insulina, tienen una menor expresión del gen MNF2



y un fenotipo de células musculares con mitocondrias fisionadas [445], y que pacientes con diabetes tipo 2 tienen regulado a la baja la expresión de PINK1 [446]. Sin embargo el mecanismo exacto por el cual la activación de AKT mediada por PINK1 podría regular positivamente MNF no se conoce.

En conclusión, en el modelo de células CAD los niveles de MNF son regulados por un mecanismo diferente al de PINK1/Parkin, y en general la fragmentación mitocondrial inducida por C2C es independiente de la actividad de PINK1/Parkin.

Con respecto a la contribución de Parkin en la morfología mitocondrial, también existen discrepancias; en fibroblastos de pacientes con EP y mutaciones en *PARK2* se han reportado mitocondrias con mayor grado de ramificaciones [447] o solo cambios leves en el hinchamiento de éstas [448]. Recientemente se publicó que fibroblastos de pacientes con mutaciones en *PARK2* tienen menores niveles de  $\Delta\Psi_m$  y ausencia de fraccionamiento mitocondrial [449].

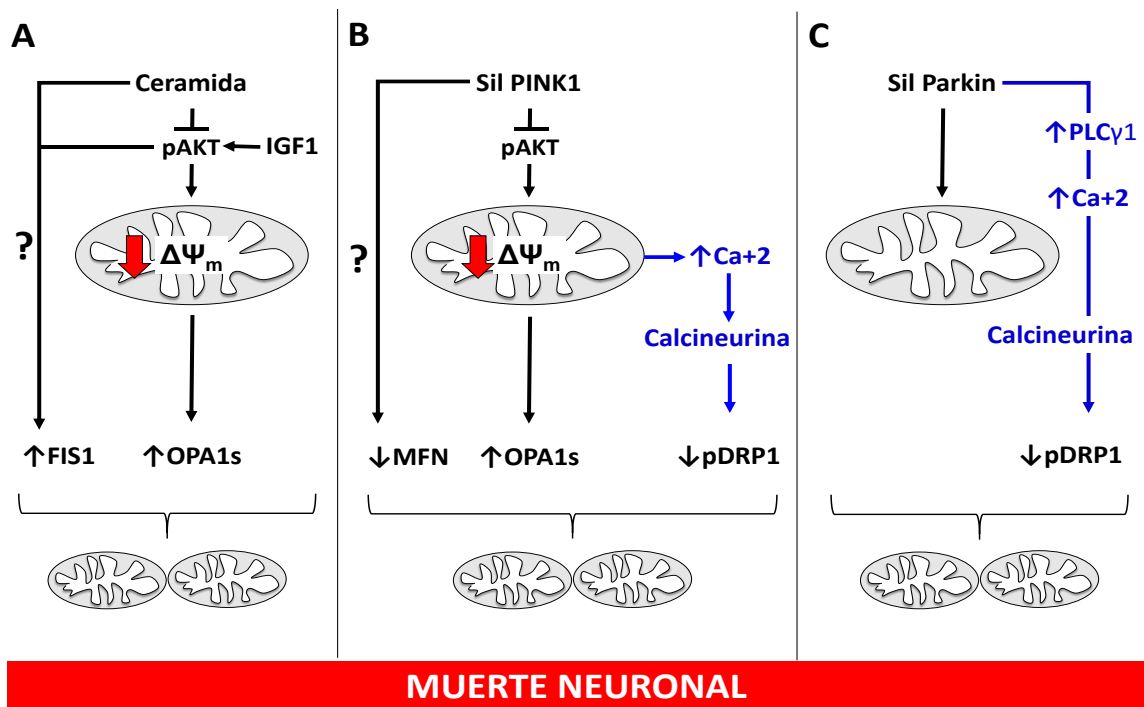
En nuestro modelo de estudio las células CAD shParkin, mostraron un mayor porcentaje de células con mitocondrias fraccionadas, asociado con un aumento en la desfosforilación de DRP1, y sin alteraciones en el  $\Delta\Psi_m$ . Por esto es posible que Parkin esté regulando la desfosforilación de DRP1 indirectamente, al regular los niveles de calcio citoplasmático, o directamente afectando los niveles de DRP1 (véase figura 5.11 C).

En este sentido se conoce que tanto DRP1 como PLC $\gamma$ 1 (del inglés, *phospholipase C gamma 1*) son ubiquitinadas por Parkin, por lo cual la disminución de la expresión de Parkin aumenta los niveles de PLC $\gamma$ 1 activo que conduce a una mayor hidrólisis de PIP2 y un consecuente incremento en la concentración intracelular de calcio [450] y adicionalmente aumenta los niveles de DRP1 [451]. Además, Parkin está involucrado en la estabilidad de las MAMs contribuyendo a la función amortiguadora de calcio de las mitocondrias [452]. Esto quiere decir que en ausencia de Parkin o alteración en su función, el incremento de calcio citoplasmático podría estar favoreciendo la activación de calcineurina, la desfosforilación de DRP1 y finalmente la fisión mitocondrial.

El equilibrio en los procesos de dinámica mitocondrial es clave para las funciones celulares en general, en las neuronas el establecimiento de redes mitocondriales es importante, ya que actúan como un conjunto eléctrico que facilita la transmisión de potenciales de membrana desde áreas ricas en oxígeno hasta otras con poca disponibilidad del mismo [453]; además esta relación no solo es importante desde el punto de vista metabólico sino también indispensable para la respuesta correcta a señales de calcio [454] y estrés celular [455]. Es por esto que la inclinación de la balanza hacia el proceso de fisión observado en las células silenciadas para PINK1 y Parkin, independientemente de los mecanismos moleculares que los gobiernan, contribuyen a la susceptibilidad y/o inducción de muerte neuronal.

## 5.7 Conclusiones

- El silenciamiento de PINK1 induce fisión mitocondrial por un mecanismo asociado a la pérdida del  $\Delta\Psi_m$ , la desfosforilación de DRP1 (S637), el clivaje de OPA1<sub>L</sub> y la disminución en la expresión de MNF1.
- El silenciamiento de Parkin induce fisión mitocondrial asociada a una desfosforilación de DRP1 (S637) e independiente de la pérdida del  $\Delta\Psi_m$ .
- La fisión mitocondrial inducida por C2C se asocia a un incremento en FIS1 y a mayor clivaje de OPA1<sub>L</sub> junto a una pérdida del  $\Delta\Psi_m$ .



**Figura 5.11 Modelo**

Los procesos moleculares que determinan la fisión mitocondrial observada en las células tratadas con el neurotóxico C2C, así como en células silenciadas para PINK1 o Parkin, son diferentes. **(A)** El tratamiento con C2C, disminuye la activación de AKT, lo cual induce una pérdida del  $\Delta\Psi_m$  que favorece el clivaje de OPA1<sub>L</sub>, aumentando la isoforma OPA1<sub>S</sub>. Adicionalmente favorece el aumento de FIS1, por un mecanismo molecular aún desconocido. **(B)** El silenciamiento de PINK1 disminuye la activación de AKT lo cual por un lado induce pérdida del  $\Delta\Psi_m$  que favorece el clivaje de OPA1<sub>L</sub>, aumentando la isoforma OPA1<sub>S</sub>, además de incrementar la salida de Calcio desde la mitocondria que conlleva a activación de calcineurina y a la desfosforilación de DRP1; por otro lado, por un mecanismo aun no conocido, la disminución en la activación de AKT se asocia a disminución de la proteína de fusión MNF. **(C)** El silenciamiento de Parkin se asocia a un incremento de PLC $\gamma$ 1 y así un aumento de los niveles de Calcio citosólico que podría estar activando calcineurina y desfosforilando DRP1. Todos estos mecanismos llevan a fisión mitocondrial y finalmente muerte neuronal. Las líneas azules representan evidencia experimental previamente reportada.

# 6. Capítulo 6: Autofagia

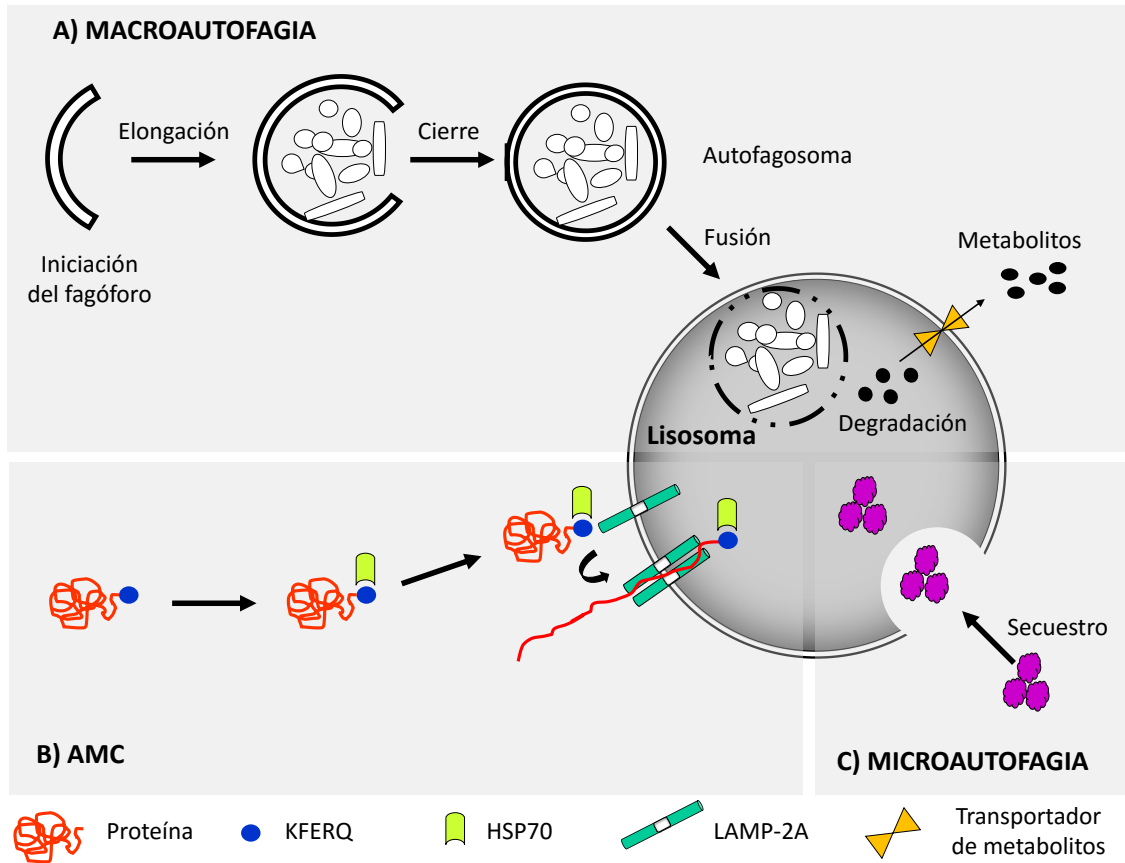
## 6.1 Introducción

La autofagia (AFG) es un proceso homeostático, evolutivamente conservado que comprende mecanismos de degradación de material intracelular vía hidrolasas lisosomales, donde las macromoléculas resultantes son recicladas; esto lo hace indispensable para el mantenimiento del equilibrio celular (revisado en [456] y referencias allí citadas).

Se han descrito tres vías por las cuales un componente es destinado a degradación lisosomal por AFG: (1) la macroautofagia, (2) la microautofagia y (3) la autofagia mediada por chaperonas (AMC). En la macroautofagia una porción citoplasmática se encapsula en una vesícula de doble membrana denominada autofagosoma, para su posterior fusión con el lisosoma; mientras que en la microautofagia, la membrana lisosomal envuelve directamente la porción citoplasmática por protrusión, invaginación o septación; y en la AMC las proteínas por medio de un péptido señal específico (KFERQ), son transportadas directamente desde el citoplasma hacia el lumen lisosomal, para su degradación mediante el complejo Hsc70 (revisado en [457]) (véase figura 6.1).

El proceso de AFG es mediado por estrés oxidativo (EO), privación de nutrientes (DN), daño celular e invasión de patógenos. Está implicado en funciones biológicas como desarrollo, diferenciación celular e inmunidad [458]. Asociada principalmente con el control de calidad celular y supervivencia, aunque también se ha visto relacionada con un tipo de muerte celular programada independiente de caspasas (véase apartado 6.2).

La mayoría de la información molecular de la AFG deriva de múltiples estudios realizados en levaduras, donde se han identificado más de 31 genes relacionados con autofagia (ATG del inglés *autophagy-related genes*) [459, 460]. Sin embargo, la red de proteínas que interactúan para regular AFG es compleja. Esta complejidad del sistema de AFG ha sido demostrada por diferentes métodos de expresión de proteínas, inmunoprecipitación y espectrometría de masas, que han revelado una red de 751 interacciones entre 409 proteínas candidatas [461]. Así mismo, otro estudio que realizó la inducción de AFG por diferentes mecanismos, identificó 728 proteínas asociadas a autofagosomas, de las cuales 94 fueron comunes en todos los estímulos [462].



**Figura 6.1 Tipos de autofagia**

Representación esquemática de los diferentes tipos de AFG. **(A)** Durante la macroautofagia vacuolas especializadas de doble membrana llamadas autofagosomas se originan a partir de estructuras formadas de *novo* (fagóforos) que incorporan y transportan material citoplasmático como proteínas, lípidos y organelos hacia el lisosoma. **(B)** La AMC permite la degradación lisosomal de proteínas que tienen un motivo KFERQ el cual es reconocido por la chaperona HSP70 que se encarga de dirigir el complejo hacia el lumen lisosomal a través del transportador LAMP-2A. **(C)** Durante la microautofagia invaginaciones en la membrana lisosomal permiten encapsular porciones del citoplasma que son posteriormente degradadas. Figura adaptada de [463]).

## 6.2 Autofagia: su papel en supervivencia y muerte celular

La AFG se lleva a cabo a nivel basal de manera selectiva para la renovación de proteínas y otras macromoléculas de larga vida media y para prevenir la acumulación intracelular de componentes tóxicos, como proteínas mal plegadas y organelos dañados [464, 465]. También ocurre de forma no selectiva, para suplir las necesidades energéticas en estados

de privación de nutrientes, para suplir las necesidades energéticas, produciendo sustratos para la oxidación y síntesis de ATP en la mitocondria [466, 467]; todo esto hace de la AFG un proceso protector frente a la apoptosis. Se ha sugerido que la AFG protege contra la muerte celular por necrosis, ya que la inhibición de ésta sensibiliza células cancerígenas a morir (revisado en [468]). En este sentido, se ha reportado que la AFG protege a *C. elegans* de la necrosis post infección con *Pseudomonas aeruginosa* [469].

Se ha descrito que la AFG puede hacer parte del programa apoptótico, bien sea corriente arriba de la cascada apoptótica o corriente abajo en la fase final, donde favorece la eliminación de cuerpos apoptóticos, como ocurre durante el desarrollo embrionario donde ejecuta el aclaramiento de células apoptóticas [470]. En casos específicos se ha observado que tanto la apoptosis como la AFG se requieren paralelamente para contribuir a la muerte celular; también se ha descrito que la AFG puede desencadenar un tipo de muerte celular independiente de la activación de caspasas, que se denomina muerte celular tipo II o autofágica, la cual se caracteriza por un incremento en Beclin-1 (del inglés, *Becn1*; *coiled-coil*, *myosin-like BCL2-interacting protein*) y Atg 5 donde no se desencadena una masiva auto-digestión [471, 472].

Por otro lado, se conoce la participación de la AFG en longevidad promovida por restricción calórica [473], y participa en inmunidad adaptativa e innata al proteger las células contra patógenos intracelulares y contribuir a la presentación de antígenos en el contexto del complejo mayor de histocompatibilidad clase II [474, 475].

### 6.3 Macroautofagia

La macroautofagia (en este texto denominada autofagia), involucra la formación de vesículas citoplasmáticas de doble membrana, llamadas autofagosomas, que de manera específica o inespecífica secuestran porciones del citoplasma y las conducen hacia los lisosomas para su degradación. Los pasos generales de la macroautofagia incluyen: (1) La iniciación, (2) la nucleación del fagóforo, (3) la selección de la carga, secuestro y elongación del fagóforo, (4) el encapsulamiento y formación del autofagosoma, (5) la fusión del autofagosoma con el lisosoma y finalmente (6) la degradación de la carga en el lumen lisosomal (revisado en [476]). La regulación de todas estas etapas es muy compleja y aún no es completamente conocida; además, son muchas las proteínas que intervienen y al ser un proceso continuo no es fácil diferenciar los límites entre cada una de las etapas.

Luego de la inducción de la AFG, el primer cambio estructural que ocurre es la formación de fagóforos que se presentan como membranas aisladas en forma de cisterna o copa, las cuales son precursoras de autofagosomas, los fagóforos se forman *de novo* mediante la nucleación de membranas pre-existentes. En levaduras, los sitios de ensamblaje de los fagóforos se han denominado PAS (del inglés, *pre autophagosomal structure*) [477], y en

mamíferos “omegasomas”, los cuales se caracterizan por encontrarse en estructuras membranosas perivacuolares enriquecidas con fosfatidil inositol 3 fosfato (PI(3)P) [456, 478, 479]

En mamíferos, bajo condiciones de DN los omegasomas se encuentran en el RE [478, 456] y existe evidencia experimental de que son enriquecidos por membranas provenientes de mitocondrias [480], MAMs [481], membrana plasmática [482] aparato de Golgi [483], compartimentos intermedios RE-Golgi (ERGIC) [484] sitios específicos del RE llamados ERES (del inglés, *endoplasmatic reticulum exit sites*) [485, 486], y endosomas [487]; es decir, los lípidos fundamentales para su formación, derivan de un flujo directo de membranas o tráfico vesicular desde organelos pre-existentes (revisado en [488-490]).

Existen varios complejos proteicos que regulan la formación del fagóforo y están conformados por varias proteínas (véase tabla 6.1): (1) el complejo ULK (del inglés, *unc-51-like kinase 1*), con actividad serina/treonina quinasa, llamado Atg1 en levaduras, (2) el complejo PI3KC3 (del inglés, *class III PtdIns3-kinase*) o en levaduras conocido como complejo Vps34, (3) el complejo Atg12-Atg5-Atg16 y (4) el sistema de conjugación de proteínas LC3 o también llamado Atg8 en levaduras. Adicionalmente se incluyó el complejo que regula la fusión entre el autofagosoma con el lisosoma.

**Tabla 6.1 Proteínas involucradas en la biogénesis de autofagosomas y su fusión con lisosomas**

COMPLEJOS PROTÉICOS DE FORMACIÓN DE AUTOFAGOSOMAS Y FUSIÓN CON LISOSOMAS			
Complejo	Componentes en humanos	Componentes en levaduras	Función
ULK/Atg1	ULK1 Atg101 Atg13 FIP200	Atg1 Atg13 Atg17 Atg29 Atg31	Reclutamiento y activación del complejo PI3KC3
PI3KC3/Vps34	PI3KC3 Beclin1 Atg14L/Barkor PIK3KR4/p150 UVRAG	Vps34 Atg6 Atg14 Vps15 Atg38	Síntesis de PI(3)P
Atg12-Atg5-Atg16	Atg12 Atg5 Atg16L	Atg12 Atg5 Atg16L	Lipidación de LC3
LC3/Atg8	Subfamilia LC3 (-A, -B, -B2 y -C) Subfamilia GABARAP (-L1, -L2 o GATE16)	Atg8	Elongación del fagóforo y maduración del autofagosoma
SNARE	Stx17(Qa) SNAP-29 (Qb,Qc) VAMP8 (R-SNARE)	Vam3 (Qa) Vti1 (Qb) Vam7 (Qc)	Fusión autofagosoma-anfísoma con el lisosoma

### 6.3.1 Mecanismo molecular de la macroautofagia

Recientemente fue publicado un modelo propuesto para la formación del fagóforo en mamíferos, luego de la inducción de autofagia por DN [490], a este modelo se le incluyó la bibliografía y los datos adicionales que se consideraron pertinentes.

#### ▪ Iniciación y nucleación de fagóforo

Inicialmente participa el complejo ULK (formado en humanos por 4 proteínas, (véase tabla 6.1) que es reclutado a sitios en la membrana del RE que contienen la proteína transmembranal VMP1 (del inglés, *multi-membrane spanning protein vacuole membrane protein 1*) [491], que parece actuar como una plataforma donde se inicia la nucleación del fagóforo. El dominio EAT (del inglés, *early autophagy targeting/tethering*) ubicado en el extremo C-t de ULK1 junto con el extremo N-t de Atg13 (que agrupa aminoácidos cargados positivamente) parecen ser los encargados de la traslocación de estas proteínas al sitio de inicio [492-494].

Luego, Atg13 a través de su dominio HORMA (ubicado en el extremo N-t) recluta la unidad Atg14 del complejo PI3KC3 [495]. Atg14 tiene un motivo de unión a RE en su extremo N-t que es importante para unirse al omegasoma y así poder asociar las demás unidades del complejo PI3KC3 (véase tabla 6.1) [496] como la propia PI3KC3, la cual se localiza en endosomas tardíos o lisosomas muy próximos al RE. Es posible que en este punto, ULK1 fosforile a Beclin-1 lo cual conduce a la activación de PI3KC3 [497]. Existe evidencia experimental de que modificaciones en el extremo N-t de Beclin-1 son importantes para regular la actividad catalítica de PI3KC3 (revisado en [498]); de esta manera puede ejercer su acción en forma *trans* e incrementar la concentración de PI(3)P para la formación de los omegasomas [478]. Adicionalmente se ha reportado una interacción entre VMP1 y Beclin-1, que al parecer estabiliza la asociación del complejo PI3KC3 con la membrana del RE [499].

La síntesis y acumulación de PI(3)P lleva a una modificación estructural de la membrana que adquiere una curvatura en forma de cono invertido que favorece el anclaje de proteínas Atg; además constituye una señal para reclutar proteínas efectoras con dominios de interacción a fosfoinositósidos, dominios FYVE, PX y repeticiones WD, como DFCP1 (del inglés, *doublé FYVE domain-containing protein 1*) y WIPI1/2 (del inglés, *WD repeat domain phosphoinositide interacting proteins*) o Atg18 en levaduras, las cuales actúan como complejos de andamiaje para las Atg requeridas en las etapas posteriores, de elongación y cierre de la membrana [478, 500].

### ▪ **Elongación del fagóforo**

En la elongación del fagóforo el complejo Atg12–Atg5–Atg16L1 va al omegasoma localizándose predominantemente en la superficie externa de las membranas aisladas para luego disociarse inmediatamente se completa el autofagosoma [501]. Atg12 se une covalentemente a Atg5 mediante una reacción catalizada por Atg7/Atg10 [502-504], posteriormente Atg5 se une de forma no-covalente a Atg16L formando el complejo (Atg12–Atg5–Atg16L1) por homo-oligomerización de Atg16L [505]. Se ha sugerido que el reclutamiento de dicho complejo en la superficie fagóforo ocurre junto al reclutamiento de ULK1 ya que se sabe que una de las unidades del complejo ULK1 (FIP200) interactúa directamente con Atg16L [506, 507], también se cree que su posición en el omegasoma es estabilizada por la unión WIPI2-Atg16L1 secundaria al incremento en la concentración de PI(3)P [508].

El complejo Atg12–Atg5–Atg16L constituye un sistema de conjugación de tipo ubiquitina que media la lipidación de la proteína LC3 (del inglés, *microtubule associated protein 1 light chain 3*). LC3 desempeña un papel importante en la formación del autofagosoma al estar involucrada en la expansión de la membrana del fagóforo. El mecanismo por el cual ocurre la lipidación de LC3 ha sido descrito de la siguiente manera: LC3 es la proteína precursora, es procesada en su extremo C-t por la proteasa de cisteína Atg4 [509], lo cual resulta en la exposición de un residuo glicina en el extremo C-t, esta forma es llamada LC3-I y se localiza en el citoplasma. LC3-I es activada por Atg7 (que funciona como una enzima E1) y transferida a Atg3 (que actúa como una enzima E2); en este punto actúa el complejo Atg12–Atg5–Atg16 que cataliza la transferencia de LC3-I desde Atg3 hasta fosfatidiletanolamina (PtdEtn) donde se une covalentemente al grupo amino [510]. Esta forma conjugada o lipidada es LC3-II, y se localiza tanto en la membrana interna como externa del autofagosoma [501]. Otros miembros del complejo LC3/Atg8 (la subfamilia GABARAP/GATE-16) parecen estar involucrados en la posterior maduración del fagóforo [511].

### ▪ **Selección de la carga, maduración y cierre del autofagosoma**

La AFG inducida por DN es una vía de degradación no selectiva que degrada los componentes celulares para proporcionar energía y aminoácidos para los procesos anabólicos [512]. Alternativamente, existe un proceso altamente selectivo y fuertemente regulado de degradación específica, que requiere del reconocimiento de la carga por la maquinaria de la AFG. La carga entonces puede ser de diferentes tipos he incluye: agregados proteicos (agrefagia) [513], endosomas (heterofagia) [514], gránulos de secreción (crinofagia) [515], lípidos (lipofagia) [516], mitocondrias (mitofagia) [517], peroxisomas (pexofagia) [518], ribosomas (ribofagia) [519], retículo endoplasmático (reticulofagia) [520, 521] y patógenos (xenofagia) [513, 522]. La selección de la carga a



degradar, está dada por su marcaje específico y posterior asociación a proteínas adaptadoras, también conocidas como receptores de autofagia, que constituyen un puente de unión entre la carga y las proteínas de la familia LC3 ubicadas en los pre-autofagosomas.

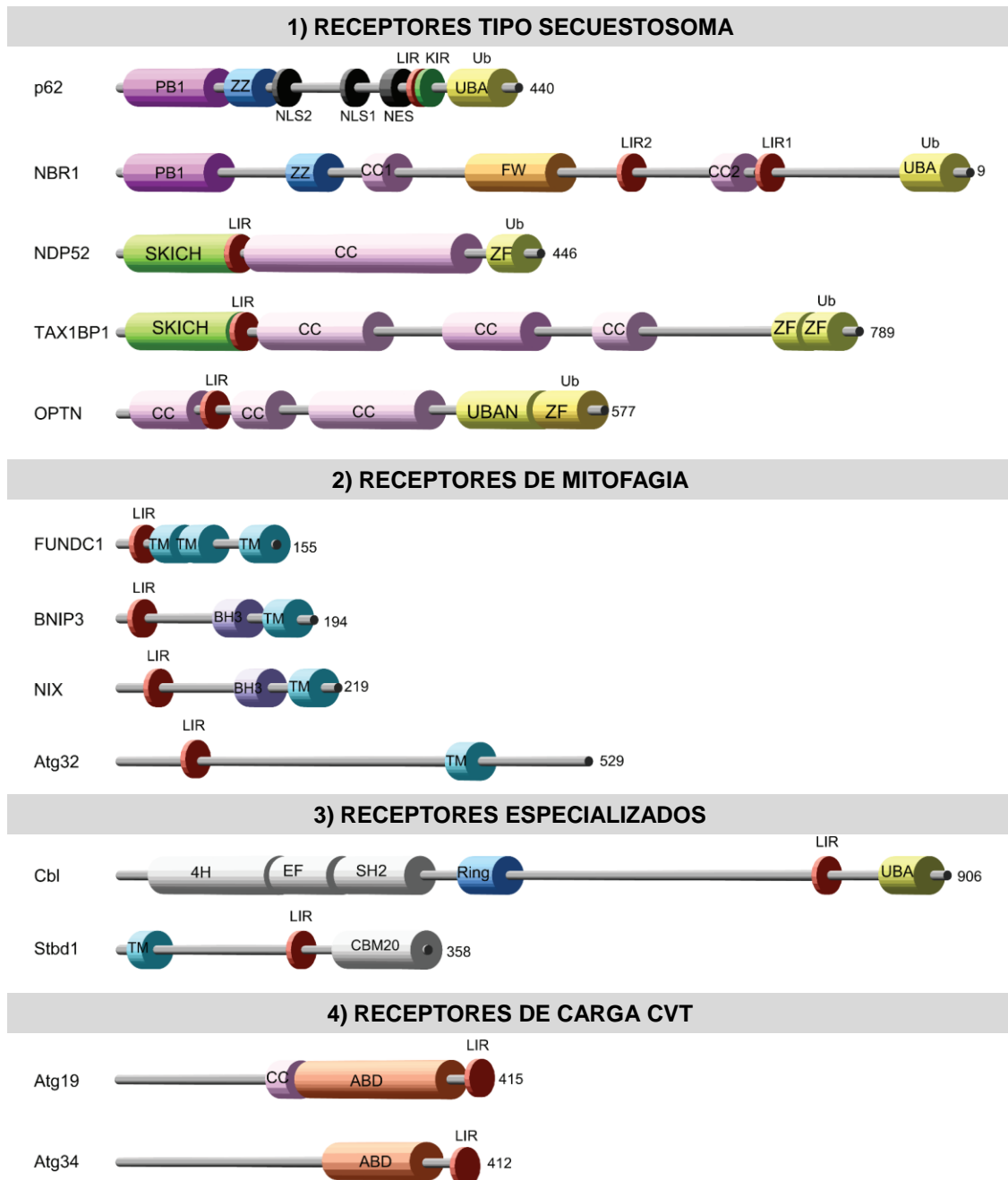
La manera en la que la célula selecciona la carga a degradar vía AFG, es marcándola con etiquetas que comúnmente se denominan señales "eat-me", una de estas señales la constituye el marcaje con ubiquitina (Ub), una pequeña proteína caracterizada inicialmente por marcar proteínas para degradación vía UPS [523]. La unión de la ubiquitina a lo que se va a degradar, requiere la actividad de tres enzimas: E1 para su activación, en un mecanismo dependiente de ATP; E2 o enzima de conjugación que con la participación de una E3 Ub-ligasa, permite la unión específica a proteínas blanco a través de su grupo  $\epsilon$ -amino de un residuo lisina [524]. La galectina-8 (Gal-8) es otra señal "eat-me", esta lectina citosólica se une a la  $\beta$ -galactosidasa localizada en la cara interna de la membrana de vesículas que contienen *Salmonella*, por lo cual, cuando esta vacuola se rompe, queda expuesta la  $\beta$ -galactosidasa y así puede ser reclutada la Gal-8 como señal "eat-me", esto constituye un mecanismo de protección antibacterial [525].

Se han identificado varios receptores de AFG los cuales tienen una región de interacción con LC3 llamada LIR, que permite su unión con proteínas de la familia LC3/ GABARAP ubicadas en el pre-autofagosoma y regiones de unión a ubiquitina o a Gal-8 (véase figura 6.2) (revisado en [526, 523, 527]).

Una vez la carga a degradar es reclutada a la membrana del pre-autofagosoma, éste se expande hasta cerrarse. Este mecanismo depende principalmente de GABARAP/GATE-16 [511].

#### ▪ **Fusión con el lisosoma**

Algunos autofagosomas pueden unirse con endosomas, y formar anisomas antes de su fusión con el lisosoma. Este evento muestra la convergencia de la vía endocítica y la autofágica. Luego de la fusión del autofagosoma o del anisoma con el lisosoma, se originan vesículas que se denominan autofagolisosomas o autolisosomas [528, 529]. En general, la fusión de membranas específicas es mediada por complejos SNARE (del inglés, *soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor*). En humanos se cree que en el último paso de maduración del autofagosoma, luego de que se liberan los complejos Atg, una proteína Qa-SNARE, Stx17 (del inglés, *syntaxin 17*), se trasloca a la membrana externa del autofagosoma (no se conoce si Stx17 se trasloca desde el citoplasma, RE o mitocondria, ni tampoco el mecanismo molecular que regula este paso). Stx17 puede reclutar desde el citoplasma a la proteína SNAP-29 la cual tiene motivos Qb y Qc SNARE, de esta manera se forma el complejo Qabc-SNARE. Finalmente este complejo interactúa con la R-SNARE VAMP8 ubicada en la membrana del lisosoma [530].



**Figura 6.2 Dominios estructurales de receptores de autofagia selectiva**

**(1)** Receptores tipo secuestrosoma: SLRs (del inglés, *sequestosome-1-like receptors*) en mamíferos este grupo está constituido por p62, NBR1, NDP52, TAX1BP y OPTN. **(2)** Receptores de mitofagia: en mamíferos se conocen FUNDC1, BNIP3, NIX (BNIP3L) y ATG32 en levaduras. **(3)** Receptores especializados: han sido caracterizados en mamíferos, Cbl está involucrado en la AFG selectiva de la quinasa Src y Stbd1 involucrado en la AFG selectiva de glucógeno. **(4)** Receptores de carga CVT: ATG19 y ATG34, esenciales para la vía Cvt en levaduras. PB1 (del inglés, *Phox and Bem1 domain*). ZZ (del inglés, *ZZ-type zink finger domain*). CC (del inglés, *coiled-coil domain*). NLS1 y NLS2 (del inglés, *nuclear localization signals 1 and 2*). NES (del inglés, *nuclear export signal*). LIR (del inglés, *LC3-interacting region*). KIR (del inglés, *Keap interacting region*). UBA (del inglés, *ubiquitin-*

*associated domain*). FW (del inglés, *four tryptophan domain*). SKICH (del inglés, *SKIP carboxyl homology domain*). ZF (del inglés, *Zinc-finger domain*). UBAN (del inglés, *ubiquitin binding in ABIN and NEMO domain*). TM (del inglés, *transmembrane domain*). BH3 (del inglés, *Bcl-2 homology (BH) domain 3*). 4H (del inglés, *four-helix bundle domain*). EF (del inglés, *EF-hand-fold domain*). SH2 (del inglés, *Src-homology 2 domain*). Ring (del inglés, *really-interesting-new-gene-finger domain*). CBM20 (del inglés, *family 20 carbohydrate-binding module domain*). ABD (del inglés, *ams1-binding domain*). El tamaño de los receptores está indicado en número de aminoácidos. La imagen fue tomada y modificada de [527].

Rab7 también desempeña un papel en la maduración final de vacuolas autofágicas participando en la fusión con compartimentos lisosomales y endocíticos [531, 532].

Finalmente sobre los mecanismos implicados en la fusión endosomas-lisosomas, estudios muestran que la apertura del canal lisosomal de sodio sensible a ATP ( $\text{lysoNa}_{\text{ATP}}$ ), compuesto por TPC1 (del inglés, *two pore channel*) induce la despolarización de la membrana lisosomal y favorece su fusión con endosomas; la apertura de esos canales de sodio está determinada por acción del fosfoinositósido  $\text{Pi}(3,5)\text{P}_2$  [533], así como por la liberación de mTORC1 desde la membrana lisosomal, que ocurre cuando los niveles de ATP intracelular disminuyen [534].

Aun cuando no se conoce cómo cambios en el potencial de membrana lisosomal coordinan el evento de fusión mediado por el complejo SNARE, un estudio muestra que la actividad del canal de calcio activado por voltaje (VGCC del inglés *voltage-gated calcium channel*) es necesaria para dicha fusión, sugiriendo que la despolarización de la membrana lisosomal causada por la actividad de los canales de sodio dependientes de voltaje ( $\text{lysoNa}_v$ ) [535], conlleva a la activación de VGCC, para inducir la salida de calcio desde el lisosoma y así favorecer su fusión con vacuolas autofágicas [536]. Sin embargo aún no se conoce cómo la salida de calcio desde el lisosoma, puede inducir la fusión. Recientemente Tian *et al.* proponen estudiar la relación de sinaptotagmina VII (un sensor de calcio presente en los lisosomas) y dicho evento [536]. En todas las anteriores publicaciones queda claro que es necesario continuar investigando el mecanismo exacto que controla la fusión lisosomal, última fase del flujo autofágico.

Luego de la fusión, el contenido del autofagosoma es degradado junto con la membrana interna del mismo, por las hidrolasas contenidas en el lumen lisosomal; después de la digestión, los metabolitos se liberan en el citoplasma celular y se reutilizan en los procesos anabólicos. Las moléculas de LC3-II ubicadas en la cara citoplásmica de los autofagolisosomas pueden delipidarse por Atg4 y se reciclan, mientras que el LC3-II de la superficie interna de los autofagosomas se degrada [537].

### 6.3.2 Mecanismos de regulación de la autofagia

El proceso de AFG puede ser regulado a través de cada uno de los pasos que constituyen su mecanismo molecular; sin embargo, sólo se mencionarán los mecanismos de regulación más conocidos y estudiados de este proceso.

- **Regulación del complejo ULK1**

El complejo ULK1, es indispensable para la AFG que se da en respuesta a DN y su actividad depende de un mecanismo reversible de fosforilación. Bajo DN se han identificado al menos 30 sitios de fosforilación en ULK1, aunque la mayoría de las quinasas responsables y la importancia funcional de cada uno de ellos se desconoce. En el caso contrario, cuando hay disponibilidad de nutrientes, ULK1 sufre un proceso global de desfosforilación (revisado en [538]).

ULK también puede ser inhibido por fosforilación, como fue descrito previamente donde la señalización mediada por factores de crecimiento y presencia de altos niveles de aminoácidos, activa a mTORC1 y éste fosforila a ULK1 en las serinas (S637 y S757) [539, 540]. La fosforilación de ULK en la S757 interrumpe la interacción de ULK1 con AMPK (del inglés, *AMP-activated protein kinase*), el cual regula positivamente la AFG, por lo tanto sin la interacción de AMPK-ULK1 no se da el proceso de AFG [540]. También, estudios realizados en levaduras muestran que estas fosforilaciones (S637 y S757) de ULK conducen al secuestro del complejo ULK1/Atg1 impidiendo su localización en los sitios PAS y la asociación con sus sustratos [541].

AMPK se activa cuando los niveles de ATP disminuyen, bien sea por privación de glucosa o de oxígeno, o por disfunción mitocondrial (revisado en [542, 539]) AMPK activa se asocia a ULK1 para fosforilarla en varios residuos (S317, S467, S555, T575, S637 y S777) (revisado en [543]). Los efectos de estas fosforilaciones no son claros y existen contradicciones al respecto [544, 545]. AMPK también favorece la activación de ULK1 de manera indirecta, al inhibir mTORC1 por fosforilación de raptor [546] en varios sitios (S855, S859, S792) [547].

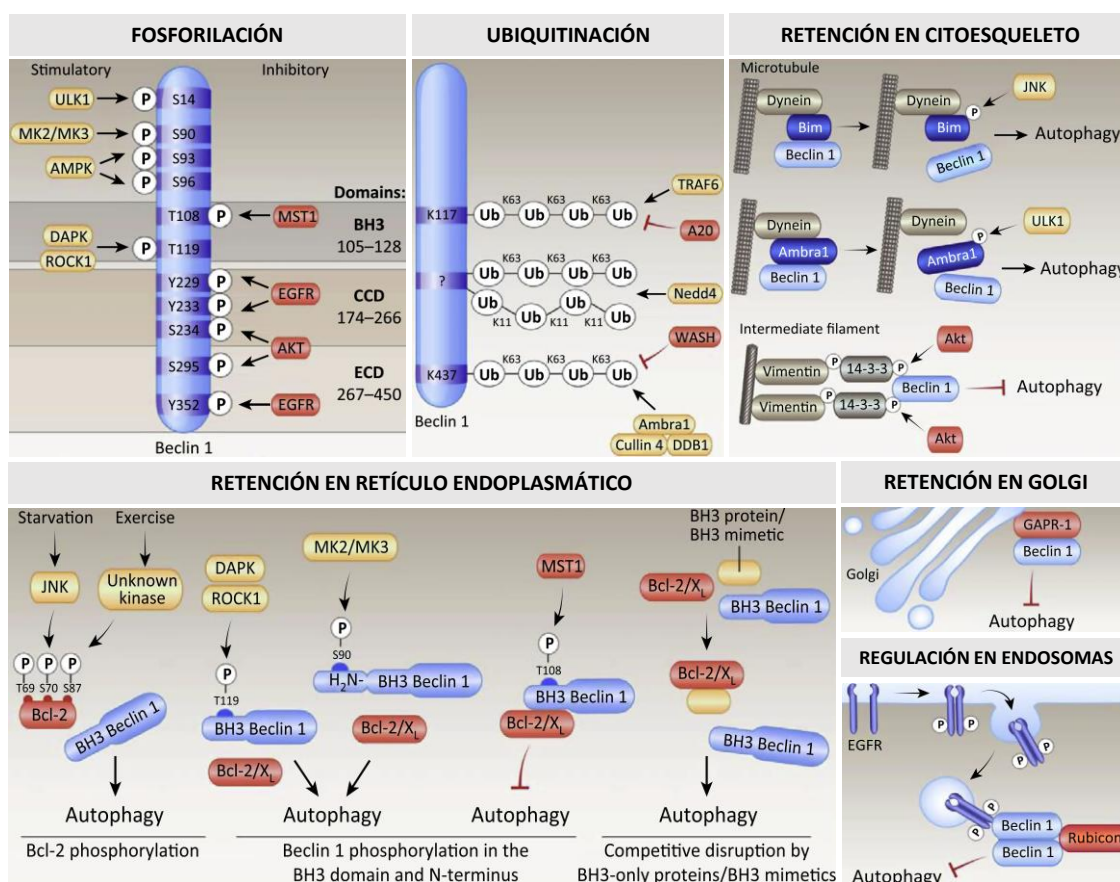
Teniendo en cuenta que en general ULK1 desfosforilado se asocia a inducción de AFG, se ha descrito que la fosfatasa PP2A activada bajo DN, desfosforila ULK1 en la S637 y de esta manera se induce AFG; sin embargo, aún no se conoce cuál es la fosfatasa encargada de desfosforilar la S757, uno de los sitios clave de inhibición por mTORC1 [539].

Estos eventos coordinados de fosforilación de ULK1 por mTORC1 y AMPK proveen un mecanismo por el cual las células pueden responder apropiadamente a un amplio rango de estímulos, de forma tal que el balance de la actividad de estas tres quinasas, sirve para

modular muchas de las decisiones celulares de inducción de AFG así como el crecimiento y la supervivencia celular [543].

### ▪ Regulación del complejo PI3KC3

Beclin1 es el elemento clave de la regulación de la AFG a nivel del complejo PI3KC3. Se trata de una proteína periférica de membrana que contiene en su extremo N-t una región IDR (del inglés, *intrinsically disordered region*), un dominio BH3 (del inglés, *Bcl-2 homology 3*), un motivo de hélice súper enrollada y en el extremo C-t presenta un dominio BARA (del inglés,  $\beta$ - $\alpha$  *repeated, autophagy-specific*) (revisado en [498]). Su regulación es muy compleja y se da a través de modificaciones postraduccionales (fosforilación, ubiquitinación) o por retención en localizaciones subcelulares específicas (RE, aparato de Golgi, citoesqueleto) (véase figura 6.3) [498].



**Figura 6.3 Mecanismos de regulación de la actividad de Beclin-1**

Beclin-1 es regulada por diversos mecanismos, que incluye: Fosforilación (P), mediada por diversas quinasas que pueden estimular o favorecer el proceso de AFG, o pueden inhibirlo; ubiquitinación; interacciones proteína-proteína que retienen a Beclin-1 asociado al citoesqueleto, aparato de Golgi o RE. También puede ser regulada por modificaciones postraduccionales que promueven la interacción Beclin-1-Rubicon en endosomas o por mecanismos que regulan la interacción entre Bcl2/Bcl-xl y Beclin-1 en el RE. Figura tomada y modificada de [498].

Todas estas interacciones permiten la comunicación del proceso de AFG con la señalización de vías de crecimiento, metabolismo, mitofagia, respuesta inmune innata y patogénesis microbiana [498].

Aparte de las muchas interacciones que regulan a Beclin-1, las quinasas AKT y EGFR (del inglés, *epidermal growth factor receptor*) de forma directa o a través de mTOR juegan un papel importante en la AFG a través de la regulación de Beclin-1.

En este sentido, AKT fosforila a Beclin-1 en las S234 y S295. Estas modificaciones inducen su unión a proteínas 14-3-3 y a proteínas del citoesqueleto como la vimentina, es así que, AKT de forma directa inhibe la AFG [548]. Por su parte el EGFR activo, es capaz de unirse a Beclin-1, fosforilarlo (en residuos Y229, Y233, y posiblemente Y352) y favorecer su homodimerización y unión a Rubicon [549], así como también, su unión a Bcl-2 un regulador negativo; de esta manera se inhibe su unión a PI3KC3/Vps34 [550]. Por el contrario la forma inactiva de EGFR forma un complejo con proteínas de endosomas como LAPTM4B (del inglés, *lysosomal protein transmembrane 4b*) y Sec5 y promueve su asociación con Rubicon, de esta forma, Beclin-1 se disocia de Rubicon, quedando disponible para activar PI3KC3 [549].

Por su parte, AMPK también es capaz de inducir AFG al fosforilar a Beclin-1 en las S91 y S94, en condiciones de privación de glucosa. De esta manera favorece la actividad del complejo PI3KC3/Vps34 [551].

Otros reguladores de la AFG a nivel del complejo PI3KC3, son MTMR14 y MTMR3 (del inglés, *myotubularin-related protein 14 y 3*) los cuales actúan como inhibidores de la AFG, al disminuir los niveles de PI(3)P y evitar la acumulación de WIPI1 en el fagóforo [552, 553].

### 6.3.3 Autofagia no canónica

Existen hallazgos que indican que la AFG también puede ocurrir en ausencia de alguna de las proteínas clave mencionadas en la tabla 6.1 y darse a través de un proceso no convencional de biogénesis de autofagosomas; este tipo de proceso se conoce como autofagia no canónica (revisado en [554, 555]). Se ha reportado AFG independiente de Beclin-1 luego de tratamiento con inductores apoptóticos [556-560], durante la diferenciación [561] y luego de infección bacteriana [562]. En otros casos la privación de glucosa puede inducir AFG sin el paso de iniciación dependiente de ULK [563]. Por otra parte, hay formas de AFG que no requieren el complejo de iniciación AMPK-mTORC1-ULK1, indicando que no siempre se requiere de la actividad de AMPK y no siempre es inhibida por mTORC1 [564-566]. También es posible observar formación de autofagosomas en las células deficientes de Atg5 después de un tratamiento prolongado

con etopósido. A diferencia de la AFG convencional, en este caso los autofagosomas parecen ser generados de una manera dependiente de Rab9 por medio de fusión de las membranas de aislamiento con vesículas derivadas de la trans-Golgi y desde endosomas tardíos [567].

### 6.3.4 Mitofagia

La mitofagia es el proceso por el cual las mitocondrias dañadas son seleccionadas para su degradación lisosomal vía AFG, este proceso es regulado por PINK1 y Parkin [568, 569]. Durante la mitofagia, PINK1 es estabilizado en la membrana externa de mitocondrias despolarizadas, recluta a Parkin, la cual ubiquitina proteínas de la MEM; esto constituye la señal “*eat me*” para su reclusión dentro de autofagosomas [115, 119, 111, 570, 571, 390, 391, 572, 573, 388]. Es así, que este proceso involucra los siguientes pasos: (1) Localización de PINK1 en la MEM; (2) reclutamiento de Parkin desde el citoplasma hacia la MEM; (3) activación de Parkin por autoubiquitinación y consecuente ubiquitinación de sus sustratos, para el establecimiento de señales “*eat me*” y (4) reconocimiento de la mitocondria, por receptores de mitofagia para su encapsulamiento en autofagosomas y posterior degradación lisosomal.

- **Localización de PINK1 en la MEM y reclutamiento de Parkin desde el citoplasma**

En mitocondrias desacopladas, PINK1 de 63 kDa se establece en la MEM y se asocia a componentes del complejo TOM, se dimeriza y autofosforila en los residuos S228 y S402 [117]. Hasta hace muy poco, no había ninguna evidencia experimental que explicara la forma por la cual Parkin se trasloca del citoplasma a la MEM, sin embargo Matsuda y Tanaka en 2015, publicaron que cadenas de Ub fosforiladas por PINK1, funcionan como receptores de Parkin en la membrana externa de mitocondrias despolarizadas [126].

- **Activación de Parkin (ubiquitinación de sustratos por Parkin)**

Ordureau *et al.* [574] proponen varios modelos de la vía de PINK1-Parkin. El primer modelo, indica que lo primero que ocurre luego del reclutamiento de Parkin a la MEM es su activación (exposición del residuo C431), secundaria a una fosforilación inducida por PINK1. De esta manera Parkin fosforilado en la S65, promueve la síntesis de cadenas de Ub sobre proteínas blanco de la MEM, permitiendo que aumente la densidad de Ub que pueden ser fosforiladas por PINK1 en la S65; estas fosfo-Ub se unen a Parkin y potencian su función ubiquitina ligasa [127]. Se conoce que el contenido máximo de Ub sobre la mitocondria se observa una hora después de la despolarización [575]. El segundo modelo, sugiere que la amplificación de la ubiquitinación, es producto de la concentración de Parkin fosforilado en cadenas de fosfo-Ub a través de una interacción directa, ya que Parkin fosforilado tiene mayor actividad específica que Parkin no-fosforilado. El tercer modelo

considera que fosfo-Ub recluta a Parkin no-fosforilado, con lo cual también se promueve la ubiquitinación de proteínas de MEM, aunque con tasas inferiores a las observadas con fosfo-Parkin. Por otra parte, la unión de Parkin no-fosforilado a fosfo-Ub puede aumentar su concentración local en las proximidades de PINK1 y esto facilitaría la fosforilación de Parkin, conduciendo a la activación adicional (primer modelo). Con respecto a este último modelo, Sauv e *et al.* haciendo mutagénesis y SAXS (del inglés, *small-angle X-ray scattering*) mostraron que la unión de fosfo-Ub al dominio RING1 de Parkin, genera un cambio conformacional en Parkin que facilita la exposición del dominio Ubl para su posterior fosforilación y activación [576]. Es posible que se produzca una combinación de estos mecanismos [574], en donde es claro que la secuencia precisa de eventos de fosforilación y ubiquitinación todavía necesita ser dilucidada.

Se ha descrito ampliamente que Parkin tiene varios blancos de ubiquitinación sobre la MEM incluyendo MNF1 y MNF2 [388, 390, 389, 572], TOM20, TOM70 [573], VDAC [159] y RHOT1/2 (Miro) [125, 577]. El tipo de cadena de Ub (K48 o K63) define el destino del blanco. Cadenas de Ub K48, conducen a degradación vía UPS, mientras que cadenas de Ub K63 se asocian a señales “*eat me*”, sin embargo, la importancia del establecimiento de estas últimas en la mitofagia regulada por PINK1 y Parkin, no se ha aclarado completamente; ya que, en células MEF que no expresan Ubc13 (la E2 responsable de la formación de las cadenas de Ub K63) ocurre mitofagia en presencia de desacopladores [578]. Con respecto a esto último, se han reportado otras cadenas de Ub como las Ub K11 y Ub K6 importantes para el proceso de mitofagia [579]. En conclusión, aún no se conoce el tipo de cadena de Ub que ensambla Parkin sobre sus blancos en MEM, ni cuáles son las claves o mecanismos moleculares que influyen el establecimiento de estas cadenas para regular de forma positiva la mitofagia [153].

#### ▪ **Receptores de mitofagia**

Varios receptores se han asociado con mitofagia, entre ellos se encuentran, p62 [159, 580] y una proteína localizada en MEM denominada Nix (del inglés, *NIP3-like protein X*) [581] descrita en la mitofagia de reticulocitos [582, 583].

Lazarou *et al.* en el 2015, produjeron una línea celular HeLa, silente para cinco receptores descritos previamente por participar en la autofagia (TAX1BP1, NDP52, NBR1, p62 y OPTN), posteriormente expresaron cada uno de ellos junto con Parkin y midieron la degradación de COXII (subunidad II de la citocromo C oxidasa) luego del tratamiento con oligomicina y antimicina. Mostraron que NDP52 y optineurina (OPTN) (dos receptores previamente vinculados a xenofagia), son los receptores principales para la mitofagia mediada por PINK1/Parkin y su intervención en el proceso es redundante [584]. OPTN es estabilizada por Parkin en la MEM a través de su dominio UBAN, lo cual induce la localización mitocondrial de DFCP1 y posteriormente de LC3, marcando el sitio de inicio



del autofagosoma alrededor de la mitocondria dañada [585]. Al parecer, la activación de OPTN depende de su fosforilación en la S177 por parte de TBK1 (del inglés, *TANK-binding kinase 1*) y a su vez la actividad de TBK1 depende de Parkin; sin embargo OPTN también puede ser reclutada a la MEM por PINK1, independientemente de Parkin [584]. En ese caso, PINK1 y OPTN pueden hacer el trabajo solas, sin embargo con una eficiencia reducida de la mitofagia  $\approx 5\%$  mientras que en presencia de Parkin se incrementa hasta  $\approx 24\%$  [584].

Por otra parte, en un contexto de despolarización mitocondrial inducido por FCCP (del inglés, *carbonylcyanide p-trifluoromethoxyphenylhydrazone*), se ha descrito mitofagia independiente de PINK1 y Parkin mediada por AMBRA1 (del inglés, *activating molecule in Beclin1-regulated autophagy 1*) un regulador positivo de Beclin1 [586, 587]. Incluso en ausencia de pérdida del  $\Delta\Psi_m$  puede ocurrir mitofagia inducida por quelación de hierro independiente de PINK1 y Parkin [588]. También se ha propuesto que DRP1 puede inducir mitofagia independiente de Parkin, aunque se conoce que ambas proteínas actúan de manera sinérgica para llevar a cabo este proceso [589]. Concluyendo, es posible que diferentes vías de mitofagia coexistan dependiendo de las condiciones que la desencadenen o del tipo de célula.

#### ▪ Regulación de la mitofagia

El proceso de mitofagia es altamente regulado en sus diferentes etapas, los eventos moleculares que modulen: (1) el  $\Delta\Psi_m$ , (2) la localización de PINK1 en la MEM y (3) el reclutamiento y activación de Parkin; pueden ser considerados reguladores de la mitofagia.

La ubiquitinación es un proceso reversible, de modo que enzimas que remueven ubiquitinas como las DUBs (del inglés, *deubiquitinating enzymes*), son reguladoras comunes de la actividad de las E3 ubiquitin ligasas; cada E3 puede ser regulada por muchas DUBs. Se han descrito en el genoma humano 90 DUBs putativas, las cuales pueden regular negativamente la mitofagia por medio de la deubiquitinización de Parkin o de sus proteínas blanco (revisado en [153] y referencias allí citadas). Con respecto a DUBs de Parkin, Ataxin-3 fue la primera encontrada en regular de forma negativa la actividad E3 de Parkin, evitando su autoubiquitinación, al inhibir Ubc13 [590]. USP8 también regula negativamente a Parkin pero lo hace de forma directa al catalizar la remoción de Ub con uniones de K6 sobre Parkin [591]. Por otro lado USP15 contrarresta la ubiquitinación mediada por Parkin [592], así como, USP30 se asocia a la deubiquitinación de MIRO y TOM20 (sustratos de Parkin) [593, 594].

Dado que la fosforilación de Ub (en S65) parece impedir la deubiquitinación por DUBs, un mecanismo potencial de regulación de la mitofagia es la acción de fosfatasa específicas de Ub, sin embargo respecto a este punto no hay estudios concluyentes (Revisado en [153]).

## 6.4 Microautofagia

La microautofagia es un proceso por el cual contenido citoplasmático, que en algunos casos incluye organelos completos, es invaginado por proyecciones de la membrana lisosomal, para luego ser internalizado en forma de vesículas de membrana única, no existen vesículas intermediarias para el transporte del material a degradar (revisado en [595]). Posterior a la internalización, la membrana de la vesícula debe ser digerida dentro del lumen lisosomal para que su contenido pueda ser degradado, sin embargo, no se conocen las modificaciones que debe sufrir la membrana vacuolar para que sea distinguida de la membrana limitante del lisosoma y pueda ser degradada (revisado en [476]).

Al parecer la microautofagia es un mecanismo constitutivamente activo y necesario para el recambio de proteínas de larga vida, pero los mecanismos que conducen a la formación y degradación de las estructuras microautofágicas en mamíferos son desconocidos (revisado en [596, 595]). Algunos estudios publicados a finales de los años 80 en los cuales se indujo la agregación y acumulación de proteínas usando inhibidores de proteasas o haciendo microinyecciones de proteínas, sugieren que en mamíferos, este proceso puede ser desencadenado por la acumulación de agregados proteicos (revisado en [595]).

La mayoría de la información de este proceso viene de estudios realizados en levaduras, a partir de los cuales se ha identificado microautofagia no selectiva que contempla la degradación aleatoria de porciones citoplasmáticas, y la microautofagia selectiva que involucra la degradación de organelos específicos como la micromitofagia, la microautofagia parcial del núcleo (PMN del inglés *piecemeal microautophagy of the nucleus*) y la micropexofagia (degradación de peroxisomas) [596]. Dubouloz *et al.* muestran una relación positiva entre la activación de los complejos EGO (del inglés, *exit from rapamycin-induced growth arrest*) y TOR (del inglés, *target of rapamycin*) sobre la inducción del proceso de microautofagia en levaduras con el fin de contrarrestar el flujo vacuolar mediado por la activación de la macroautofagia [597].

En mamíferos, la activación del proceso de microautofagia es independiente de la concentración de aminoácidos, y del estado energético de la célula. Sin embargo, al igual que la macroautofagia, el proceso de secuestro, internalización y proteólisis requiere energía (revisado en [476]).

A diferencia de la autofagia y la AMC, el desconocimiento de los mecanismos moleculares que regulan la microautofagia hace que se desconozcan las implicaciones patológicas que puede desencadenar su perturbación.

## 6.5 AMC

Es la única forma de AFG que no involucra vesículas de doble membrana. Ocurre cuando proteínas con un pentapéptido KFERQ se unen a complejos moleculares de chaperonas que contienen Hsc70. La proteína que va a ser degradada por este mecanismo junto con el complejo Hsc70 se asocia directamente con el receptor lisosomal Lamp2, y con la ayuda de otras chaperonas la proteína blanco es transportada a través de la membrana lisosomal hacia el lumen, donde es degradada. Desde el punto de vista experimental, el principal estímulo *in vitro* de la AMC es la privación de SFB, el cual también es un estímulo para la macroautofagia, por lo cual se cree que ambas vías se desarrollan sinérgicamente [598].

## 6.6 Objetivo específico

Evaluar el efecto del silenciamiento de los genes PINK1 o Parkin sobre la autofagia modulada por privación de nutrientes y C2-ceramida.

## 6.7 Metodología

### 6.7.1 Evaluación del efecto del silenciamiento de los genes PINK1 y Parkin sobre el proceso de mitofagia

El proceso de mitofagia se evaluó por microscopía confocal mediante dos abordajes metodológicos: (1) Inmunofluorescencia de LC3 y TOM20 (marcador de mitocondrias) y (2) expresión de LC3-GFP y marcaje mitocondrial con MitoTracker® Red. Las células CAD shControl, CAD shPINK1 y CAD shParkin fueron cultivadas sobre cubreobjetos pre-tratados con Poli-L-Lisina dispuestos en cajas de 2 cm de diámetro (100.000 células/caja) durante 3 días para inmunofluorescencia, o durante 1 día en el caso de la expresión de GFP-LC3.

#### ▪ Inmunofluorescencia de LC3 y TOM20:

Al tercer día de diferenciación, el medio fue sustituido por DMEM-F12 libre de suero. Las células se trataron con C2C (25  $\mu$ M) o con vehículo (DMSO 0,1 % v/v) por 6 h. Como control positivo de mitofagia las células se trataron con CCCP (10  $\mu$ M) durante 1 h y como control positivo de autofagia en general, las células se trataron con rapamicina (5  $\mu$ M) durante 6 h. Se siguió el protocolo general de inmunofluorescencia descrito en el capítulo 3.

- **Expresión de GFP-LC3 y marcaje con MitoTracker® Red:**
  - Las células se transfectaron transitoriamente siguiendo el protocolo de lipofectamina 2000 (descrito en el capítulo 3) con 1 µg de ADN por pozo de 1 cm de diámetro, con el plásmido EGFP-LC3.
  - 48 h después de la transfección, las células se trataron con C2C (10 µM) o con vehículo (DMSO 0,1 %) por 6 h. Como control positivo se indujo autofagia por DN, cultivando las células en HBSS durante 6 h.
  - Posteriormente se procedió al marcaje de la red mitocondrial con MitoTracker® Red (188 nM durante 1 h). Luego, se hicieron dos lavados con 2 ml de DMEM F-12 puro precalentado a 37 °C y las células se incubaron durante 10 min, este proceso se repitió 4 veces.
  - Las células fueron fijadas con paraformaldehído al 4 % durante 10 min y permeabilizadas con acetona fría durante 120 s exactos, luego se lavaron 2 veces con 1 ml de PBS y una vez con agua destilada-desionizada estéril, los vidriecillos se montaron en portaobjetos con el medio de montaje con *Hoescht* y los bordes se fijaron con esmalte de uñas.
  - Las láminas fueron guardadas en oscuridad a -20 °C hasta el momento de tomar las fotos.
  
- **Conteo celular y análisis de imágenes:**
  - El conteo de las células con agregados EGFP-LC3 se realizó por observación directa en el microscopio confocal, con el objetivo de 60X de inmersión en aceite, usando los filtros respectivos para observar los agregados de EGFP-LC3 y los núcleos marcados con *Hoescht*.
  - Se contaron los campos necesarios hasta completar mínimo 100 células transfectadas, por cada experimento.
  - Para el análisis de los autofagosomas se adquirieron imágenes de células únicas que presentaran agregados de EGFP-LC3, con un *zoom* X2, usando un microscopio confocal Nikon C1 Plus ECLIPSE Ti con objetivo de 60X de inmersión en aceite, con una apertura numérica de 1,4; y distancia de trabajo de 0,13 mm.
  - Por cada célula, se registraron 11 secciones ópticas cada 0,4 µm, usando de forma independiente el láser HeNe 1 MW (543 nm) para el *MitoTracker® Red*, láser argón 50 MW (488) para GFP y el láser diodo 17 MW (408 nm) para *Hoescht*.
  - Se registraron 30 células por cada tipo de célula y condición. Las secciones ópticas de cada célula fueron fusionadas con la proyección de máxima intensidad usando el programa ImageJ, compilación ConfocalUniovi ImageJ. versión 1.51.

- El número de agregados de EGFP-LC3 y el promedio del área de los agregados por célula (tamaño de los autofagosomas) así como el porcentaje de colocalización EGFP-LC3 con *mitotracker*, se obtuvo usando el macro *Mito-Morphology* desarrollado por Ruben K. Dagda [347]. (véase anexo G)
- El porcentaje de colocalización se obtuvo calculando la relación entre el área de colocalización (amarilla) y el área total de marcaje rojo (mitocondrias).

$$\% \text{ colocalización mitocondria - LC3} = \frac{\text{área puntos amarillos} \times 100\%}{\text{área mitocondrial total}}$$

### 6.7.2 Evaluación del proceso de degradación de autofagosomas

Con el fin de conocer el efecto del silenciamiento de los genes PINK1 y Parkin con respecto a la etapa final del flujo autofágico, inicialmente se realizó un marcaje de autofagolisosomas usando monodansil cadaverina (MDC) y se calculó la intensidad de fluorescencia. Adicionalmente a las células CAD shControl, shPINK1 y shParkin fueron transfectadas con el plásmido ptf-LC3 [198] que permite la expresión de LC3 de rata unida EGFP y mRFP. También se sobre-expresó la proteína Parkin humana en todas las líneas celulares

#### ▪ **Marcaje de compartimentos acídicos:**

Los compartimentos acídicos se marcaron con MDC, el cual inicialmente fue caracterizado como un compuesto lisosomotrópico, autofluorescente, específico para autofagolisosomas [599], debido a que se acumula en los compartimentos membranosos ricos en lípidos, quedando atrapado en las membranas adyacentes [600]. Su carácter de base débil y su capacidad de atravesar membranas biológicas, permite que se concentre en compartimentos acídicos por un mecanismo de trampa de iones [601]. MDC se considera una sonda o sensor de polaridad del disolvente ya que tanto la intensidad de fluorescencia como la longitud de onda de emisión, varían dependiendo de la polaridad del disolvente. Es así que el aumento en la concentración de moléculas hidrofóbicas induce un incremento en la intensidad de fluorescencia y un cambio en la longitud de onda máxima de emisión [601].

Munafó y Colombo caracterizaron el marcaje de vesículas autofágicas con MDC por fluorimetría, en células tratadas con diferentes moduladores de autofagia [602]. El marcaje con MDC responde a los cambios dinámicos que ocurren en respuesta a moduladores del proceso de autofagia, así, la inducción de la autofagia por DN o tratamiento con rapamicina (inhibidor de mTOR) incrementa el número y tamaño de vesículas marcadas, por el contrario, la inhibición de la autofagia por tratamiento con 3MA (3 metiladenina) o

wortmanina (inhibidores de PI3K) inhibe casi completamente el marcaje de vesículas autofágicas [602].

#### Protocolo de células adherentes en placas de 96 pozos:

- Las células fueron sembradas en cajas de cultivo de 96 pozos a una densidad de 7.000 células/pozo con 200 µl de medio de diferenciación durante tres días.
- Luego de la diferenciación, el medio fue sustituido por DMEM-F12 libre de suero. Las células se trataron con C2C (25 µM), IGF1 (100 ng/ml) o vehículo (DMSO 0,1 %) por 6 h, también se realizó un pre-tratamiento con IGF1 (100 ng/ml) durante 30 min, seguido de 6 h con C2C (10 µM). Como control positivo de autofagia y de la técnica las células se cultivaron durante 6 h bajo condiciones de DN (HBSS) y como control negativo se realizó un pre-tratamiento con 3MA (20 mM) durante 3 h seguido de 6 h de DN.
- Seguido del período de incubación con los diferentes tratamientos, las células fueron incubadas con MDC (0,05 mM) durante 1 h a 37°C.
- Posteriormente las células se lavaron 4 veces con PBS pH 7,4 precalentado a 37°C, y la fluorescencia fue cuantificada por fotometría usando un fluorómetro *Twinkle LB 970* de *Berthold Technologiies* usando un filtro de excitación de 355 nm y uno de emisión de 535 nm. El blanco de lectura correspondió a la auto-fluorescencia promedio de tres pozos a los cuales no se les adicionó MDC
- Las medidas de fluorescencia fueron normalizadas infiriendo la cantidad de células por pozo, al cuantificar la cantidad de proteínas por pozo. Para esto, el contenido de cada pozo fue lisado con 10 µl de *buffer* RIPA durante 5 min, y se siguió el protocolo de BCA para calcular la concentración de proteínas (véase capítulo 3)
- El MDC incorporado fue expresado como unidades arbitrarias (u.a)

$$u.a = \frac{\text{Fluorescencia} - \text{fluorescencia del blanco MDC}}{\text{Absorbancia} - \text{Absorbancia del blanco BCA}}$$

#### Visualización de vacuolas marcadas con MDC

Con el fin de validar los resultados del ensayo de MDC en placas de 96 pozos, se decidió observar la formación de vacuolas ácidas con MDC bajo condiciones control y luego de 3 h de DN. Para esto, las células CAD silvestres fueron cultivadas sobre cubreobjetos pre-tratados con Poli-L-Lisina dispuestos en cajas de 2 cm de diámetro (100.000 células/caja), durante 3 días en medio de diferenciación.

- La autofagia fue inducida cultivando las células en condiciones de DN (con HBSS) durante 6 h, como control negativo de AFG, se usaron células mantenidas durante 6 h en DMEM-F12 suplementado con 10 % SFB.

- Luego fueron incubadas con MDC (0,05 mM) durante 1 h a 37°C. Cumplido el tiempo de marcaje, se realizaron 4 veces con PBS pH 7,4 precalentado a 37°C.
- Las células se fijaron con PFA al 4 % durante 10 min y los vidriecillos se montaron en portaobjetos con el medio de montaje con *Hoescht* y los bordes se fijaron con esmalte de uñas.
- Las láminas fueron guardadas en oscuridad a -20 °C hasta el momento de tomar las fotos y las imágenes se adquirieron con un *zoom* X2, usando un microscopio confocal Nikon C1 Plus ECLIPSE Ti con objetivo de 60X de inmersión en aceite, con una apertura numérica de 1,4; y distancia de trabajo de 0,13 mm. Por cada célula, se registraron 11 secciones ópticas de 0,4 µm de grosor, usando de forma independiente el láser argón 50 MW (488) para visualizar MDC y el láser diodo 17 MW (408 nm) para *Hoescht*.

- **Expresión de GFP-RFP-LC3:**

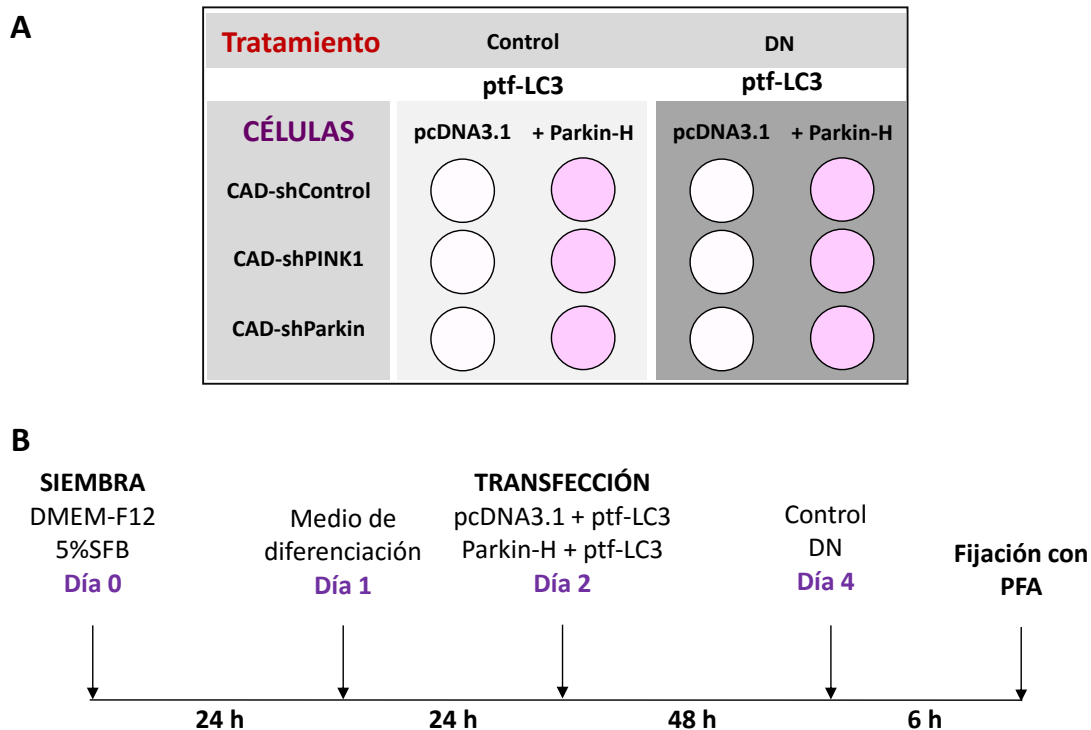
Las células CAD shControl, CAD shPINK1 y CAD shParkin fueron cultivadas sobre cubreobjetos pre-tratados con Poli-L-Lisina dispuestos en cajas de 24 pozos (25000 células/pozo). El diseño experimental, se describe en la figura 6.4.

Las células se fijaron con PFA al 4% durante 10 min, los vidriecillos se montaron en portaobjetos con el medio de montaje con *Hoescht* y los bordes se fijaron con esmalte de uñas. Las láminas fueron guardadas en oscuridad a -20 °C hasta el momento de tomar las fotos.

- Las imágenes se adquirieron con un *zoom* X4, usando un microscopio confocal Nikon C1 Plus ECLIPSE Ti con objetivo de 60X de inmersión en aceite, con una apertura numérica de 1,4; y distancia de trabajo de 0,13 mm.
- Por cada célula, se registraron 41 secciones ópticas cada 0,13 µm, usando de forma independiente láser HeNe 1 MW (543 nm) para el mRFP-LC3, láser argón 50 MW (488) para GFP-LC3 y el láser diodo 17 MW (408 nm) para *Hoescht*. Por cada condición, se seleccionaron 30 células que estuvieran aisladas. Las secciones ópticas de cada célula fueron fusionadas con la proyección de máxima intensidad usando el programa ImageJ, compilación Confocal Uniovi ImageJ. versión 1.51.

### Análisis de imágenes

Se contaron autofagosomas y autofagolisosomas. Los autofagosomas corresponden a agregados de GFP-RFP-LC3, por lo tanto están representados por puntos amarillos (colocalización verde y rojo), mientras que los autofagolisosomas (aquellos autofagosomas que se han fusionado con lisosomas) solo fluorescen en rojo, debido a que las condiciones ácidas de los lisosomas degradan la GFP [198]. El procedimiento a seguir fue:



**Figura 6.4** Diseño experimental, de la evaluación del flujo autofágico por expresión de ptf-LC3

(A) Diseño experimental. (B) Línea temporal de preparación de las muestras a ser observadas por microscopía confocal. Los diferentes tipos celulares se cultivaron durante 6 h en condición de DN (HBSS) para inducir autofagia y como control las células se mantuvieron en medio de diferenciación. ptf-LC3 (plásmido para la expresión de GFP-RFP-LC3). PFA (paraformaldehído). pcDNA3.1 (vector vacío), Parkin-hu (plásmido para la expresión de Parkin humano).

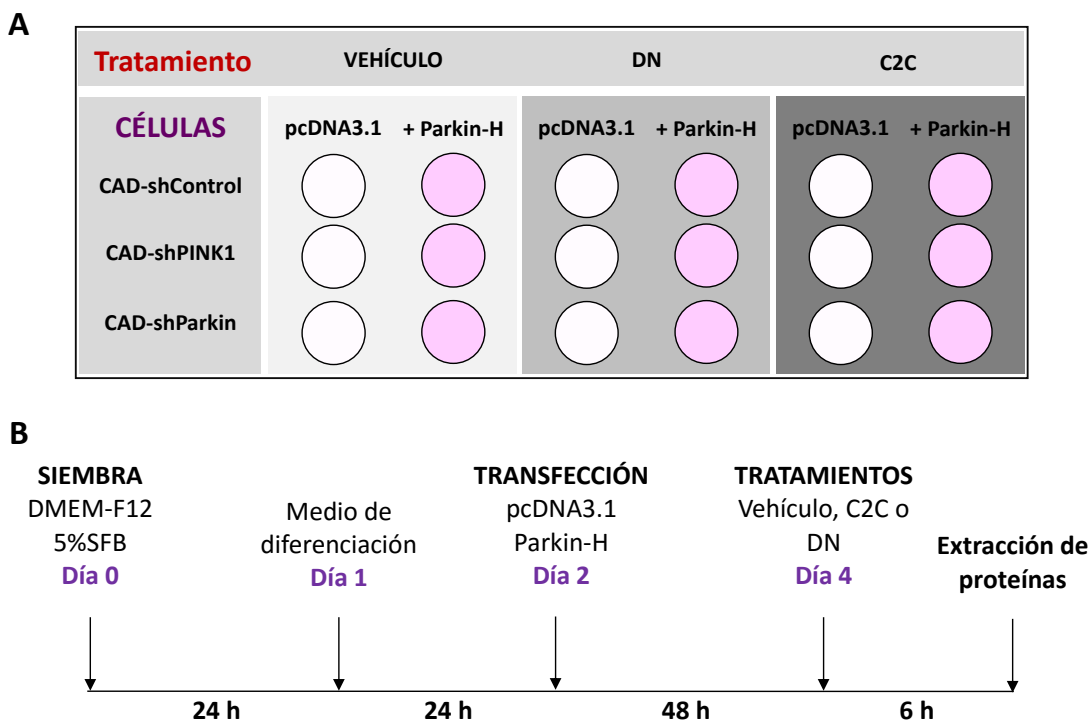
- Se hizo la máxima proyección de las secciones ópticas de cada célula.
- Se separaron los canales de color (verde, rojo y azul).
- Las proyecciones correspondientes al canal rojo y verde, se procesaron de forma independiente.
- Primero se invirtió el patrón de color con la herramienta *Edit* → *invert*, y la imagen original se convirtió a 8 bits con el fin de obtener una imagen en escala de grises.
- Se utilizó el *plugin* ITCN (Image-based Tool Counting Nuclei) que funciona con el programa ImageJ, compilación ConfocalUniovi ImageJ. versión 1.51. Manualmente se delimitó el contorno de la célula,
- Se ajustaron los parámetros del *plugin*. Ancho = 7 pixeles (correspondió al valor mínimo de diámetro que el programa consideró un objeto) y distancia mínima = 7 pixeles (distancia mínima de separación entre dos objetos).



- Luego de elegidos los parámetros, se seleccionó la opción contar objetos oscuros. (para detalles véase anexo K).
- Los datos se tabularon en Excel: El total de vesículas (autofagosomas + autofagolisosomas) correspondió al total de puntos rojos. Los autofagosomas correspondieron al total de puntos verdes y los autofagolisosomas a la diferencia entre puntos rojos y puntos verdes

### 6.7.3 Análisis por *western blot* de proteínas implicadas en autofagia

Las células CAD shControl, CAD shPINK1 y CAD shParkin fueron cultivadas sobre cajas pre-tratadas con Poli-L-Lisina de 3,5 cm de diámetro (250.000 células/caja). El diseño experimental, se describe en la figura 6.5. Siguiendo el protocolo estándar de *western blot*, se analizaron las siguientes proteínas: LC3, AKT total, pAKT (S473), mTOR total, p mTOR (S2448), ERK 1/2 total, pERK 1 (T202), pERK 2 (Y204), AMPK $\alpha$  total, pAMPK $\alpha$  (T172), AMPK $\beta$ 1 total y pAMPK $\beta$ 1 (S108). Como control de carga se utilizó  $\beta$ -actina.



**Figura 6.5** Diseño experimental, análisis de proteínas implicadas en autofagia por *western blot*

(A) Diseño experimental. (B) Línea temporal de preparación de las muestras. Los diferentes tipos celulares se trataron con vehículo (DMSO 0,1% v/v), C2C (25  $\mu$ M) o condición de DN, durante 6 h. pcDNA3.1 (vector vacío), Parkin-H (plásmido para la expresión de Parkin humano).

### 6.7.4 Medición de la liberación de LDH

El porcentaje de liberación de LDH se calculó siguiendo el protocolo descrito en el capítulo 3. Para éste se utilizaron 50 µl de medio de cultivo proveniente de los cultivos de células destinados para el análisis por *western blot* de proteínas implicadas en autofagia (véase apartado 6.7.3).

## 6.8 Resultados

### 6.8.1 Efecto del silenciamiento de PINK1 o Parkin sobre la respuesta autofágica, secundaria a privación de nutrientes o tratamiento con C2C

Un método importante para monitorear la inducción de AFG, consiste en estudiar la localización subcelular de LC3. EGFP-LC3 es usado comúnmente para marcar y detectar autofagosomas por microscopía de fluorescencia y confocal, los cuales se observan en forma de agregados fluorescentes. En este sentido, células CAD shControl, CAD shPINK1 y CAD shParkin se transfectaron para expresar transitoriamente EGFP-LC3. La DN, incrementó el número células con autofagosomas respecto a las células tratadas con vehículo; y no se observaron diferencias significativas entre las células CAD shControl, CAD shPINK1 y CAD shParkin (véase figura 6.6 D). El tratamiento con C2C, también aumentó significativamente el número de células con autofagosomas en los tres tipos celulares; sin embargo, el silenciamiento de PINK1 o Parkin, indujo mayor número de células con autofagosomas en comparación con las células control ( $p < 0,05$  y  $p < 0,01$  respectivamente) (véase figura 6.6 D). En conclusión, el silenciamiento de PINK1 o de Parkin no afectó la respuesta autofágica secundaria a DN, pero hizo a las células más susceptibles de AFG luego del tratamiento con C2C.

Adicionalmente, se evaluaron el número y el tamaño de los autofagosomas. El número de autofagosomas se vio afectado tanto por la DN y el tratamiento con C2C ( $p < 0,0001$ ), como por el silenciamiento de PINK1 o Parkin ( $p < 0,0001$ ). Además el anova de dos vías permitió identificar una interacción entre ambos factores ( $p = 0,0292$ ) (véase figura 6.6 E). Las células CAD shControl mostraron mayor cantidad de autofagosomas luego de la DN ( $p < 0,01$ ) o el tratamiento con C2C ( $p < 0,001$ ). Con respecto a las células CAD shPINK1, se observó una tendencia al incremento en el número de autofagosomas luego de la DN y un aumento significativo de los mismos luego del tratamiento con C2C ( $p < 0,001$ ) el cual fue superior al observado en las células CAD shControl ( $p < 0,01$ ). Por otra parte, las células CAD shParkin presentaron mayor número de autofagosomas que las células CAD shControl en todos los casos: luego del tratamiento con vehículo ( $p < 0,001$ ), bajo DN ( $p < 0,001$ ) y con C2C ( $p < 0,001$ ).

**Figura 6.6 El silenciamiento de PINK1 o Parkin hizo a las células más susceptibles a AFG por C2C y el silenciamiento de Parkin incrementó el número de agregados EGFP-LC3**

Microfotografías representativas de células CAD shControl, CAD shPINK1 y CAD shParkin transfectadas con el plásmido EGFP-LC3. Las mitocondrias fueron marcadas con MitoTracker® Red CMXRos y los núcleos con *Hoescht*. Las puntas de flecha indican algunos puntos de colocalización mitotracker y EGFP-LC3. Las células fueron cultivadas durante 6 h con: **(A)** medio con vehículo (DMSO 0,1 %v/v), **(B)** bajo condiciones de DN **(C)** medio con C2-Ceramida (10  $\mu$ M). **(D)** Porcentaje de células transfectadas con agregados de EGFP-LC3. ANOVA de dos vías (tipo de células:  $p=0,0385$ ; tratamiento:  $p<0,0001$ ; interacción:  $p=0,0434$ ). **(E)** Número de agregados de EGFP-LC3 por célula. ANOVA de dos vías (tipo de células:  $p<0,0001$ ; tratamiento:  $p<0,0001$ ; interacción:  $p=0,0292$ ). **(F)** Área media de agregados GFP-LC3 (AMA GFP-LC3) por célula. ANOVA de dos vías (tipo de células:  $p=0,1251$ ; tratamiento:  $p<0,0001$ ; interacción:  $p=0,5713$ ). **(G)** % de colocalización mitotracker-LC3. ANOVA de dos vías (tipo de células:  $p<0,0001$ ; tratamiento:  $p<0,0001$ ; interacción:  $p<0,0001$ ). **(D)** Las barras representan medias  $\pm$  SEM de 100 células provenientes de 3 experimentos. **(E, F y G)** Las barras representan medias  $\pm$  SEM de 30 células provenientes de 2 experimentos independientes. Para comparaciones múltiples se aplicó la prueba de contrastes *T* de Bonferroni. (\*) Indican diferencias significativas respecto a las células CAD shControl de cada grupo de tratamiento. (<sup>o</sup>) Indican diferencias significativas respecto a las células tratadas con el vehículo. ( <sup>$\Delta$</sup> ) Indican diferencias significativas respecto a las células shPINK1 (\*  $p < 0,05$ ; <sup>oo/ $\Delta$</sup>   $p < 0,01$ ; <sup>\*\*\*/<sup>ooo</sup></sup>  $p < 0,001$ ), (página siguiente).

Figura 6.6 (continuación)

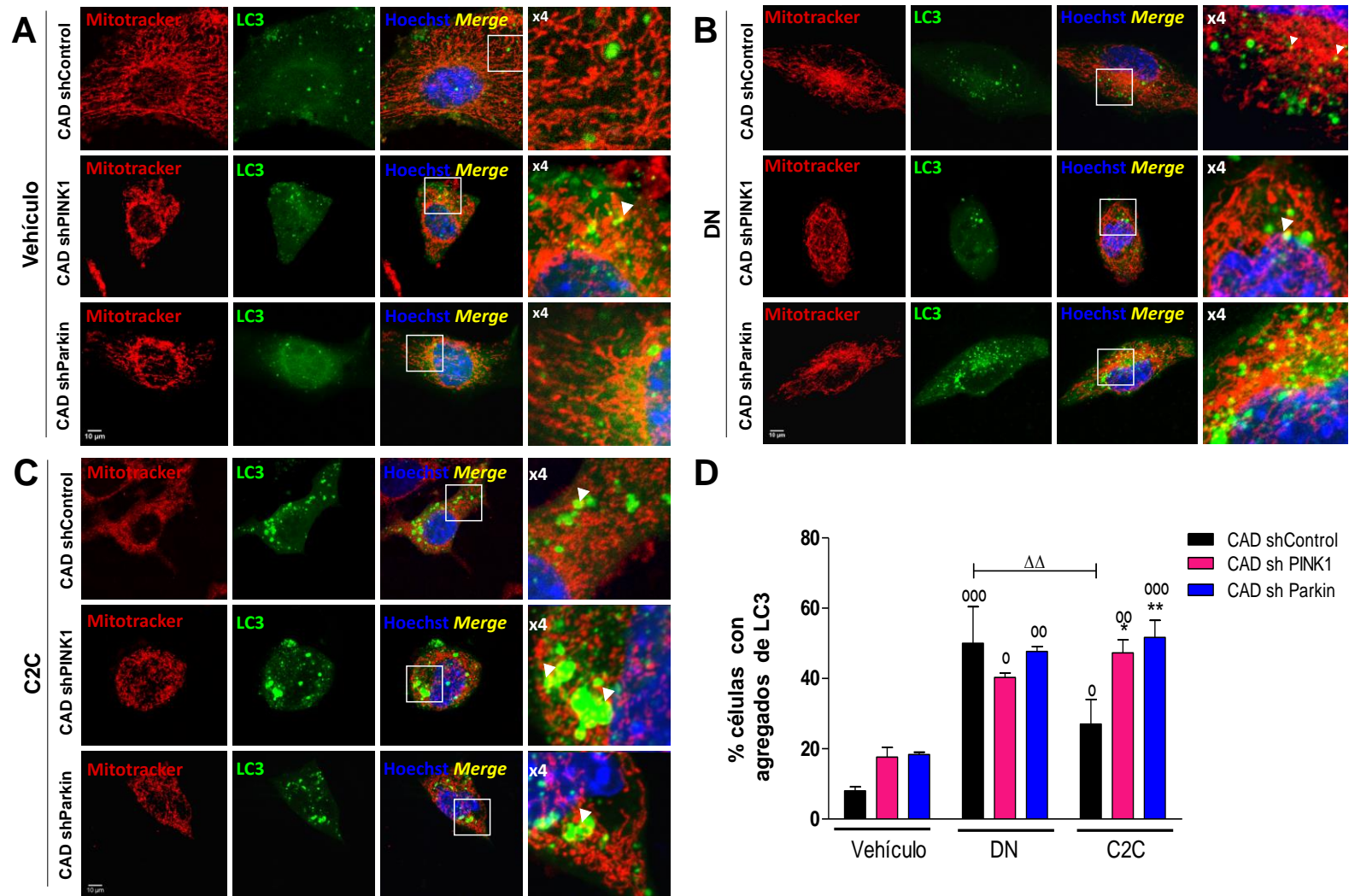
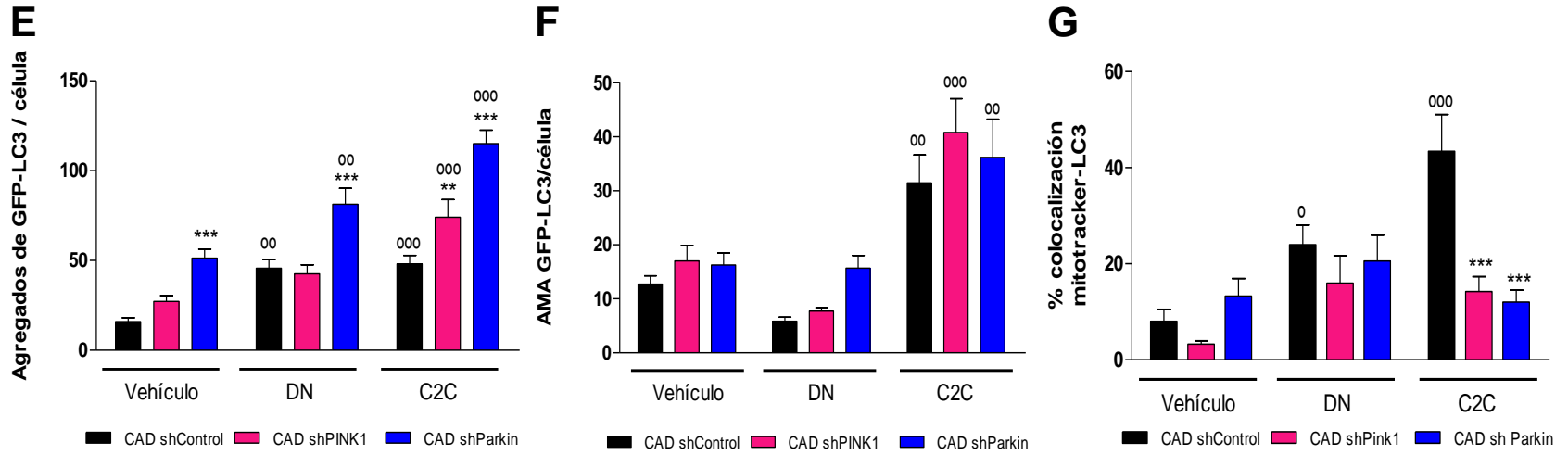


Figura 6.6 (continuación)



A partir de este hallazgo se infirió que el silenciamiento de Parkin podría estar incrementando la respuesta autofágica o alterando el proceso de degradación de los autofagosomas (véase adelante apartado 6.8.3). Con respecto al tamaño de los autofagosomas, no se observó ningún efecto producto del silenciamiento de los genes PINK1 o Parkin ( $p=0,1251$ ); sin embargo, el tratamiento con C2C provocó un incremento significativo en el área media de los autofagosomas ( $p<0,0001$ ), este incremento fue independiente del silenciamiento de PINK1 o de Parkin (véase figura 6.6 F y anexo L). Es decir, el tratamiento con C2C indujo más agregados por célula (véase figura 6.6 E) y de mayor tamaño (véase figura 6.6 F).

### **6.8.2 Efecto del silenciamiento de PINK1 o Parkin sobre el proceso de mitofagia en un contexto neurotóxico con C2C**

Con el fin de conocer el efecto del silenciamiento de PINK1 o Parkin sobre la mitofagia, las células CAD shControl, CAD shPINK1 y CAD shParkin se trataron con el inductor de autofagia rapamicina (inhibidor de mTORC1), con el desacoplador mitocondrial CCCP o con C2C, seguido de inmunodetección de LC3 y TOM20 por microscopía de fluorescencia y confocal (véase figura 6.7). Las células CAD shPINK1 tuvieron niveles significativamente menores de intensidad de fluorescencia de LC3 que las células CAD shControl, cuando se trataron con vehículo ( $p<0,001$ ) y con C2C ( $p<0,001$ ); sin embargo, el tratamiento con rapamicina indujo un incremento en la fluorescencia de LC3 en las células CADshPINK1.

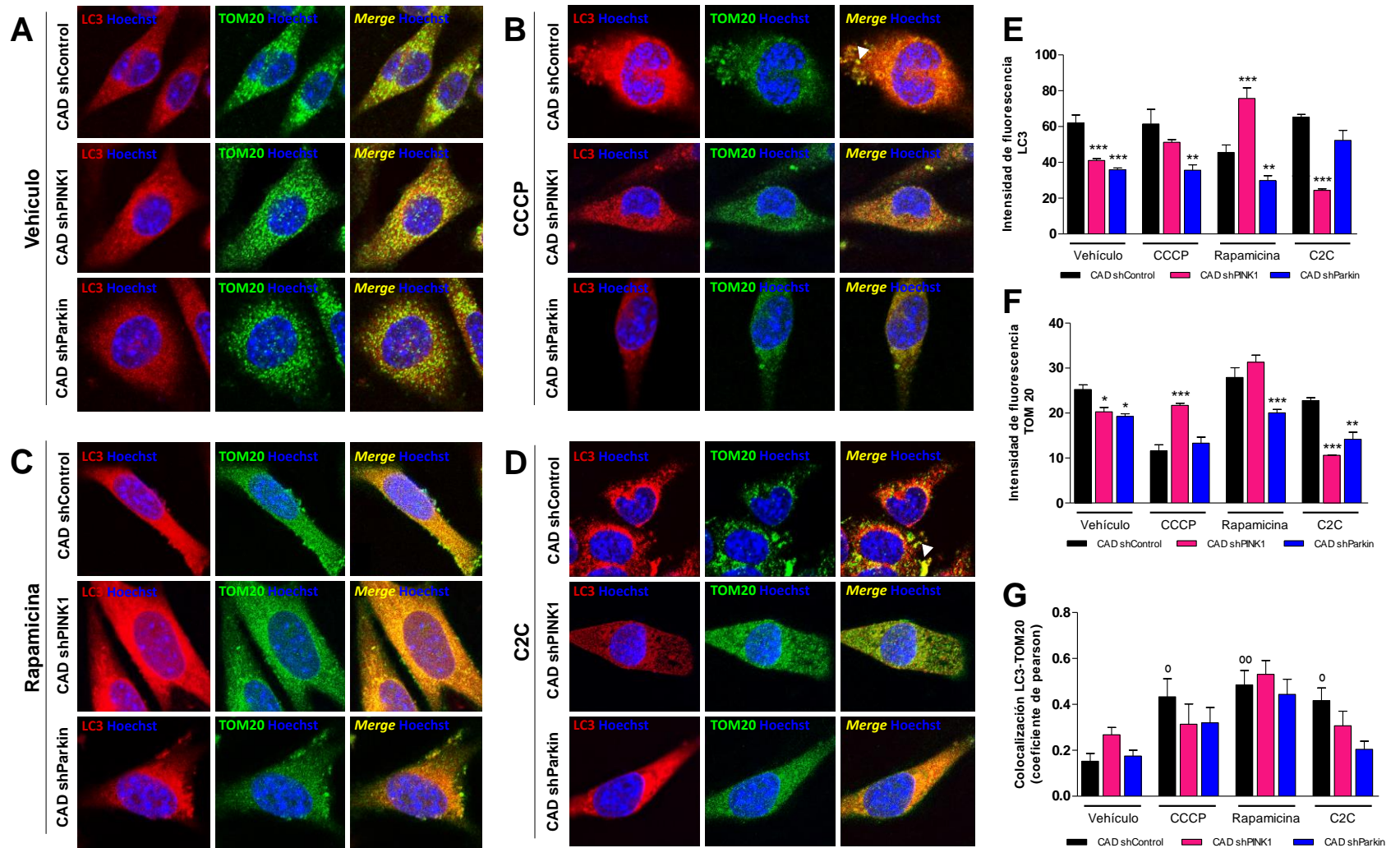
Adicionalmente no se observaron cambios significativos cuando las células se trataron con CCCP (véase figura 6.7 E). Con respecto al marcaje de TOM20, se observó que las células CAD shPINK1 mostraron valores de intensidad de fluorescencia menores que las células CAD shControl cuando se trataron con vehículo o con C2C, mientras el tratamiento con el desacoplador mitocondrial CCCP de forma inesperada incrementó la fluorescencia de TOM20 en las células silenciadas para PINK1. Por otro lado, en cuanto a la colocalización entre LC3 y TOM20 no se observaron diferencias significativas entre las células CAD shPINK1 y las CAD shControl, pero se apreció una tendencia a disminuir la colocalización cuando las células se trataron con CCCP o con C2C (véase figura 6.7 G).

Con respecto a las células CAD shParkin, éstas mostraron niveles significativamente menores de intensidad de fluorescencia de LC3 que las células CAD shControl, cuando se trataron con vehículo ( $p<0,001$ ), CCCP ( $p<0,01$ ) y Rapamicina ( $p<0,001$ ), pero no se observaron diferencias significativas luego del tratamiento con C2C (véase figura 6.7 E). Por otro lado, las células CAD shParkin mostraron valores de intensidad de fluorescencia de TOM20 menores que las células CAD shControl cuando se trataron con vehículo, rapamicina o C2C (véase figura 6.7 F). Adicionalmente se observó un menor porcentaje de colocalización entre LC3 y TOM20 luego del tratamiento con C2C, sin embargo esta diferencia no fue estadísticamente significativa.

**Figura 6.7 El silenciamiento de PINK1 o Parkin disminuyó la mitofagia secundaria al tratamiento con C2C.**

Microfotografías representativas de células CAD shControl, CAD shPINK1 y CAD shParkin, **(A)** luego de 6 horas de tratamiento con vehículo (DMSO 0,1 %v/v), **(B)** 1 hora CCCP (10  $\mu$ M), **(C)** 6 horas con Rapamicina (5  $\mu$ M) y **(D)** C2C (25  $\mu$ M). **(E)** Intensidad de fluorescencia de LC3 / célula. **(F)** Intensidad de fluorescencia de TOM20 / célula. **(E y F)** Las barras representan medias  $\pm$  SEM de mínimo 60 células provenientes de 2 experimentos independientes. **(G)** Coeficiente de colocación de Pearson LC3 – TOM20. Para comparaciones se realizó una prueba de ANOVA de una vía seguido de la prueba de contrastes *T* de Bonferroni para comparaciones múltiples. Asteriscos indican diferencias significativas respecto a las células CAD shControl de cada grupo de tratamiento y círculos indican diferencias significativas respecto a las células tratadas con el vehículo (\*<sup>o</sup>/ p< 0,05; \*\*<sup>oo</sup> p< 0,01; \*\*\*<sup>ooo</sup> p< 0,001). (Página siguiente).

Figura 6.7 (continuación)





Para verificar si la tendencia a la disminución en el coeficiente de colocación de Pearson entre LC3 y TOM20, que se observó en las células CAD shPINK1 y CAD shParkin (véase figura 6.7 G) luego del tratamiento con C2C, estaba asociada a una alteración en la respuesta mitofágica, independientemente de cambios en la expresión de LC3 o TOM20. Se decidió evaluar la colocación entre LC3 fusionada con EGFP y el marcador mitocondrial *Mitotracker red*. Este abordaje metodológico permitió observar que las células CAD shPINK1 y CAD shParkin, presentaron una menor área de colocación EGFP-LC3 con *Mitotracker red* que las células CAD shControl luego de la inducción de AFG por DN. Tal disminución fue estadísticamente significativa luego del tratamiento C2C ( $p < 0,001$ ) (véase figura 6.6 G).

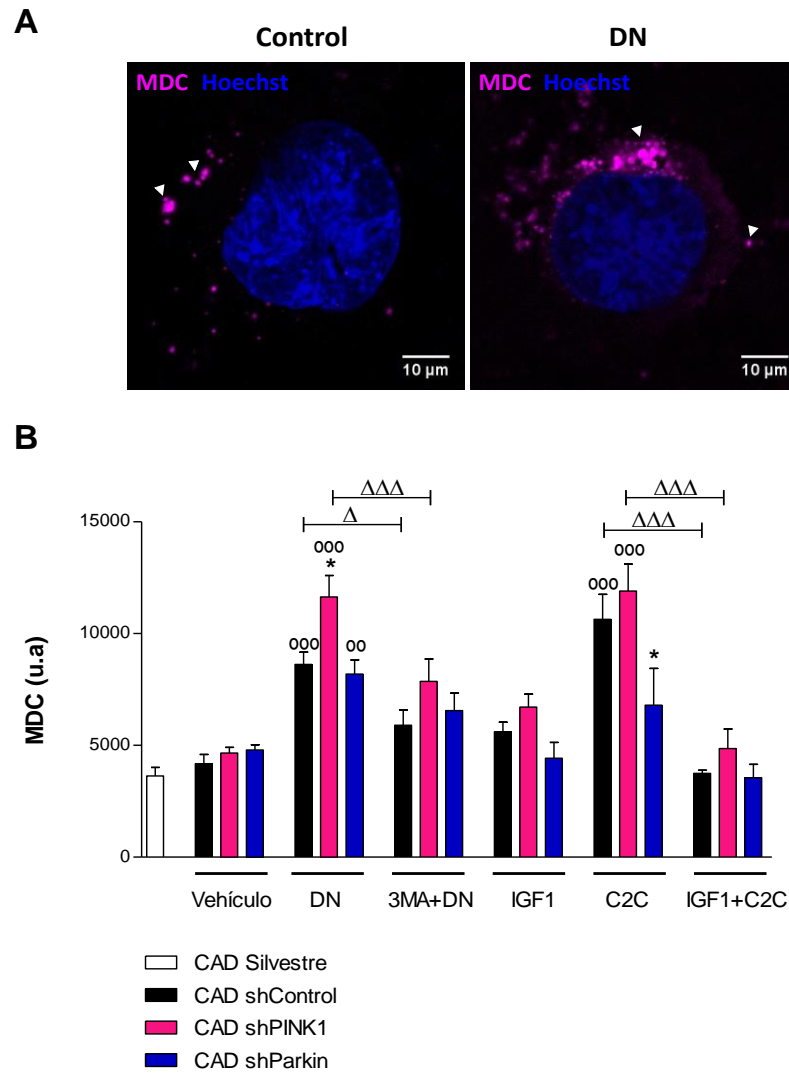
En conclusión, el silenciamiento de PINK1 o Parkin afectó el marcaje de las mitocondrias con la proteína LC3, lo que permitió inferir que disminuyó la mitofagia inducida por C2C.

### **6.8.3 El silenciamiento de PINK1 o Parkin disminuyó la degradación lisosomal de los autofagosomas**

Con el fin de determinar si el silenciamiento de los genes PINK1 o Parkin afectaba la degradación de los autofagosomas, inicialmente se marcaron autofagolisosomas con MDC (véase figura 6.8 A). Se observó que las células CAD shControl, shPINK1 y shParkin, incrementaron significativamente el marcaje de vesículas autofágicas luego de 6 horas de DN, en comparación con las células tratadas con vehículo ( $p < 0,001$ ); adicionalmente, como se esperaba, el pre-tratamiento con 3MA (un inhibidor de PI3K) inhibió el marcaje de vesículas autofágicas luego de la DN. Por otro lado, el tratamiento con C2C indujo un incremento en el marcaje con MDC en las células CAD shControl y shPINK1; sin embargo, las células CAD shParkin no mostraron un aumento en el marcaje. El pre-tratamiento con IGF1 inhibió la respuesta de autofagia a C2C (véase figura 6.8 B).

Aun cuando MDC inicialmente fue caracterizado como un marcador específico de autofagolisosomas [599], se ha reportado que también puede marcar autofagosomas [602], por lo cual fue necesario emplear una metodología más específica para evaluar la inducción y degradación lisosomal y se utilizó la expresión de LC3 conjugada con dos proteínas fluorescentes (GFP y RFP) [198].

Los autofagosomas se observaron como vesículas amarillas que indicaron un marcaje conjunto de GFP y RFP, mientras que los autofagolisosomas, se observaron únicamente como puntos de color rojo, ya que la GFP es sensible a pH ácido y se pierde la fluorescencia verde (véase figura 6.9 A, B). Se contaron puntos amarillos, puntos rojos y se calculó el total de puntos por célula (véase anexo M).



**Figura 6.8 Efecto del silenciamiento de PINK1 o Parkin sobre el marcaje de compartimentos ácidos con MDC**

**(A)** Microfotografías representativas de células CAD shControl. (Control) células cultivadas en medio suplementado con 10% de SFB. (DN) Deprivación de nutrientes, células cultivadas en HBSS durante 3 horas. Los compartimentos ácidos fueron marcados con MDC, y los núcleos con *Hoescht*. **(B)** Incorporación de MDC en células CAD silvestres en medio de diferenciación, CAD shControl, CAD shPINK1 y CAD shParkin. Vehículo: DMSO 0,1 %v/v por 6 h. DN: HBSS por 6 h. 3MA+DN: pre-tratamiento con 3MA (20 mM) por 3 h, seguido de 6 h de DN. IGF1: IGF1 (100 ng/ml) por 6 h. C2C: C2C (25 μM) por 6 h. IGF1+C2C: pre-tratamiento con IGF1 (100 ng/ml) por 30 min, seguido de 6 h de C2C (25 μM). Anova de dos vías (tipo de célula:  $p < 0,0001$ ; tratamiento:  $p < 0,0001$ , interacción  $p < 0,0001$ ). Los datos son medias  $\pm$  SEM de la intensidad de fluorescencia de MDC corregida según la cantidad de células (u.a: unidades arbitrarias) de mínimo 9 réplicas de dos experimentos independientes. Para comparaciones múltiples se aplicó la prueba de contrastes *T* de Bonferroni. (\*) Indican diferencias significativas respecto a las células CAD shControl de cada tratamiento. (°) Indican diferencias significativas respecto a las células tratadas con el vehículo. (Δ) Indican diferencias significativas respecto a las células shPINK. (\* $\Delta$ /  $p < 0,05$ ; \*\*/ $^{\circ}\Delta$   $p < 0,01$ ; \*\*\*/ $^{\circ\circ\circ}/\Delta\Delta\Delta$   $p < 0,001$ ).

**Figura 6.9 El silenciamiento de PINK1 o Parkin disminuyó la degradación lisosomal de los autofagosomas y este flujo fue recuperado por la sobre-expresión de Parkin**

Las células fueron transfectadas transitoriamente para la expresión de RFP-GFP-LC3 y/o para la sobre-expresión de Parkin silvestre, **(A)** microfotografías representativas de células cultivadas en medio de diferenciación **(B)** o bajo condiciones de privación de nutrientes, durante 6 horas. Agregados verdes de GFP-LC3 indican autofagosomas, agregados rojos RFP-LC3 indican autofagolisosomas, en amarillo se muestra el *merge* rojo-verde, las puntas de flecha en blanco, muestran autofagolisosomas con un aumento x4. **(C)** Indica el número total de vesículas autofágicas por célula. **(D)** Número de autofagosomas por célula. **(E)** Número de autofagolisosomas por célula. **(F)** Tasa de degradación de autofagosomas. **(G)** Verificación de la sobre-expresión de Parkin por *Western blot*. Los datos representan medias n=30 de 3 experimentos independientes. **(E)** *Western blot* representativo de la verificación de la sobre-expresión de Parkin. Anova de 2 vías. Para comparaciones múltiples se aplicó la prueba de contrastes T de Bonferroni. (\*) Indican diferencias significativas respecto a las células CAD shControl de cada tratamiento. (°) Indican diferencias significativas respecto a las células tratadas con el vehículo. (\*/ $\Delta$ / p < 0,05; \*\*/ $^{\circ\circ}$ / $\Delta\Delta$  p < 0,01; \*\*\*/ $^{\circ\circ\circ}$ / $\Delta\Delta\Delta$  p < 0,001).

Figura 6.9 (Continuación)

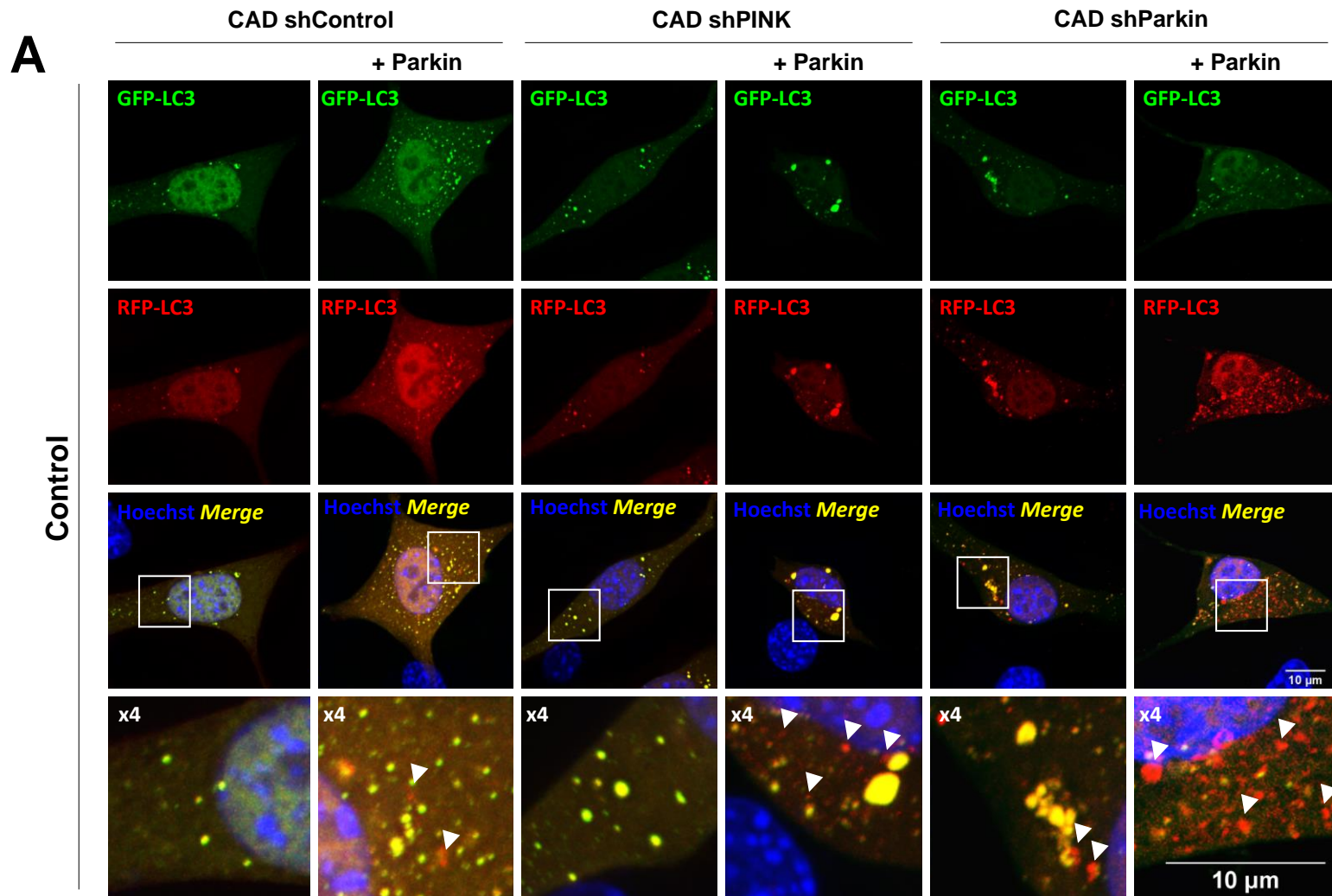


Figura 6.9 (Continuación)

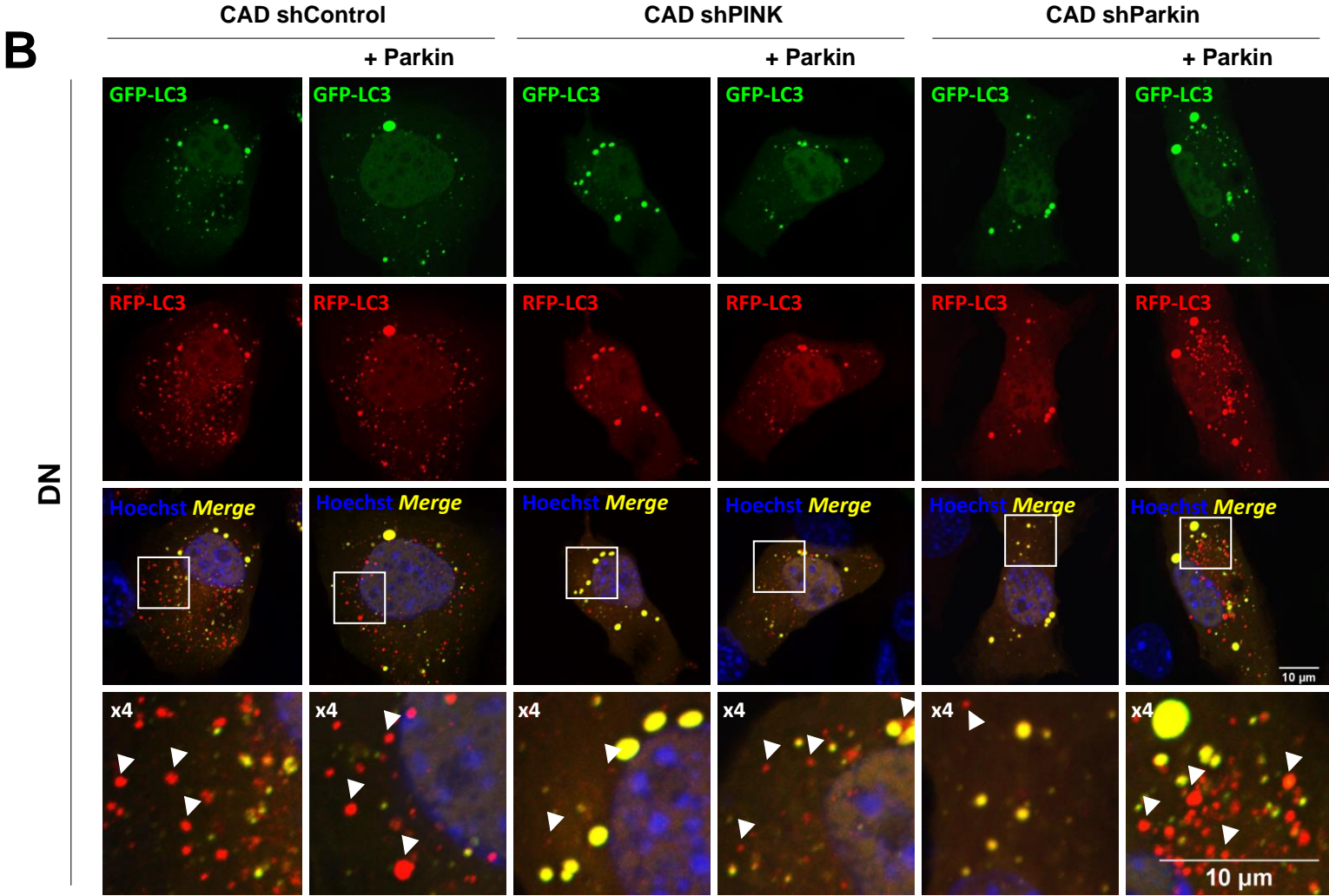
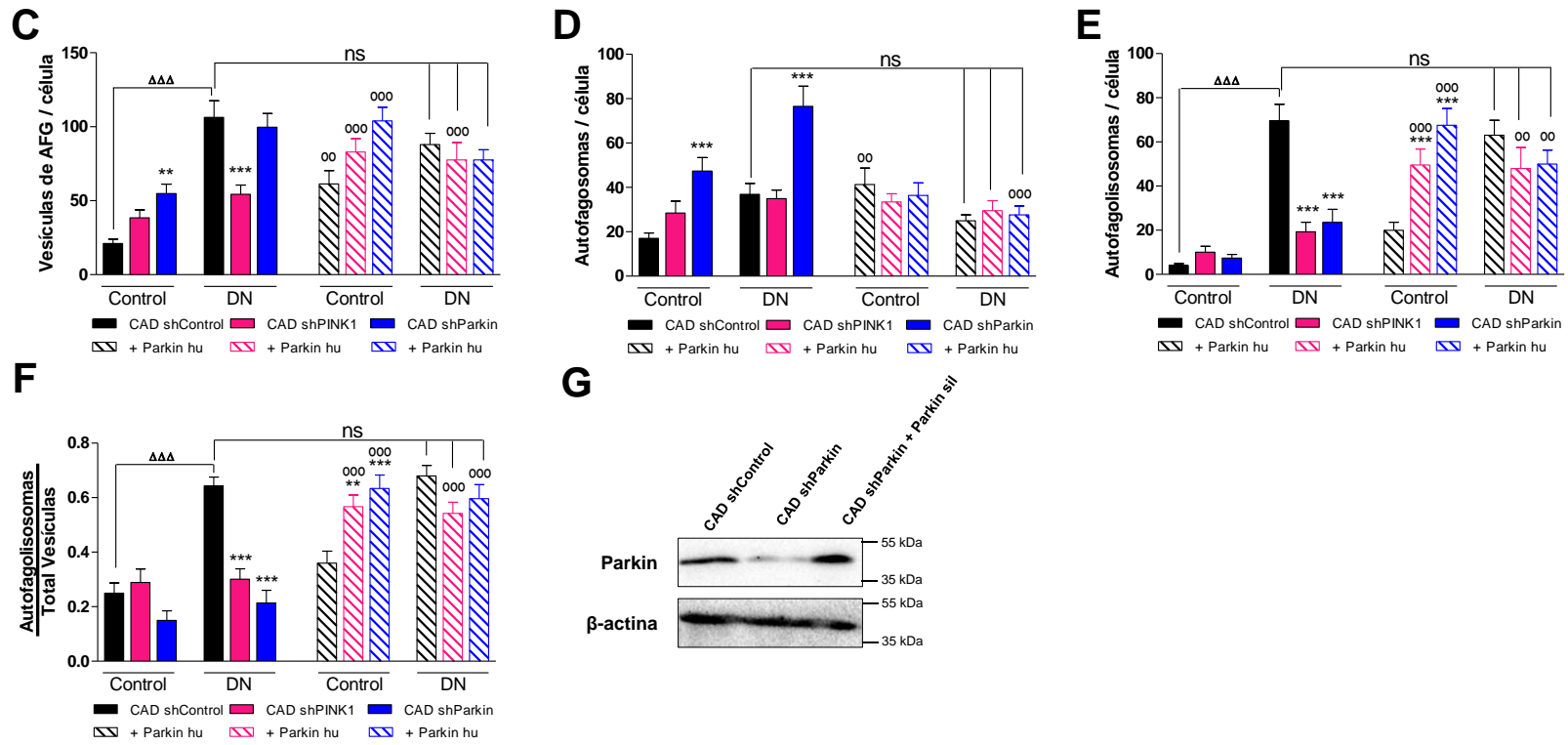


Figura 6.9 (Continuación)



## Capítulo 6: Autofagia

Inicialmente se contaron el total de vesículas de AFG, que correspondieron a la suma de autofagosomas y autofagolisosomas, el proceso de AFG fue inducido por DN. Las células CAD shPINK1, no mostraron diferencias significativas respecto a las CAD shControl en la condición control, y al igual que lo observado en el experimento con RGFP-LC3 (véase figura 6.6 E) las CAD shPINK1 no incrementaron el número de vesículas luego de la DN (véanse barras rellenas en figura 6.9 C). Esto indicó una alteración del proceso normal de AFG, que pudo deberse a alteraciones en la formación de las vesículas o en las vías de señalización que regulan este proceso. Por otro lado, las células CAD shParkin presentaron mayor número de vesículas que las CAD shControl en presencia de nutrientes (condición control de cultivo); sin embargo, en la condición de DN no se observaron diferencias significativas con las CAD shControl (véanse barras rellenas en figura 6.9 C).

Para conocer la fuente de la variación en el número total de vesículas que se observó en las células CAD shPINK1 y CAD shParkin, se realizó un conteo discriminado entre autofagosomas y autofagolisosomas. No se observaron diferencias estadísticamente significativas respecto al número de autofagosomas entre las células CAD shPINK1 y las CAD shControl, pero se apreció una tendencia al incremento. Por otra parte, se observó que las células CAD shParkin tenían más cantidad de autofagosomas que las células CAD shControl tanto en condiciones control ( $p < 0,001$ ) como luego de la inducción de AFG por DN ( $p < 0,001$ ) (véanse barras rellenas en figura 6.9 D). En cuanto al número de autofagolisosomas, se observó que tanto las células CAD shPINK1 como las CAD shParkin presentaron un número significativamente menor de autofagolisosomas por célula luego de la DN (véanse barras rellenas en figura 6.9 E).

Con el fin de conocer que tan efectiva era de degradación de los autofagosomas, independientemente de la variación observada en el número total de vesículas, se calculó la relación entre el número de autofagolisosomas y el número total de vesículas en cada tipo celular. El valor 1, indicó que el total de autofagosomas maduró y se fusionó con lisosomas, por lo cual, valores cercanos a 1 mostraron que el proceso de autofagia se completó satisfactoriamente y valores menores a 1 señalaron que la etapa final del proceso de AFG fue menos eficiente. En este sentido se observó que luego de la inducción de AFG por DN las células CAD shPINK1 y CAD shParkin mostraron una tasa de degradación significativamente menor que la de las células CAD shControl ( $p < 0,001$ ) (véanse barras rellenas en figura 6.9 F). Es decir el silenciamiento de PINK1 o Parkin afectó la degradación lisosomal de los autofagosomas.

Teniendo en cuenta que PINK1 y Parkin actúan en una vía de señalización común, donde Parkin se encuentra corriente abajo de PINK1 [603, 604] y es capaz de rescatar alteraciones mitocondriales ocasionadas por la disfunción o ausencia de PINK1 [605, 134], se decidió evaluar si la sobre-expresión de Parkin humano (Parkin hu) en las células CAD shPINK1 y CAD shParkin corregía el defecto observado. Se observó que la sobre-expresión de Parkin incrementó significativamente el número de vesículas de AFG en

condiciones control (véanse barras con tramas en figura 6.9 C). Adicionalmente en las células CAD shPINK1, la sobre-expresión de Parkin incrementó el número de vesículas de AFG luego de la inducción por DN al mismo nivel que las células CAD shControl (véanse barras con tramas en figura 6.9 C),

Como se describió anteriormente, el silenciamiento de Parkin indujo un incremento significativo en el número de autofagosomas, tanto en condiciones normales como bajo DN, este incremento fue contrarrestado por la sobre-expresión de Parkin (véanse barras con tramas en figura 6.9 D). Por otra parte la sobre-expresión de Parkin en las células silenciadas para PINK1 o Parkin, incrementó el número de autofagolisosomas luego de la inducción de autofagia por DN, al mismo nivel que las células CAD shControl (véanse barras con tramas en figura 6.9 E).

Teniendo en cuenta que la sobre-expresión de Parkin normalizó la tasa de degradación lisosomal de los autofagosomas, luego de un estímulo autofágico como lo fue la privación de nutrientes (véanse barras con tramas en figura 6.9 F), se puede concluir que la función de PINK1 en la autofagia es mediada (al menos en parte) por Parkin.

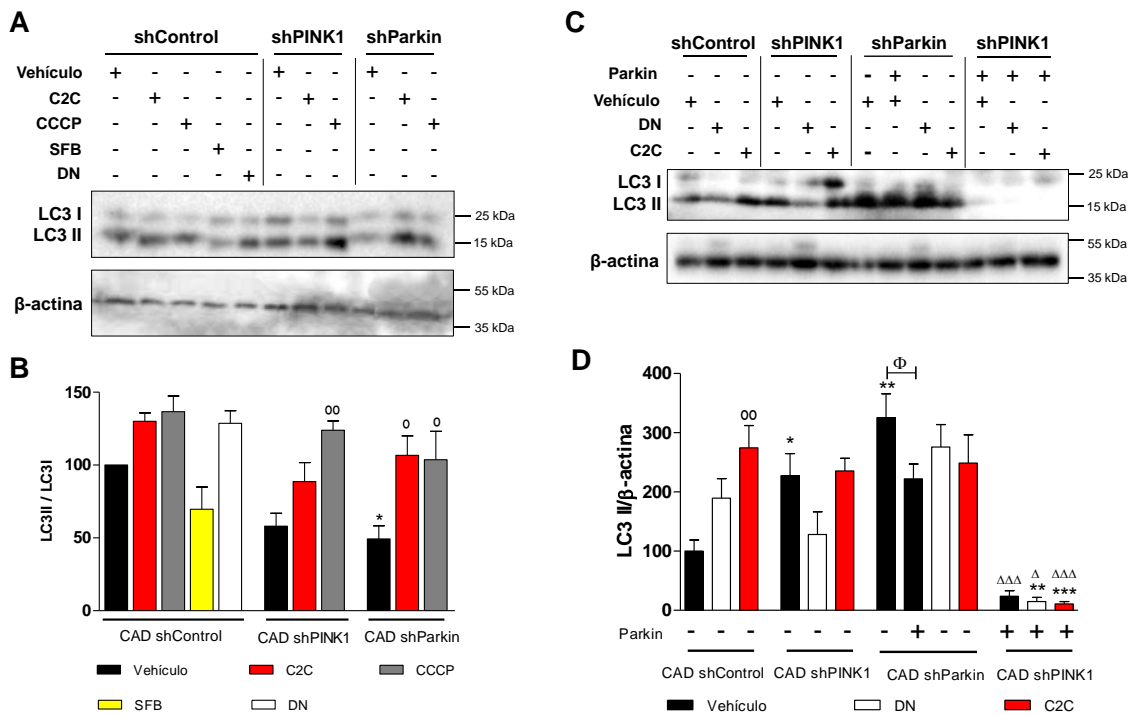
#### **6.8.4 Efecto del silenciamiento de PINK1 o Parkin sobre la conversión de LC3-I a LC3-II**

La conversión de LC3-I a LC3-II es otro marcador de AFG que indica formación de autofagosomas. La forma lipidada de LC3, llamada LC3-II, tiene una movilidad electroforética más rápida que LC3-I, de forma tal que mediante SDS-PAGE y *western blot* se puede monitorear [606].

Se observó que las células CAD shPINK1 respondieron de forma similar a las células CAD shControl al incrementar la conversión a LC3-II cuando se trataron con CCCP o con C2C (véase figura 6.10 A y B). Con relación a las células CAD shParkin, se observaron niveles significativamente menores de la relación LC3-II/LC3-I ( $p < 0,05$ ) cuando se trataron con el vehículo; sin embargo, la respuesta al tratamiento con C2C o con CCCP fue similar a la respuesta observada en las células CAD shControl (véase figura 6.10 A y B).

Teniendo en cuenta que el incremento en LC3-II es usualmente mayor que la disminución en LC3-I posterior a la inducción de AFG, la comparación de la cantidad de LC3-II entre las muestras, probablemente sea un método más preciso al momento de evaluar AFG [606].





**Figura 6.10 El silenciamiento de PINK1 o Parkin incrementan los niveles de LC3-II.**

**(A)** *Western blot* representativo de LC3 y  $\beta$ -actina de células CAD shControl, CAD shParkin, luego de 6 horas de tratamiento con C2C (25  $\mu$ M) o durante 1 hora con CCCP. Control positivo de AFG: DN por 6 h. Control negativo de AFG: medio con 10 % de SFB por 6 h. **(B)** Densitometría de LC3-I/ LC3-II. Se realizó un Anova de una vía, para lo cual todos los datos fueron normalizados respecto a las células CAD shControl tratadas con vehículo y representan medias  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes. Para comparaciones múltiples se aplicó la prueba de contrastes *T* de Bonferroni. (\*) Indican diferencias significativas respecto a las células CAD shControl de cada tratamiento. (°) Indican diferencias significativas respecto a las células tratadas con el vehículo (\*°  $p < 0,05$ ; °°  $p < 0,01$ ). **(C)** *Western blot* representativo de LC3 y  $\beta$ -actina de células CAD shControl, CAD shPINK1, CAD shParkin, y CAD shPINK1 con sobre-expresión de Parkin, luego de 6 horas de cultivo en medio con vehículo (DMSO 0,1 %v/v), DN (HBSS), o C2C (25  $\mu$ M). **(D)** Densitometría de LC3-II/ $\beta$ -actina. Anova de dos vías (tipo de célula:  $p < 0,0001$ ; tratamiento:  $p = 0,0828$ ; interacción  $p = 0,0129$ ). Todos los datos fueron normalizados respecto a las células CAD shControl tratadas con vehículo y representan medias  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes. Para comparaciones múltiples se aplicó la prueba de contrastes *T* de Bonferroni. (\*) Indican diferencias significativas respecto a las células CAD shControl de cada tratamiento. (°) Indican diferencias significativas respecto a las células tratadas con el vehículo. (Δ) Indican diferencias significativas respecto a las células shPINK. (\*°/Δ°  $p < 0,05$ ; \*\*/°°/ΔΔ  $p < 0,01$ ; \*\*\*/°°°/ΔΔΔ  $p < 0,001$ ).

Por esto se evaluaron los niveles de LC3-II en un contexto neurotóxico y de DN, en el que se sobre-expresó Parkin. Se observó que las células silenciadas para PINK1 y Parkin mostraron valores de LC3-II significativamente mayores que las células control ( $p < 0,05$  y  $p < 0,01$  respectivamente) cuando fueron tratadas con el vehículo (véase figura 6.10 C y D). Sin embargo, tanto las células CAD shPINK1 como las CAD shParkin no incrementaron

los niveles de LC3-II luego de la inducción por DN o el tratamiento con C2C (véase figura 6.10 C y D).

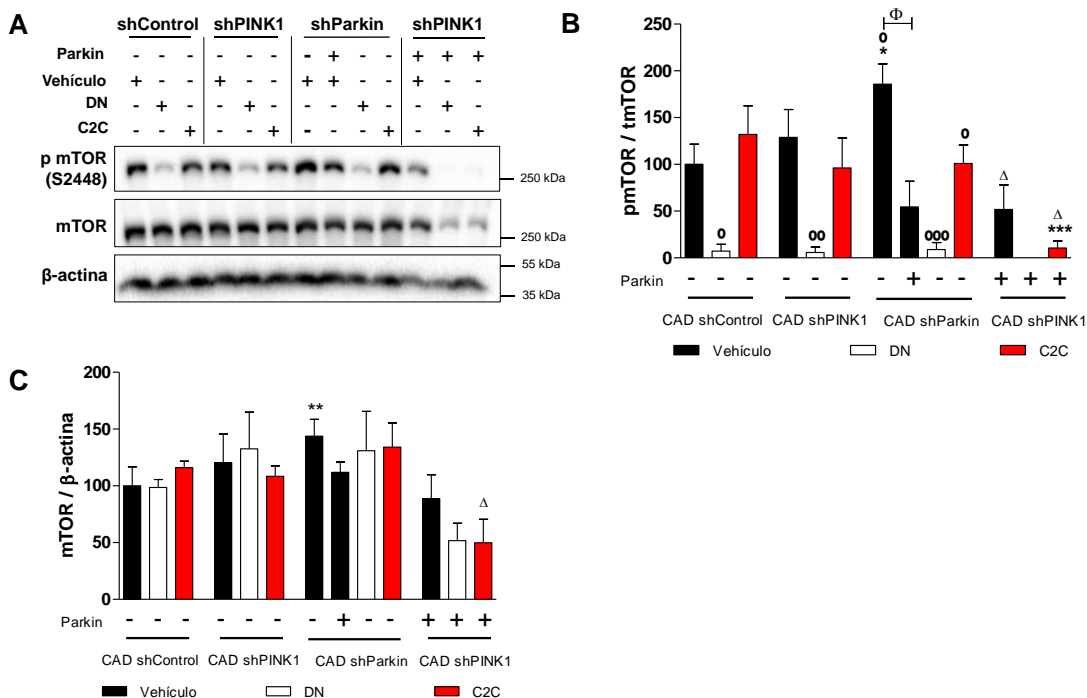
### **6.8.5 Efecto del silenciamiento de PINK1 o Parkin sobre la activación de mTOR, AMPK, AKT y ERK1/2 en un contexto de privación de nutrientes o neurotóxico.**

Teniendo en cuenta los siguientes aspectos: (1) el silenciamiento de PINK1 o Parkin, afectó la respuesta autofágica secundaria al tratamiento con C2C o a DN, haciendo a las células más susceptibles a AFG y a su vez inhibiendo la degradación lisosomal de los autofagosomas y (2) la sobre-expresión de Parkin en las células silenciadas para PINK1 o Parkin, permitió normalizar la tasa de degradación lisosomal de los autofagosomas. Se realizó la evaluación por *western blot* de algunas proteínas clave implicadas en la regulación de la vía autofágica. Para lo cual, células silenciadas para PINK1 o Parkin a las cuales se les sobre-expresó Parkin, se sometieron a condiciones de DN o al tratamiento con C2C (véase anexo N para verificación de niveles de Parkin).

#### ▪ mTOR

El anova de dos vías mostró que la activación de mTOR estuvo afectada tanto por el tipo de célula ( $p=0,0007$ ) como por el tratamiento ( $p<0,0001$ ) y además demostró la interacción de estos dos factores ( $p=0,027$ ). En este sentido, como era de esperarse, la DN disminuyó significativamente la forma activa de mTOR (pmTOR S2448), en las células CAD shControl, por otro lado el tratamiento con C2C no afectó los niveles de fosforilación de mTOR (véase figura 6.11 A y B). Esto indicó que en el modelo celular de neuronas CAD, la AFG secundaria al tratamiento con C2C fue independiente de la vía canónica que contempla la inhibición de mTOR.

Con respecto a las células CAD shPINK1 no se observaron diferencias significativas con las CAD shControl, bajo DN ni con C2C (véase figura 6.11 A y B). En cuanto a las células CAD shParkin, estas tuvieron mayores niveles de mTOR total y mTOR fosforilado que las CAD shControl cuando fueron tratadas con vehículo. Sin embargo, cuando éstas fueron sometidas a DN o a C2C no se observaron diferencias significativas respecto a las células CAD shControl (véase figura 6.11 A, B y C). Cuando a las células CAD shPINK1 se les sobre-expresó Parkin, se observó una disminución significativa en los niveles de mTOR total y mTOR fosforilado. Adicionalmente la restitución de Parkin en las células CAD shParkin se asoció a una disminución significativa ( $p<0,01$ ) de los niveles de mTOR total y fosforilado (véase figura 6.11 A, B y C). En conclusión, las alteraciones en el proceso de AFG asociadas al silenciamiento de PINK1 (en condiciones de DN o C2C), no se asociaron con la regulación de mTOR.

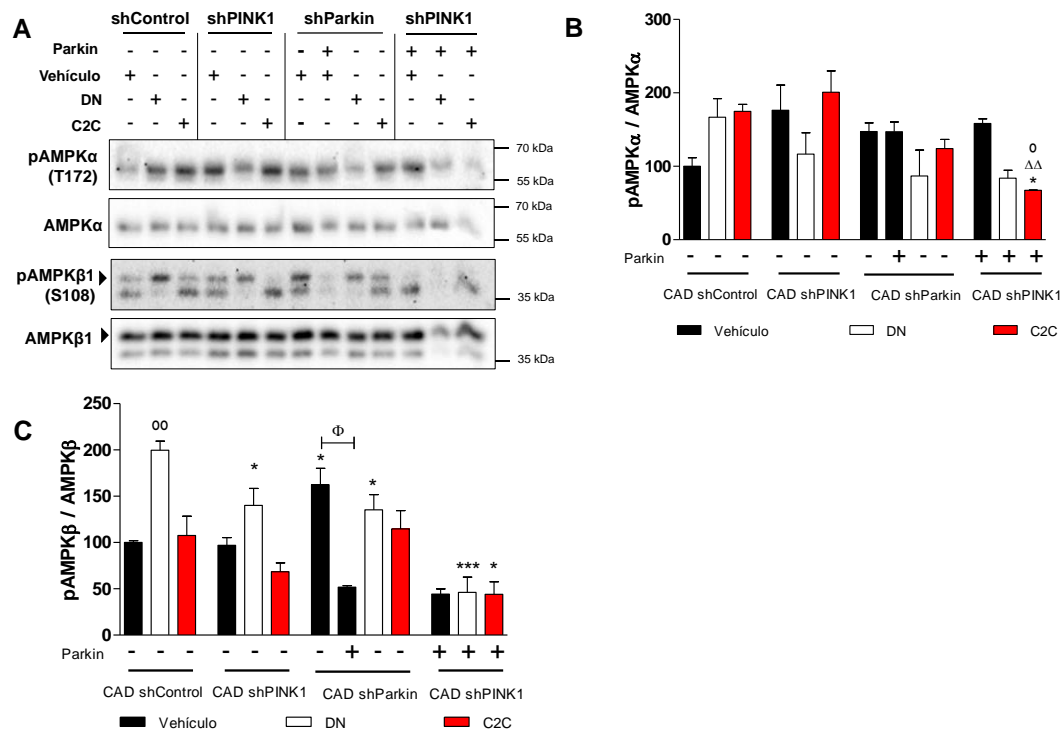


**Figura 6.11** Las alteraciones en el proceso de AFG asociadas al silenciamiento de PINK1 (en condiciones de DN o C2C), no se asociaron con la regulación de mTOR.

**(A)** *Western blot* representativo de LC3 y  $\beta$ -actina de células CAD shControl, CAD shPINK1, CAD shParkin, y CAD shPINK1 con sobre-expresión de Parkin, luego de 6 horas de cultivo en medio con vehículo (DMSO 0,1 %v/v), DN (HBSS), o C2C (25  $\mu$ M). **(B)** Densitometría de fosfo mTOR/ mTOR total. Anova de dos vías (tipo de célula:  $p=0,0007$ ; tratamiento:  $p<0,0001$ ; interacción  $p=0,0270$ ). **(C)** Densitometría de mTOR total/ $\beta$ -actina. Anova de dos vías (tipo de célula:  $p=0,0013$ ; tratamiento:  $p=0,8612$ ; interacción  $p=0,2600$ ). Todos los datos fueron normalizados respecto a las células CAD shControl tratadas con vehículo y representan medias  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes. Para comparaciones múltiples se aplicó la prueba de contrastes *T* de Bonferroni. (\*) Indican diferencias significativas respecto a las células CAD shControl de cada tratamiento. (o) Indican diferencias significativas respecto a las células tratadas con el vehículo. ( $\Delta$ ) Indican diferencias significativas respecto a las células shPINK. (\*/ $\Delta$ )  $p < 0,05$ ; \*\*/ $\Delta$   $p < 0,01$ ; \*\*\*/ $\Delta$   $p < 0,001$ .

## ▪ AMPK

Adicionalmente se estudiaron los niveles de activación de AMPK  $\alpha$  y  $\beta$ . Con respecto a AMPK $\alpha$ , el anova de dos vías demostró que el tipo de célula fue un factor influyente en la activación de esta proteína ( $p=0,0171$ ), también evidenció una interacción entre el tipo de célula y el tratamiento, que afectó la fosforilación de AMPK $\alpha$  ( $p=0,0169$ ). Es así que las células CAD shPINK1 mostraron niveles de fosforilación de AMPK $\alpha$  en condiciones control (tratadas con vehículo), mayores que las células CAD shControl y tan altos como cuando fueron tratadas con C2C (véase figura 6.12 A y B). Adicionalmente, las células CAD shParkin mostraron una tendencia a disminuir la activación de AMPK $\alpha$  luego de la DN (véase figura 6.12 A y B).



**Figura 6.12 La sobre-expresión de Parkin se asoció con una inhibición de la activación de AMPK $\alpha$  en las células silenciadas para PINK1.**

(A) *Western blot* representativo de pAMPK $\alpha$  (T172), AMPK $\alpha$  total, pAMPK $\beta$ 1 (S108) y AMPK $\beta$ 1 total de células CAD shControl, CAD shPINK1, CAD shParkin, y CAD shPINK1 con sobre-expresión de Parkin, luego de 6 horas de cultivo en medio con vehículo (DMSO 0,1 %v/v), privación de nutrientes (DN = medio HBSS), o C2C (25  $\mu$ M). (B) Densitometría de pAMPK $\alpha$  (T172)/AMPK $\alpha$ . Anova de dos vías (tipo de célula:  $p=0,0171$ ; tratamiento:  $p=0,1061$ ; interacción  $p=0,0169$ ). (C) Densitometría de pAMPK $\beta$  (S108)/AMPK $\beta$ . Anova de dos vías (tipo de célula:  $p<0,0001$ ; tratamiento:  $p=0,0022$ ; interacción  $p=0,0143$ ). Todos los datos fueron normalizados respecto a las células CAD shControl tratadas con vehículo y representan medias  $\pm$  SEM de 2 experimentos independientes. Para comparaciones múltiples se aplicó la prueba de contrastes *T* de Bonferroni. (\*) Indican diferencias significativas respecto a las células CAD shControl de cada tratamiento. (°) Indican diferencias significativas respecto a las células tratadas con el vehículo. ( $\Delta$ ) Indican diferencias significativas respecto a las células shPINK1. (\*/ $\Delta$ / $\Phi$   $p < 0,05$ ; \*\*/ $\Phi$ / $\Delta\Delta$   $p < 0,01$ ; \*\*\*/ $\Phi$ / $\Delta\Delta\Delta$   $p < 0,001$ ).

La sobre-expresión de Parkin en las células CAD shPINK1 disminuyó significativamente la activación de AMPK $\alpha$  posterior al tratamiento con C2C con respecto a las células CAD shPINK1 y CAD shControl (véase figura 6.12 A y B). Concluyendo, el silenciamiento de PINK1 o Parkin afectó de forma significativa la activación de AMPK $\alpha$  luego de la DN o el tratamiento con C2C, y la sobre-expresión de Parkin se asoció con una inhibición de la activación de AMPK $\alpha$  en las células silenciadas para PINK1.

## Capítulo 6: Autofagia

Además, se evaluó la activación de AMPK $\beta$ , donde se observó que el tipo de célula ( $p < 0,0001$ ), el tratamiento ( $p = 0,0022$ ) y la interacción entre estos dos factores ( $p = 0,0143$ ) afectaron significativamente la activación de esta proteína. Se observó que en las células CAD shControl la DN indujo un incremento significativo de la forma fosforilada de AMPK $\beta$  ( $p < 0,01$ ) que no se observó cuando las células se trataron con vehículo o con C2C (véase figura 6.12 A y C).

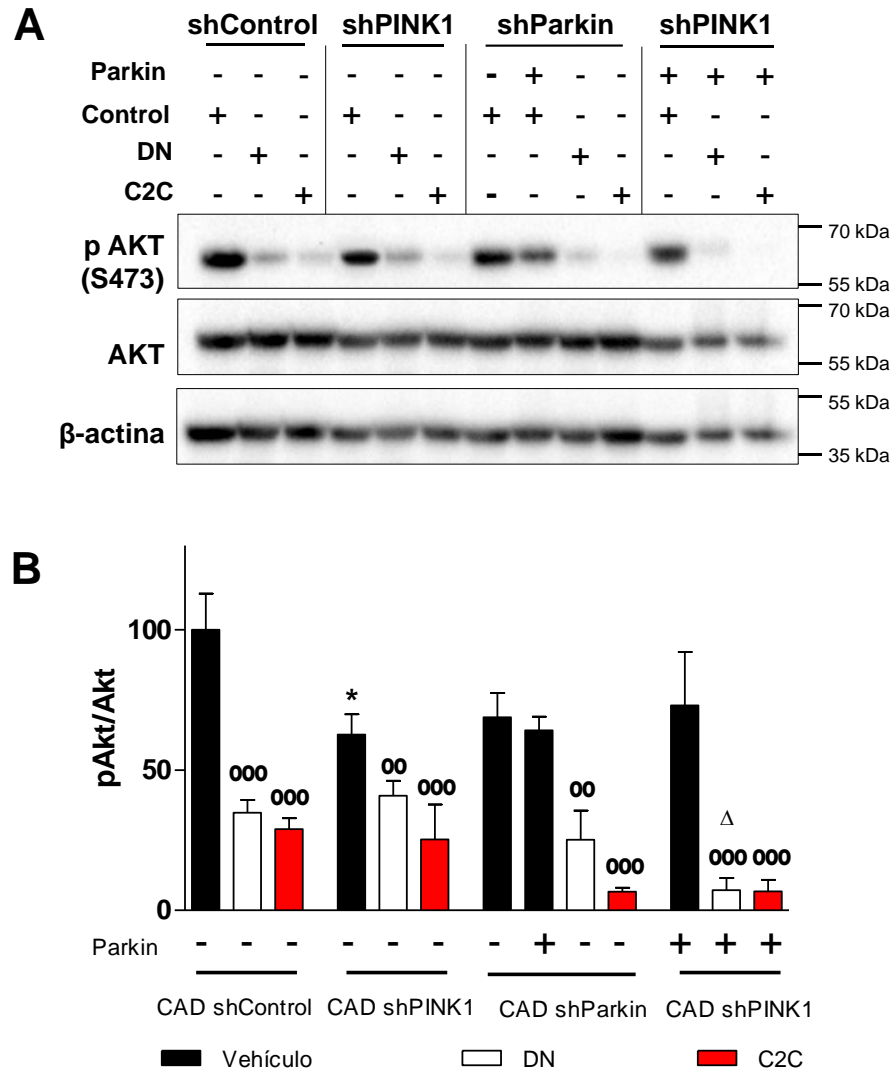
Con respecto a las células CAD shPINK1 se observó una menor activación de AMPK $\beta$  luego de la DN comparada con las CAD shControl ( $p < 0,05$ ), y no se observaron diferencias estadísticamente significativas con las CAD shControl cuando las células se incubaron con vehículo o con C2C. Adicionalmente, las células CAD shParkin mostraron mayor activación de AMPK $\beta$  que las CAD shControl cuando se cultivaron con el vehículo. Sin embargo, la activación disminuyó cuando se sometieron a DN, pero este hallazgo no fue significativo desde el punto de vista estadístico (véase figura 6.12 A y C). Por otra parte, la sobre-expresión de Parkin en las células CAD shParkin disminuyó la activación de AMPK $\beta$  al mismo nivel que en las células CAD shControl.

Adicionalmente la sobre-expresión de Parkin en las células silenciadas para PINK1 indujo una disminución general de la activación de AMPK $\beta$  tanto en aquellas células tratadas con vehículo, como en las que se sometieron a DN o a tratamiento con C2C (véase figura 6.12 A y C). Concluyendo, el silenciamiento de PINK1 inhibió la activación de AMPK $\beta$  en condiciones de DN y este efecto se vio potenciado por la sobre-expresión de Parkin.

### ▪ **AKT y ERK1/2**

Teniendo en cuenta los anteriores resultados y conociendo que PINK1 regula la activación de AKT y ERK (véase capítulo 4), junto al hecho de que tales proteínas regulan la autofagia [607-609] se decidió evaluar la activación de AKT y ERK1/2 bajo DN o tratamiento con C2C.

Se observó que tanto la DN como el tratamiento con C2C disminuyeron significativamente los niveles de AKT fosforilado en las células CAD shControl, CAD shPINK1 y CAD shParkin (Anova, efecto del tratamiento  $p < 0,0001$ ). Adicionalmente el anova de dos vías demostró que el tipo de célula influyó sobre la activación de AKT, independientemente del tratamiento (interacción  $p = 0,7933$ ) (véase figura 6.13 A y B). Esto indicó que los cambios observados en el proceso de AFG asociados al silenciamiento de PINK1 o Parkin, no estuvieron relacionados con la vía de señalización de AKT.



**Figura 6.13 La DN y el tratamiento con C2C disminuyen la fosforilación de AKT**

**(A)** Western blot representativo de pAKT(S473), AKT total y  $\beta$ -actina de células CAD shControl, CAD shPINK1, CAD shParkin, y CAD shPINK1 con sobre-expresión de Parkin, luego de 6 horas de cultivo en medio con vehículo (DMSO 0,1 %v/v), DN (HBSS), o C2C (25  $\mu$ M). **(B)** Densitometría de pAKT/AKT. Anova de dos vías (tipo de célula:  $p=0,0041$ ; tratamiento:  $p<0,0001$ ; interacción  $p=0,7933$ ). Todos los datos fueron normalizados respecto a las células CAD shControl tratadas con vehículo y representan medias  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes. Para comparaciones múltiples se aplicó la prueba de contrastes T de Bonferroni. (\*) Indican diferencias significativas respecto a las células CAD shControl de cada tratamiento. (°) Indican diferencias significativas respecto a las células tratadas con el vehículo. ( $\Delta$ ) Indican diferencias significativas respecto a las células shPINK. (\*/ $\Delta$   $p < 0,05$ ; \*\*/ $^{\circ}$ / $\Delta\Delta$   $p < 0,01$ ; \*\*\*/ $^{\circ\circ}$ / $\Delta\Delta\Delta$   $p < 0,001$ ).

## Capítulo 6: Autofagia

Respecto a ERK, el anova de dos vías mostró que la activación de la isoforma ERK1 y ERK2 se vio afectada por el tipo de tratamiento y por la interacción de los factores tipo de tratamiento y tipo de célula (véase leyenda figura 6.14). En este sentido se observó que la DN indujo un incremento significativo en la fosforilación de ERK1/2 en todos los tipos celulares, siendo mayor en las células silenciadas para PINK1. Sin embargo, la sobre-expresión de Parkin en estas células, disminuyó significativamente la activación de ERK1/2 bajo DN (véase figura 6.14 A y B). Por otro lado el tratamiento con C2C, disminuyó la activación de ERK1/2 aunque ésta, no fue estadísticamente significativa. Además, la restitución de Parkin en las CAD shParkin incrementó significativamente los niveles de pERK2 con respecto a las células CAD shParkin ( $p < 0,05$ ).

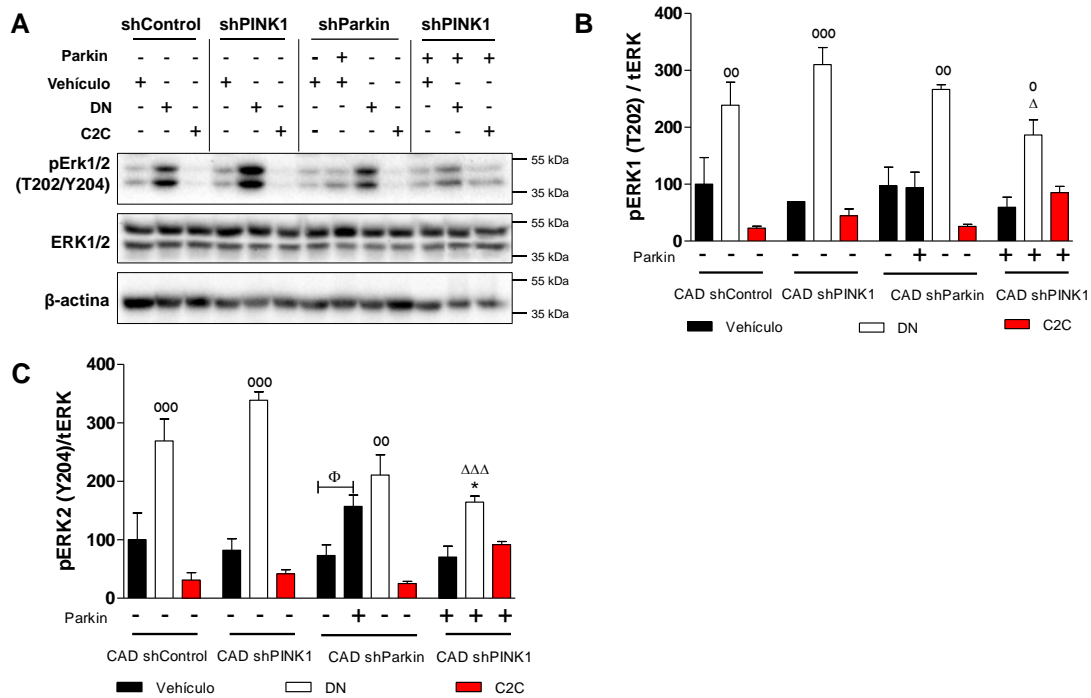
Finalmente para conocer si las alteraciones del proceso de AFG, observadas en las células silenciadas para PINK1 o Parkin inducían muerte celular, se midió la liberación de LDH en condiciones de DN y con tratamiento con C2C. Las células CAD shPINK1 liberaron mayor cantidad de LDH que las CAD shControl en condiciones de DN ( $p < 0,01$ ). Cuando las células se trataron con C2C, las CAD shPINK1 también mostraron un incremento en la liberación de LDH en comparación con las CAD shControl, sin embargo este cambio no fue significativo desde el punto de vista estadístico (véase figura 6.15). Lo anterior fue revertido por la sobre-expresión de Parkin en las células CAD shPINK1 (véase figura 6.15).

Por otra parte las células CAD shParkin no mostraron diferencias significativas en cuanto a la liberación de LDH cuando se sometieron a DN, sin embargo, éstas células mostraron una menor liberación de LDH cuando se trataron con C2C, en comparación con las células shControl (véase figura 6.15).

## 6.9 Discusión

La AFG es un proceso sensible a la concentración de aminoácidos y depende de la disponibilidad de ATP, ya que requiere energía para el secuestro del material a degradar, la fusión con el lisosoma y la posterior proteólisis. Este proceso es particularmente importante en las neuronas maduras, que por tratarse de células postmitóticas, tienen tiempos de vida útil muy largos y deben asegurar la disponibilidad energética, así como diligenciar la degradación de organelos defectuosos, para asegurar su supervivencia. De esta manera la AFG en las neuronas, desempeña principalmente un papel neuroprotector.

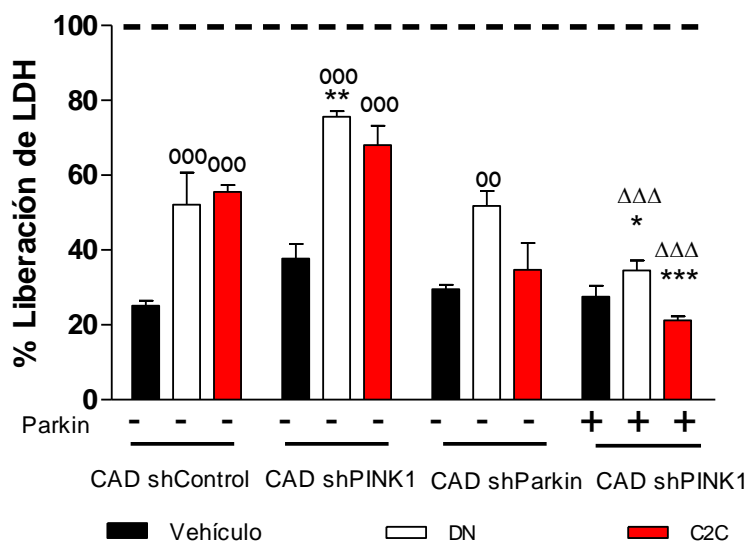
Alteraciones de las vías que regulan la AFG han sido observadas en los cerebros de pacientes con EP y en modelos animales, en los que se ha detectado acumulación de vacuolas autofágicas en la SNpc (revisado en [610, 611]). Otros estudios, demostraron una asociación entre moléculas de señalización de AFG y la enfermedad de cuerpos de Lewy [612].



**Figura 6.14** La DN incrementa la fosforilación de AKT mientras que el tratamiento con C2C la disminuye.

**(A)** *Western blot* representativo de pERK1/2(T202/Y204), ERK1/2 total y  $\beta$ -actina de células CAD shControl, CAD shPINK1, CAD shParkin, y CAD shPINK1 con sobre-expresión de Parkin, luego de 6 horas de cultivo en medio con vehículo (DMSO 0,1 %v/v), DN (HBSS), o C2C (25  $\mu$ M). **(B)** Densitometría de pERK1(T202)/ERK. Anova de dos vías (tipo de célula:  $p=0,4808$ ; tratamiento:  $p<0,0001$ ; interacción  $p=0,0584$ ). **(C)** Densitometría de pERK2 (Y204)/ERK. Anova de dos vías (tipo de célula:  $p=0,0650$ ; tratamiento:  $p<0,0001$ ; interacción  $p=0,0100$ ). Todos los datos fueron normalizados respecto a las células CAD shControl tratadas con vehículo y representan medias  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes. Para comparaciones múltiples se aplicó la prueba de contrastes *T* de Bonferroni. (\*) Indican diferencias significativas respecto a las células CAD shControl de cada tratamiento. (°) Indican diferencias significativas respecto a las células tratadas con el vehículo. ( $\Delta$ ) Indican diferencias significativas respecto a las células shPINK1. (\*/ $\Delta$ / $\Phi$   $p < 0,05$ ; \*\*/ $\Phi$ / $\Delta$   $p < 0,01$ ; \*\*\*/ $\Phi$ / $\Delta$   $p < 0,001$ ).





**Figura 6.15 La sobreexpresión de Parkin disminuye la muerte de celular en las células silenciadas para PINK1 luego de DN y C2C**

Gráfica del porcentaje de liberación de LDH. Los datos fueron normalizados según el 100 % de liberación de LDH al medio. Células CAD shControl, CAD shPINK1, CAD shParkin, y CAD shPINK1 con sobre-expresión de Parkin, luego de 6 horas de cultivo en medio con vehículo (DMSO 0,1 %v/v), DN (HBSS), o C2C (25  $\mu$ M). Anova de dos vías (tipo de célula:  $p < 0,0001$ ; tratamiento:  $p < 0,0001$ ; interacción  $p = 0,001$ ). Para comparaciones múltiples se aplicó la prueba de contrastes T de Bonferroni. (\*) Indican diferencias significativas respecto a las células CAD shControl de cada tratamiento. (°) Indican diferencias significativas respecto a las células tratadas con el vehículo. (Δ) Indican diferencias significativas respecto a las células shPINK. (\* / Δ / °  $p < 0,05$ ; \*\* / °° / ΔΔ  $p < 0,01$ ; \*\*\* / °°° / ΔΔΔ  $p < 0,001$ ).

Adicionalmente, la delección de genes esenciales para la AFG predispone a que modelos murinos desarrollen una patología tipo EP [613]. Lo que aún no está claro, es si las alteraciones en el proceso de AFG son la causa o la consecuencia de la enfermedad; en este sentido, mutaciones en genes determinísticos en el desarrollo de Parkinson, se asocian a diferentes alteraciones del proceso de AFG. Mutaciones en SNCA y UCHL1 se caracterizan por desempeñar un papel negativo en la AFG, mientras que mutaciones en PINK1, Parkin y ATP13A2 por un papel positivo; otros como DJ-1 y LRRK2 parecen tener un papel dual en este proceso (revisado en [610]). Todo esto confirma que defectos en la vía de degradación autofágica se correlacionan con neurodegeneración.

Actualmente se conoce la relación de PINK1 y Parkin en la autofagia mitocondrial. En mitocondrias disfuncionales, PINK1 permanece en la membrana externa y recluta a Parkin para que ubiquitine proteínas mitocondriales, lo que constituye una etiqueta para que la mitocondria dañada se degrade vía lisosomal por AFG. Con el desarrollo de este trabajo se evidenció que el silenciamiento de PINK1 o de Parkin no solo afecta el proceso de mitofagia, sino también el proceso general de AFG.

Aun cuando los resultados del flujo de AFG, revelaron una deficiencia en la degradación de los autofagosomas en las células silenciadas para PINK1 (véase figura 6.10), nosotros creemos, que estas células también tienen más activa la vía autofágica; es decir, que el incremento en la conversión de LC3-I a LC3-II (véase figura 6.11 C y D), el número de células con autofagosomas, así como, el número de estos autofagosomas dentro de cada célula (véase figura 6.7 D y E), no es únicamente un reflejo del bloqueo en la degradación lisosomal de los autofagosomas, ya que estos cambios estuvieron asociados a la inhibición de la fosforilación de AKT y al incremento en la activación de AMPK $\alpha$ . Adicionalmente, nosotros observamos que el silenciamiento de PINK1 redujo la localización de HK-1 en las mitocondrias y estuvo asociado a una disminución en la actividad enzimática de la HK-1 (véase anexo O). Además, previas investigaciones en nuestro grupo, han evidenciado que en células CAD, PINK1 regula de forma positiva los niveles de BCL2 en un contexto neurotóxico inducido por C2C [338], es decir que su silenciamiento puede estar asociado a una disminución de BCL2. Entonces, la disminución en los niveles de BCL2 y el aumento de la expresión de Beclin-1 inducido por C2C (al parecer por la activación de JNK y c-Jun) [194], posiblemente hace que en el modelo de CAD shPINK1, el incremento en la AFG se deba en parte a que se pierde la regulación negativa ejercida por BCL2 sobre Beclin-1 [614]. Igualmente un estudio realizado en células NM9D, demostró que el silenciamiento de PINK1 puede activar AFG parcialmente a través del incremento en la expresión de Beclin-1 [615].

Teniendo en cuenta las observaciones anteriores, y la mayor liberación de LDH en las células CAD shPINK1 (véase figura 6.16) se infirió que la AFG inducida por el silenciamiento de PINK1, está relacionada con un proceso de muerte celular, más que con un mecanismo de protección.

En nuestro caso, el incremento en la respuesta autofágica secundaria a C2C, observada en las células silenciadas para PINK1, no se correlacionó con un aumento en la mitofagia, es decir los autofagosomas no colocalizaron con mitocondrias (véase figura 6.7 G). Además no se observó un incremento en la colocalización entre LC3 y TOM20 luego del tratamiento con C2C o con CCCP (véase figura 6.8 G), es decir que en nuestro modelo, el silenciamiento de PINK1 disminuyó la respuesta de mitofagia, inducida por C2C.

En este sentido, aun cuando la función de PINK1 como reguladora positiva de la mitofagia es ampliamente conocida [119, 572, 388, 616], existen resultados contradictorios del efecto del silenciamiento de PINK1 sobre este proceso. Reportes como los de Dagda *et al* [347] y Cui *et al* [615], muestran un incremento en el recambio de mitocondrias dañadas cuando PINK1 fue silenciado. Por un lado Dagda propone que Parkin puede estar amplificando la respuesta al daño mitocondrial generado por la deficiencia de PINK1, mientras que Cui dice, que es el estrés oxidativo, producto de la apertura del poro de transición de la

## Capítulo 6: Autofagia

permeabilidad mitocondrial (cuando PINK1 está ausente), el evento responsable de la activación del complejo PI3KC3/Beclin-1 y posterior mitofagia. Nosotros observamos una tendencia al incremento de la colocalización LC3-TOM20 en las células silenciadas para PINK1 en la condición control (tratadas con el vehículo), pero este aumento no fue significativo desde el punto de vista estadístico. Es importante tener en cuenta que en estos dos estudios, no se evaluó el efecto del silenciamiento de PINK1, posterior a un tratamiento con un estresor celular o inductor de mitofagia, pero cuando se usa un estresor queda claro que existe mitofagia independiente de PINK1. Esto último también ha sido publicado recientemente por Kubli *et al.* [617].

De igual forma, hay reportes que mencionan que el silenciamiento de PINK o Parkin, reduce la mitofagia secundaria a estrés metabólico inducido por ácido palmítico (un ácido graso que se encuentra elevado en sujetos obesos con síndrome metabólico), lo cual produce una acumulación de fragmentos mitocondriales [618]. También se ha reportado que en cultivos de neuronas hipocampales de ratas *knock out* para PINK1, la respuesta mitofágica está disminuída [619]. Todo esto indicó que la mitofagia secundaria a alteraciones en la función PINK1 puede ser regulada por otros mecanismos independientes de PINK1; sin embargo, en nuestro modelo de estudio la mitofagia inducida por tóxicos mitocondriales o estresores celulares depende de la función de PINK1.

La deficiencia de PINK1 también afectó la respuesta autofágica secundaria a DN. Se observó que aun cuando AKT y mTOR estaban disminuidos significativamente, esta disminución no se correlacionó con un incremento en el número de autofagosomas o en la conversión de LC3-I a LC3-II, es decir, las células deficientes de PINK1, por alguna razón no conocida, no responden con AFG luego de la DN. Se debe tener en cuenta, que este tipo de AFG principalmente se asocia a un mecanismo de supervivencia. Es decir, estas células a pesar de que activan el mecanismo, no son capaces de ejecutar el proceso, lo cual las hace mucho más susceptibles a muerte en condiciones de disminución de nutrientes.

En conclusión, el silenciamiento de PINK1 aumentó la autofagia secundaria a C2C y disminuyó la autofagia secundaria a DN, y ambos eventos se relacionaron con mayor muerte celular.

Con respecto a la deficiencia en el proceso de degradación de autofagosomas, observado en las células silenciadas para PINK1, es posible sugerir una función de PINK1 regulando la fusión de membranas. Se conoce que la ausencia de PINK1 en ratones origina un bloqueo de la liberación de dopamina desde la vesículas sinápticas [620], y que este es un proceso mediado por proteínas SNARE y regulado por la unión de calcio a sinaptotagminas [621]; es decir, es un mecanismo similar al que regula la fusión del autofagosoma con el lisosoma (véase apartado 6.3.1 fusión con el lisosoma).

Por otro lado, existe una asociación entre PINK1 y la expresión y fosforilación de la V-ATPasa. En el 2015 Triplett *et al.* encontraron que ratones carentes de PINK1 tenían menores niveles de la subunidad V-ATPasaF, y menores niveles de fosforilación en la subunidad V-ATPasaA, el resultado y significado patológico de estos cambios no se conocen con exactitud, pero se sugiere que están asociados a una alteración en la acidificación de lisosomas lo cual conduce a una disfunción en la autofagia y neurodegeneración [130].

El hecho de que la sobre-expresión de Parkin en las células silenciadas para PINK1, recuperara la formación de los autofagolisosomas, indicó que posiblemente la función de PINK1 en este proceso es mediada por Parkin. La relación de Parkin con proteínas asociadas a la fusión de membranas es poco conocida. Existe sólo un reporte donde se demuestra que Parkin tiene como blanco la proteína sinaptotagmina XI, relacionada con el tráfico de vesículas sinápticas [622]. En este sentido, nuestros resultados abren la posibilidad de nuevos estudios asociados a las funciones de la vía PINK1-Parkin, como reguladora de proteínas implicadas en el tráfico vesicular o asociadas a la inhibición de la fusión autofagosoma-lisosoma.

Respecto a los eventos de señalización asociados al proceso de AFG se observó que en nuestro modelo de células CAD, la DN produjo disminución en la fosforilación de AKT y mTOR, activación de ERK1/2 y fosforilación de las subunidades alfa y beta de AMPK. Es decir, la vía canónica fue la responsable de la AFG observada en esta condición. Por otro lado, el tratamiento con C2C indujo desfosforilación de AKT sin alteración de la fosforilación de mTOR, desfosforilación de ERK1/2 e incremento en la activación de AMPK alfa, es decir, la AFG inducida por C2C en las células CAD fue independiente de mTOR, pero dependió de AKT y de AMPK.

Se conoce que la forma en la cual la ceramida induce AFG es diversa, por un lado activa la fosfatasa PP2A (del inglés *Protein phosphatase 2A*), lo cual bloquea la activación de AKT y suprime la inhibición de la AFG mediada por mTOR [188-190]; mientras que por otro lado, disminuye la expresión de transportadores de aminoácidos y de nutrientes, induciendo una condición de DN y llevando a AFG dependiente de AMPK [191-193]. Como se mencionó anteriormente, el tratamiento con C2C además potencia la expresión de Beclin-1, al parecer por la activación de JNK y c-Jun, un factor de transcripción que regula la expresión de Beclin1 [194] (revisado en [195] y referencias allí citadas). Otros hallazgos experimentales muestran que la ceramida de cadena larga (C18-Ceramida) puede localizarse en la MEM y actuar como un receptor de LC3-II e inducir mitofagia. Sin embargo, el mecanismo por el cual esta especie de ceramida se localiza sobre la mitocondria, es desconocido [196].

## Capítulo 6: Autofagia

---

Con respecto a las células silenciadas para Parkin no se evidenciaron diferencias respecto a las células CAD shControl en cuanto a la regulación molecular de la AFG secundaria a DN o tratamiento con C2C, en las proteínas incluídas en este trabajo. Esto indicó que la contribución de Parkin estuvo más relacionada con el paso final del proceso (fusión autofagosoma-lisosoma), que con el proceso canónico de inducción de la AFG. Sin embargo, su sobre-expresión en el modelo de CAD shPINK1 generó una disminución en los niveles totales de mTOR y por lo tanto en su activación. En este sentido recientemente se identificó a mTOR como una proteína blanco de ubiquitinación de Parkin [623]. Es así que la sobre-expresión de Parkin favoreció la degradación de mTOR. Es posible que este evento sea uno de los responsables de que la sobre-expresión de Parkin se relacione con una mayor tasa de degradación de los autofagosomas, teniendo en cuenta que la liberación de mTOR desde el lisosoma favorece la despolarización de la membrana lisosomal y así su fusión con los autofagosomas [534, 533]. Aunque las alteraciones en el proceso de AFG asociadas al silenciamiento de PINK1 fueron independientes de la regulación de mTOR, es posible que la sobre-expresión de Parkin revierta estos efectos al favorecer la degradación de mTOR.

### 6.10 Conclusiones

- El silenciamiento de PINK1 afecta la autofagia por DN.
- La vía PINK1-Parkin regula la mitofagia asociada a daño mitocondrial inducido por C2C en el modelo de células CAD.
- El silenciamiento de PINK1 incrementa la autofagia secundaria al tratamiento con C2C.
- PINK1 y Parkin participan en la degradación de los autofagosomas.
- El silenciamiento de Parkin interrumpe el flujo autofágico impidiendo la degradación lisosomal de los autofagosomas.
- La sobre-expresión de Parkin disminuye la muerte en las células silenciadas para PINK1 luego de deprivación de nutrientes y C2C.



---

## 7. Capítulo 7: Conclusiones generales y modelo propuesto

### 7.1 Conclusiones generales

La muerte neuronal relacionada con la deficiencia de PINK1 se asocia a:

- Inhibición de la vía de supervivencia PI3K/AKT.
- Fisión mitocondrial.
- Bloqueo de la degradación lisosomal de los autofagosomas.

La muerte neuronal relacionada con la deficiencia de Parkin se asocia a:

- Fisión mitocondrial.
- Bloqueo de la degradación lisosomal de los autofagosomas.

### 7.2 Modelo propuesto

La mayoría de los estudios de la fisiopatología de la EP son mitocondriocéntricos, y están sustentados por observaciones donde toxinas mitocondriales pueden causar parkinsonismo en humanos y modelos animales (revisado en [624-630] y referencias allí citadas). Teniendo en cuenta que la mitocondria representa el centro regulador de la homeostasis celular, la disfunción mitocondrial a nivel de dinámica, tráfico, mitofagia, entre otras, concluye en una disminución del potencial redox y por lo tanto un incremento del estrés oxidativo, así como, alteraciones en el metabolismo y la disponibilidad energética y desbalance en la regulación de los niveles de  $Ca^{+2}$  intracelular que finalmente potencian la muerte neuronal.

Con base en los resultados obtenidos en nuestro modelo celular, proponemos un mecanismo por el cual alteraciones en vías de supervivencia neuronal podrían ser la causa de la disfunción mitocondrial. En este sentido, creemos que la deficiencia de PINK1 se relaciona con una alteración en la transducción de señales de receptores tirosina quinasa asociados a viabilidad neuronal, como el IGF1R. Lo cual induce una disminución en la activación de la proteína AKT y HKI, generando pérdida del potencial de membrana

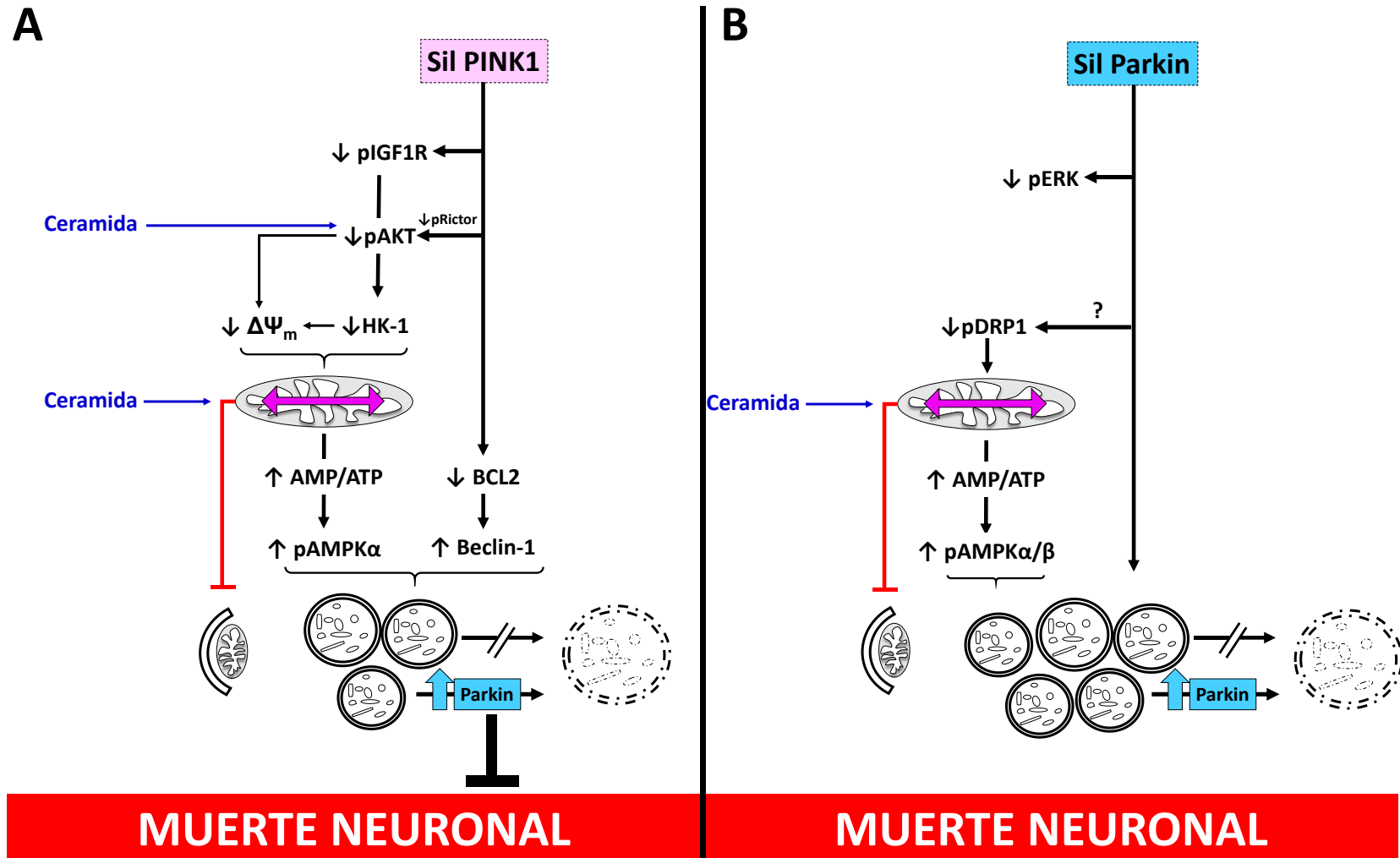
mitocondrial, incremento en el fraccionamiento de la red de mitocondrias y fallo en la mitofagia, estos factores conducen a una mayor susceptibilidad a neurotóxicos como la ceramida y finalmente promueven muerte neuronal (véase figura 7.1 A).

En el caso del silenciamiento de Parkin, creemos que la muerte celular observada se debe principalmente a una alteración en el proceso de degradación de los autofagosomas y a una disfunción en la mitofagia, ambos eventos se pueden asociar a una disminución en los niveles de ERK fosforilado. Además, la sobre-expresión de Parkin es capaz de recuperar el flujo normal de la autofagia, de tal forma que promueve la maduración de los autofagosomas para su posterior degradación, proceso que se encuentra inhibido en las células deficientes de PINK1 y Parkin. La restitución del flujo autofágico se asocia con una menor susceptibilidad a la muerte neuronal inducida por DN y ceramida en las células deficientes de PINK1 (véase figura 7.1 A y B).



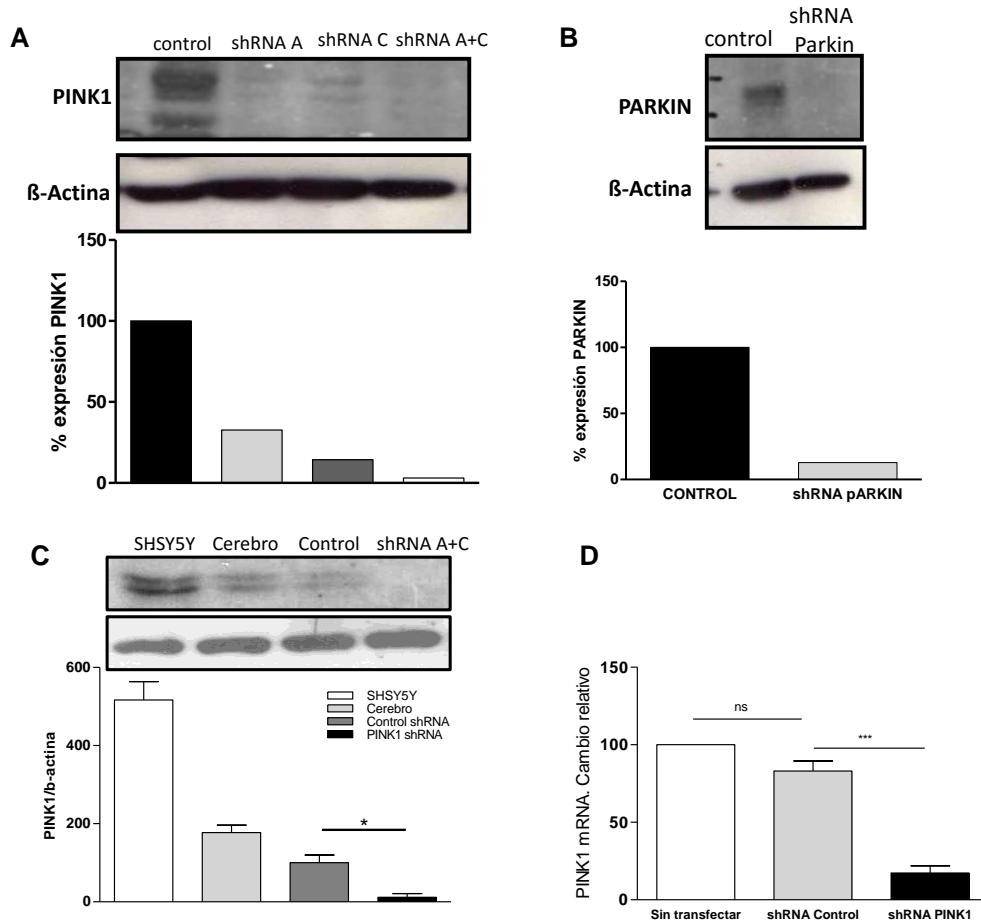
**Figura 7.1 Modelo propuesto del efecto del silenciamiento de PINK1 y Parkin en un modelo de neuronas dopaminérgicas.**

**(A)** La deficiencia de PINK1 se asocia a la alteración de vías de señalización celular, dinámica mitocondrial (incremento de la fisión), mitofagia y flujo autofágico. **(B)** La deficiencia de Parkin inhibe la vía ERK, favorece la fisión mitocondrial, disminuye la mitofagia y el flujo autofágico. La sobreexpresión de Parkin en las células silenciadas para PINK1 restaura el flujo autofágico y protege contra la muerte celular. Por otra parte la Ceramida impacta la vía de señalización PI3K/AKT e induce fisión mitocondrial produciendo muerte neuronal. (Página siguiente).



# Anexos

## A. Verificación del silenciamiento de PINK1 y Parkin



**(A)** *Western blot* y densitometría representativa de la expresión de PINK1 en células CAD silenciadas con los plásmidos lentivirales shRNA A, shRNA C y la suma de los anteriores shRNA A+ shRNA C (plásmidos donados por Cookson). Se observó que la combinación del constructo A + C, generó el mayor silenciamiento en las células CAD, aproximadamente 90 % **(B)** *Western blot* y densitometría representativa de la expresión de Parkin en células CAD silenciadas con el plásmido lentivirales shRNA Parkin de santa cruz, aproximadamente 80 %. **(C)** Expresión de PINK1 en células SHSY5Y, extracto de cerebro de ratón, células CAD shControl y CAD shPINK1 silenciadas con la combinación del constructo A + C. **(D)** Resultado representativo de RT-PCR que muestra una disminución significativa en el nivel del mRNA de PINK1 en las células CAD silenciadas con los constructos A + C.

## B. Programa de amplificación por RT-PCR

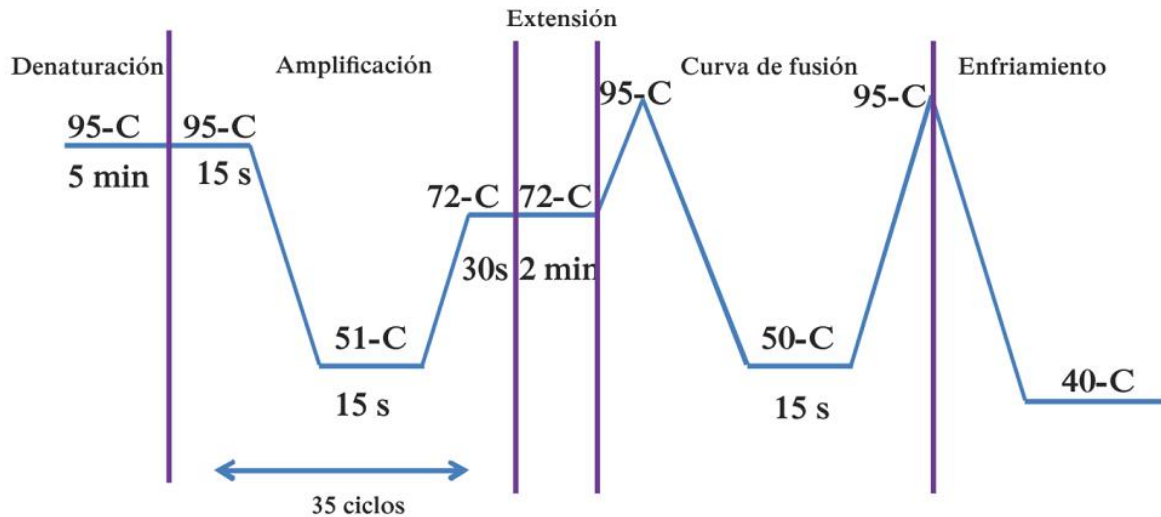
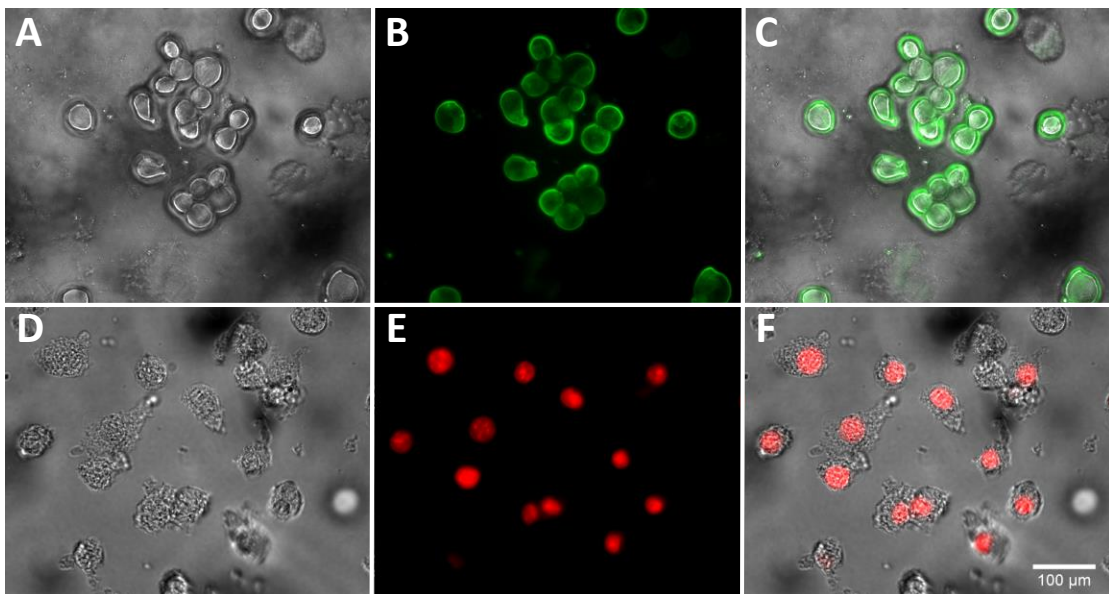


Figura tomada de [631]

## C. Estandarización controles de apoptosis y necrosis para citometría de flujo



Microfotografías de células CAD silvestres. (A, B y C) tratadas con estaurosporina 250 nM por 2h nótese el marcaje positivo de anexina V-FITC o (D, E y F) con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 mM por 2 h, nótese el marcaje rojo que indica IP positivo.

## D. Análisis de citometría con el programa Flow Jo

Abra un nuevo *workspace*.

Arrastre todos los archivos con extensión FCS (solo esos).

Abra el espécimen de células sin marcar.

Seleccione la población de interés con la herramienta polígono o elipse.

Póngale el nombre que quiera a ese *gate* por ejemplo CAD.

Arrastre CAD y póngalo en ALL SAMPLES, de esta manera el programa seleccionará esa mismo *gate* en todas las muestras.

Luego abra un control asegúrese de seleccionar los correctos ejes por ejemplo en PE y FITC.

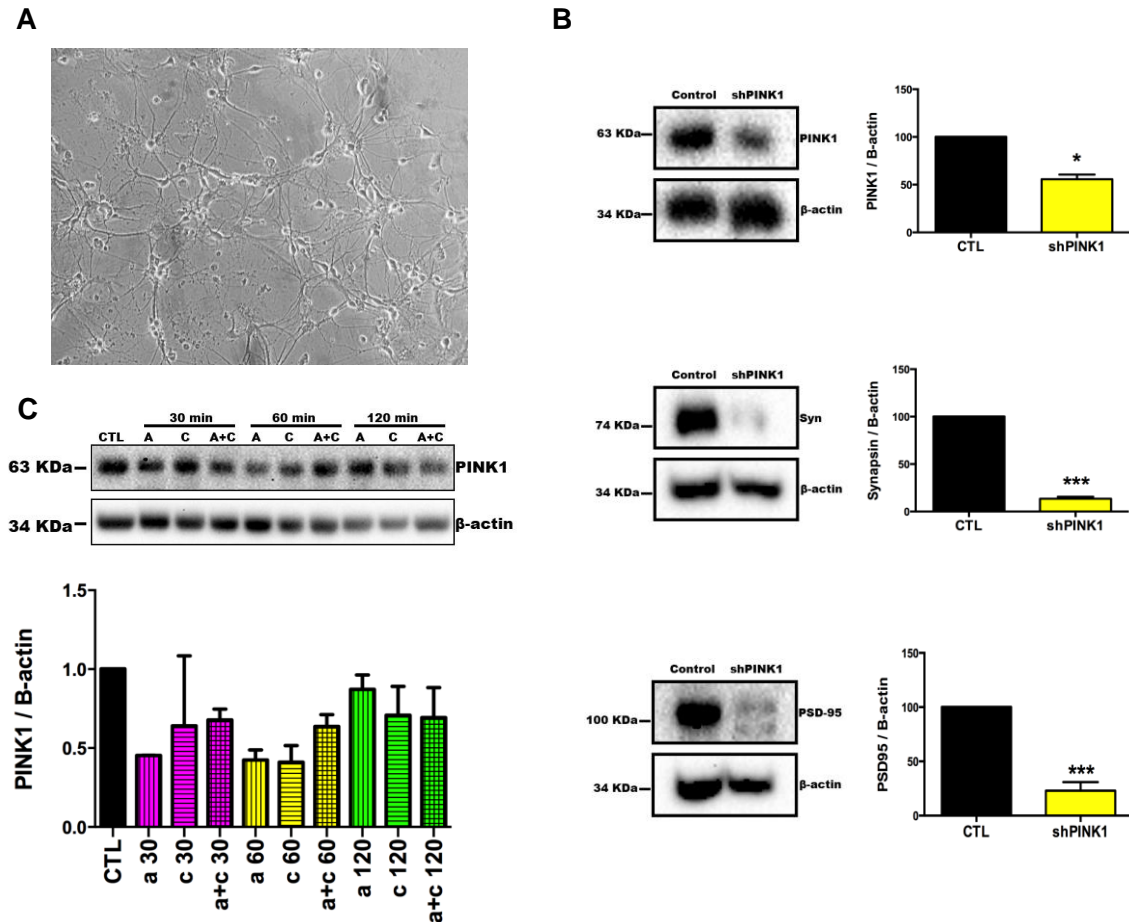
Cuadre las escalas de los ejes para eso *click* en la T de cada eje y seleccione *customize axis* y cuadre los ejes con los signos más y menos

Luego seleccione la cuadrícula y ubíquela según el control que está cuadrando.

Seleccione TODO desde CAD hacia abajo incluyendo los cuatro cuadrantes y péguelo debajo de *All Samples*.

Para exportar los datos a Excel: Selecciones editor de tabla, se abre otra ventana en blanco en su espacio de trabajo seleccione los cuatro cuadrantes y arrástelos hasta la nueva ventana que le salió en el editor de tabla. Luego dele to *clipboard*, abra un Excel y copie.

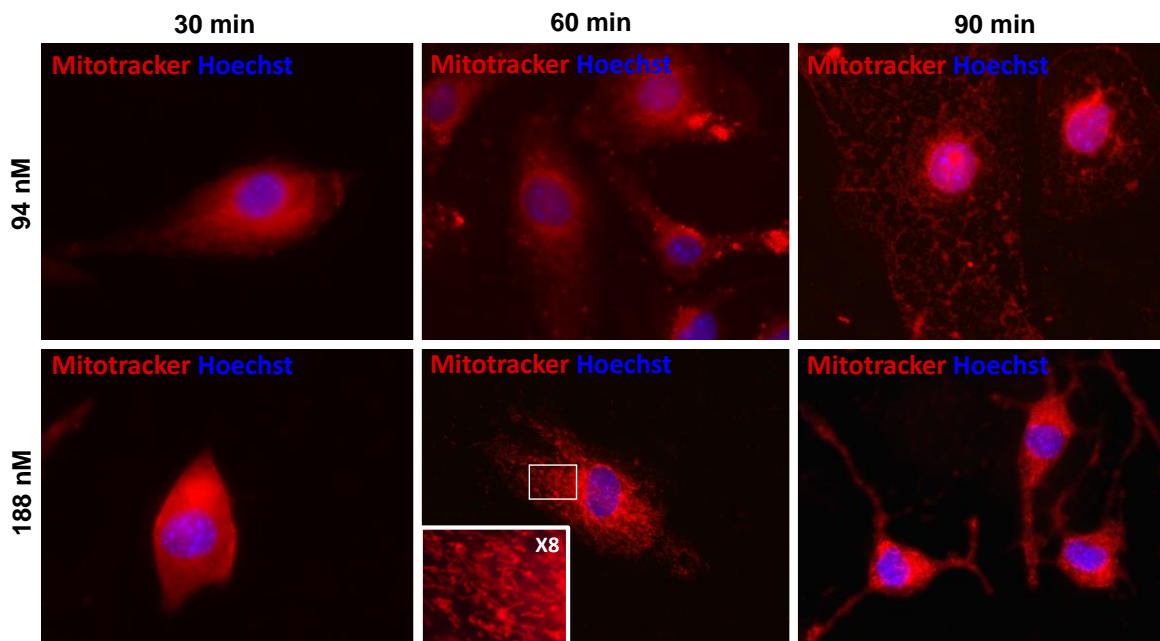
## E. Resultados en neuronas hipocampales silenciadas para PINK1



(A) Microfotografía representativa del cultivo primario de neuronas hipocampales de ratón, luego de 12 días de incubación *in vitro*. (B) *Western blot* representativo de la expresión de PINK1 y sinapsina en neuronas hipocampales silenciadas para PINK1, se observa que el silenciamiento de PINK1 disminuye significativamente la expresión de sinapsina y PSD 95 en este modelo (C). modelo *Western blot* y densitometría representativa de la expresión de PINK1 en neuronas hipocampales transfectedas con los constructos lentivirales donados por Cookson shRNA A, shRNA C y la combinación de ambos, durante tres tiempos de incubación con la mezcla de transfección (30 min, 60 min y 90 min), se observó que la mayor eficiencia en el silenciamiento se obtuvo con el plásmido shRNA A cuando el tiempo de incubación de la transfección fue de 60 min. Los resultados representan medias  $\pm$  SEM de tres cultivos primarios diferentes. Se aplicó una prueba *T* de student para la comparación entre control y neuronas silenciadas. \*  $p < 0,05$  y \*\*\*  $p < 0,001$ .

## F. Estandarización MitoTracker® Red CMXRos.

Se probaron dos concentraciones diferentes de mitotracker red (94 nM y 188 nM) y tres tiempos de incubación (30 min, 60 min y 90 min). Se siguió el protocolo descrito en el apartado 5.4.1 y las láminas fueron observadas por microscopía de fluorescencia. De esta manera se seleccionó 188 nM de concentración MitoTracker®Red durante 60 min que correspondió y al tiempo y concentración que permitió la mejor definición de la red mitocondrial.



## G. Modificaciones macro *Mito-Morphology*

// 1 Las fotos deben estar en formato RGB

// 2 Se deben calibrar las imágenes

// 3 Este macro permite medir el contenido mitocondrial en cada célula, la morfología mitocondrial y puntos de GFP-LC3.

// 4 Instale el macro en la versión 1.44 de ImageJ. Use [F9] para abrir el programa.

// 5 Seleccione la foto a analizar.

// 6 Seleccione la célula a analizar usando la herramienta de selección a mano alzada.

// 7 Presione [F10] para analizar la región de interés

// 8 Presione [F11] para analizar la morfología mitocondrial

// 9 Presione [F12] si quiere analizar el canal verde. Pej si quiere analizar autofagosomas marcados con GFP-LC3 puede contar puntos verdes.

//10 los parámetros seleccionados para mitocondrias y autofagosomas fueron: mínimo 20 pixeles, máximo 100000000 pixeles.

macro "Measure mitochondrial Morphology and Mitochondrial Content open image [F9]"

{

requires("1.33j"); // setFont() added in 1.33j

newImage("Welcome Frame", "RGB white", 550, 100, 1);

---

```

setColor(0, 0, 0);
x=50; y=20;
setFont("SansSerif" , 16, "bold");
y += 30;
setColor(0, 0, 255);
drawString("Welcome to the ImageJ Mitophagy Macro by Ruben K. Dagda" x, y);
open();
setTool(3); // Measure the area of the cell on the green channel only
run("Restore Selection");
print ("select the region or cell of interest to analyze then press function 10 key");
print ("press F10= processes image for ensuing quantifications");
print ("press F11= measures mitochondrial morphology and area");
print ("press F12= measures colocalized points based on selection");
print ("press F4= closes all unused windows");
}
macro "Process RGB Image [F10]"
{
    run("Clear Results");
    // Select the outline of the cell containing mitos on the appropriate channel only
    setTool(2); // Measure the area of the cell on the green channel only
    run("Copy");
    run("Duplicate...", "\n");
    run("Paste");
    run("RGB Split");
    close();
    close();
    run("Invert");
    run("Sharpen");
    setAutoThreshold();
    //run("Threshold...");
    run("Restore Selection");
}
{
    macro "Measure [F11]" {
run("Clear Results");
run("Set Measurements...", "area circularity fit perimeter redirect=None decimal=3");
run("Analyze Particles...", "display results summarize size distribution minimum=20 maximum=100000000 bins=100 pixel show=Outlines display summarize");
for (i=0; i<nResults; i++){MA += getResult("Area", i);MP += getResult("Perim.", i);MC += getResult("Circ.", i);LA += getResult("Minor", i);
}
Mi=LA/i; //NUMERO DE MITOCONDRIAS

```



## Anexos

---

```

AMA=MA/i; // PROMEDIO DEL AREA MITOCONDRIAL
AMP=MP/i; // PROMEDIO DEL PERIMETRO MITOCONDRIAL
AMC=MC/i; // PROMEDIO DE LA CIRCULARIDAD MITOCONDRIAL
Rmorph=AMA/AMP; // INDICE DE INTERCONECTIVIDAD USADO POR DAGDA, BASADA EN LOS PROMEDIOS
Rmorph2=Rmorph/Mi;
Rmorph3=Rmorph/AMC
run("Restore Selection");
setAutoThreshold();
//run("Threshold...");
run("Fill", "slice");
run("Measure"); // Select the outline of the cell containing mitos on the appropriate channel only
TA=getResult('Area'); // AREA TOTAL DE LA CELULA
R=(MA/TA)*100; // Measures the % of the area occupied by mitochondria in the cytoplasm
R1=(MA/TA); // AREA RELATIVA DE LAS MITOCONDRIAS RESPECTO AL AREA TOTAL
MAJO=R1/MP; // VALOR DE INTERCONECTIVIDAD USANDO EL AREA RELATIVA SOBRE EL PERIMETRO TOTAL
print(getTitle()); print("Número de mitocondrias:"+i); print ("Area Celular:"+TA); print ("Area Mitocondrial Total:"+MA);
print("Contenido Mitocondrial Relativo:"+R1); print ("Promedio Area Mitocondrial:"+AMA);
print ("% Contenido Mitocondrial:"+R); print ("Perímetro mitocondrial:"+MP);
print ("Promedio Perímetro Mitocondrial:"+AMP); print ("Circularidad mitocondrial:"+MC); print ("Promedio Circularidad
Mitocondrial:"+AMC);
print ("Promedio Area/Promedio Perímetro:"+Rmorph); print("Promedio Area/Promedio Perímetro normalized to minor
axis.:"+Rmorph2);print("Minor Axis:"+Mi);
print("Promedio Area/Promedio Perímetro normalized to circularity:"+Rmorph3); print("Area Relativa/perímetro
total:"+MAJO);
    // Prints out the Sum of area of mitos, Cellular area, count and Ratio
selectWindow("Results");
selectWindow("Log");
beep();
}
macro "Close All Windows [F4]" {
    while (nImages>0) {
        selectImage(nImages);
        close();
    }
    //Closes all windows except your results which you can transfer to Excel
}
macro "Colocalization of pixels [F12]"
{
run("Clear Results");
setTool(2); // Measure the area of the cell on the green channel only
run("Copy");
run("Internal Clipboard");
run("Invert");

```

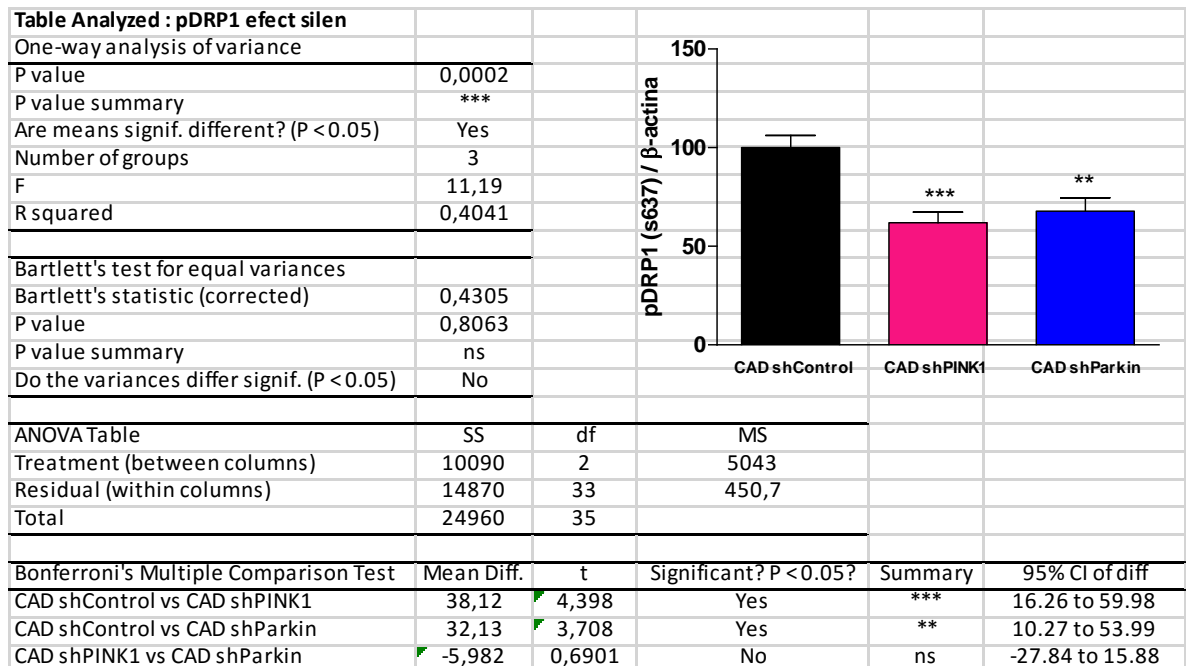
## Efecto del silenciamiento de los genes *PINK1* y *Parkin* sobre la dinámica y autofagia mitocondrial en un modelo de neuronas dopaminérgicas

```

run("RGB Split");
close();
run("Colocalization ", "channel_1=[Clipboard (green)] channel_2=[Clipboard (red)] ratio=50 threshold_channel_1=50 threshold_channel_2=50 display=255 colocalized");
selectWindow("Clipboard (red)");
    //run("Threshold...");
    setAutoThreshold("Default");
run("Analyze Particles...", "size=20-infinity circularity=0.00-1.00 show=Outlines display exclude summarize");
selectWindow("Clipboard (green)");
    //run("Threshold...");
    setAutoThreshold("Default");
run("Analyze Particles...", "size=20-infinity circularity=0.00-1.00 show=Outlines display exclude summarize");
    selectWindow("Colocalized points (8-bit )");
    //run("Threshold...");
    setAutoThreshold("Default");
run("Analyze Particles...", "size=20-infinity circularity=0.00-1.00 show=Outlines display exclude summarize");
}
}

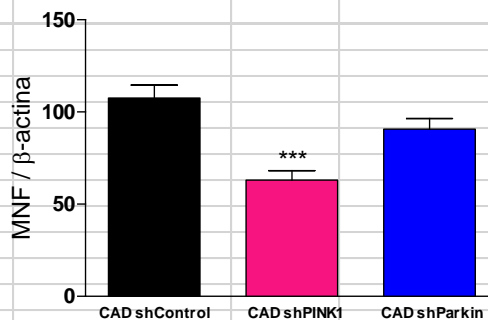
```

## H.El silenciamiento de *PINK1* o *Parkin* favorece desfosforilación de *DRP1* en serina 637

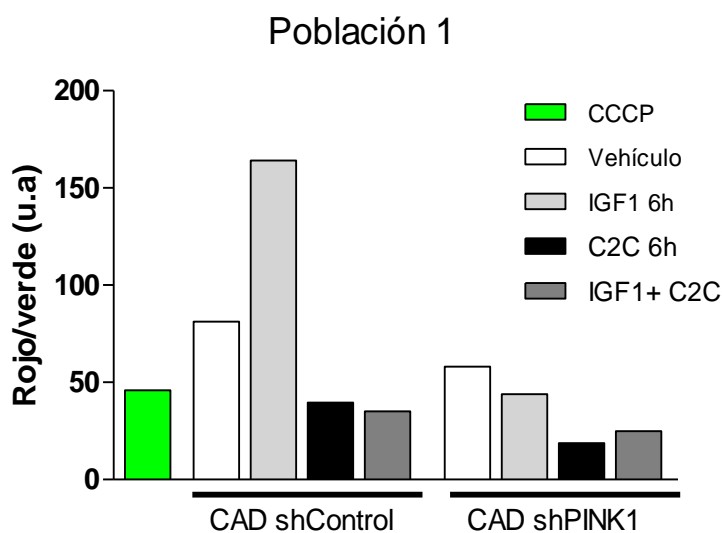


## I. El silenciamiento de PINK1 disminuye la expresión de MNF

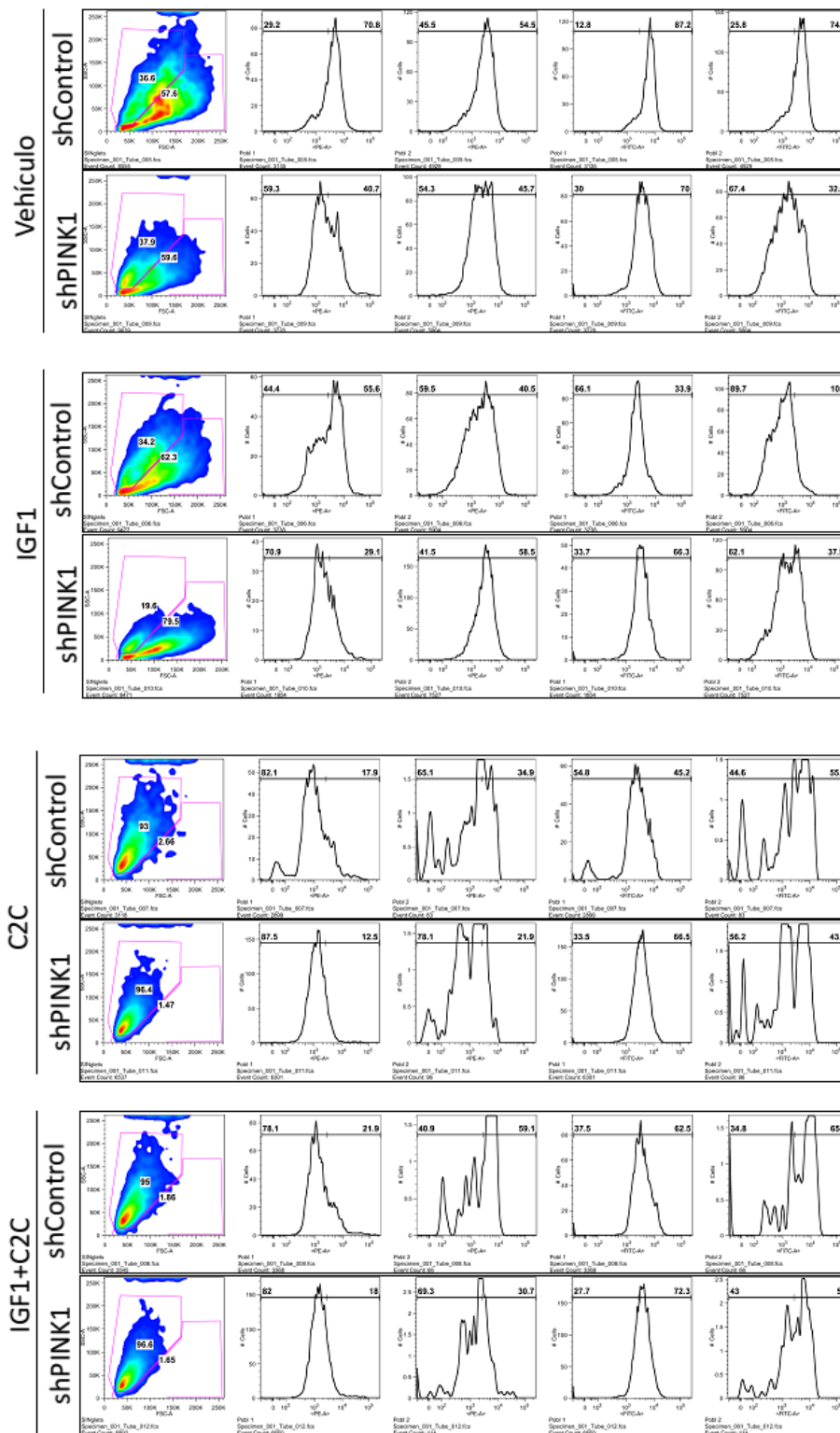
Table Analyzed: MNF efec silen					
One-way analysis of variance					
P value	<0.0001				
P value summary	***				
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes				
Number of groups	3				
F	14,14				
R squared	0,4615				
Bartlett's test for equal variances					
Bartlett's statistic (corrected)	1,045				
P value	0,5931				
P value summary	ns				
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	No				
ANOVA Table					
	SS	df	MS		
Treatment (between columns)	12120	2	6059		
Residual (within columns)	14140	33	428,4		
Total	26260	35			
Bonferroni's Multiple Comparison Test					
	Mean Diff.	t	Significant? P < 0.05?	Summary	95% CI of diff
CAD shControl vs CAD shPINK1	44,51	5,268	Yes	***	23.20 to 65.83
CAD shControl vs CAD shParkin	16,90	2,000	No	ns	-4.410 to 38.22
CAD shPINK1 vs CAD shParkin	-27,61	3,268	Yes	**	-48.92 to -6.299



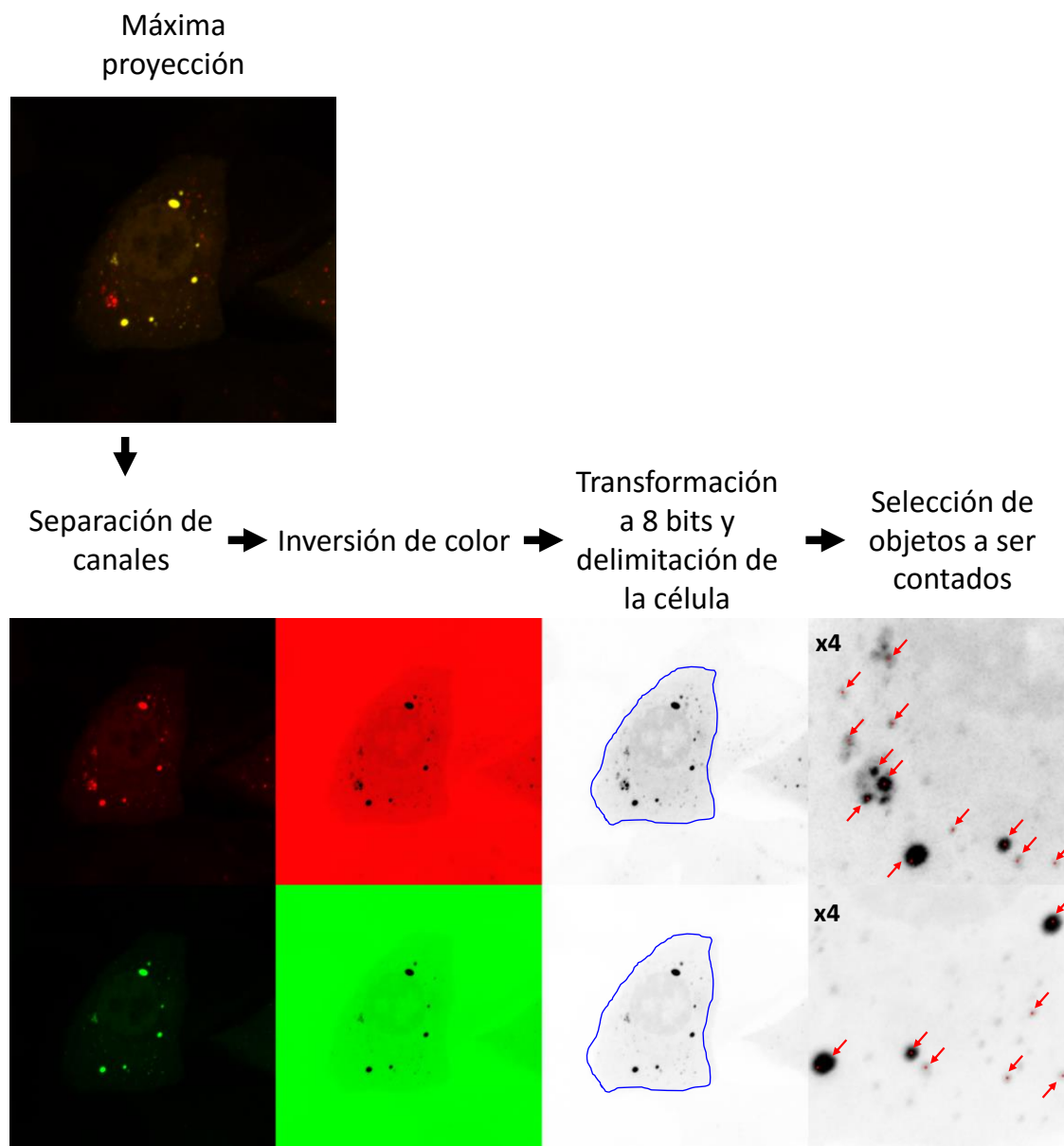
## J. El silenciamiento de PINK1 en las células CAD disminuye el JC-1 por citometría



Anexo J (continuación)

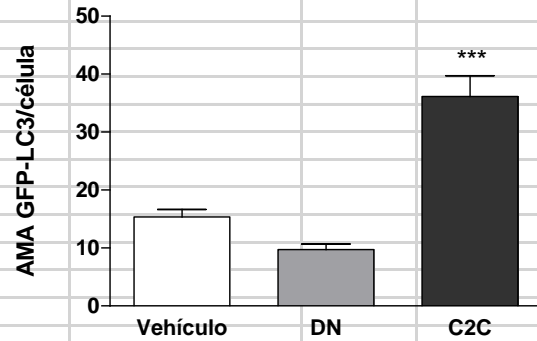


## K. Ejemplo del análisis de imágenes, para evaluar flujo autofágico usando el *plugin* ITCN de ImageJ

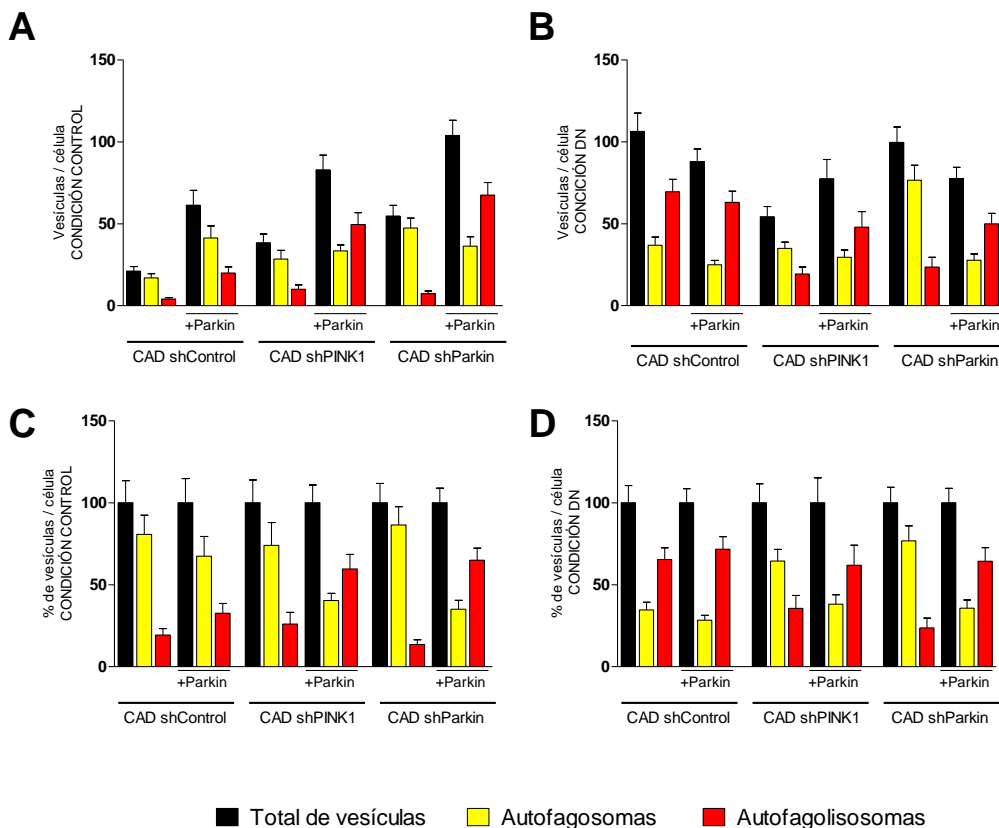


## L. El tratamiento con C2C incrementa el área media de los agregados GFP-LC3

Table Analyzed: área AFG por tto					
One-way analysis of variance					
P value	<0.0001				
P value summary	***				
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes				
Number of groups	3				
F	37,81				
R squared	0,2207				
Bartlett's test for equal variances					
Bartlett's statistic (corrected)	169,7				
P value	<0.0001				
P value summary	***				
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	Yes				
ANOVA Table					
	SS	df	MS		
Treatment (between columns)	34860	2	17430		
Residual (within columns)	123100	267	460,9		
Total	157900	269			
Bonferroni's Multiple Comparison Test					
	Mean Diff.	t	Significant? P < 0.05?	Summary	95% CI of diff
Vehículo vs DN	5,603	1,751	No	ns	-1.612 to 12.82
Vehículo vs C2C	-20,81	6,501	Yes	***	-28.02 to -13.59

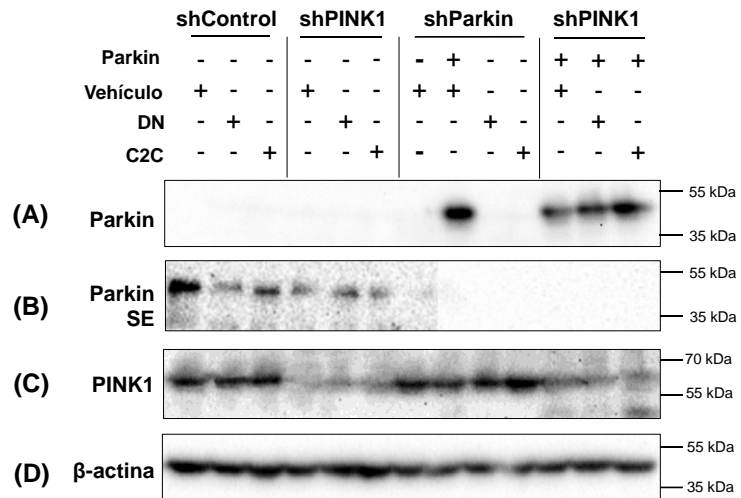


## M.Resultados de la evaluación de flujo autofágico



(A y B) Número total de vesículas autofágicas por célula, discriminadas según fueran autofagosomas o autofagolisosomas. (C y D) porcentaje de vesículas por células, los datos fueron normalizados considerando el total de vesículas como el 100 % en cada uno de los grupos de tratamientos y tipo de célula. Barras amarillas representan autofagosomas. Barras rojas, representan autofagolisosomas. Barras negras representan la suma de autofagosomas y autofagolisosomas (A y C) Condición de cultivo control y (B y D) deprivación de nutrientes.

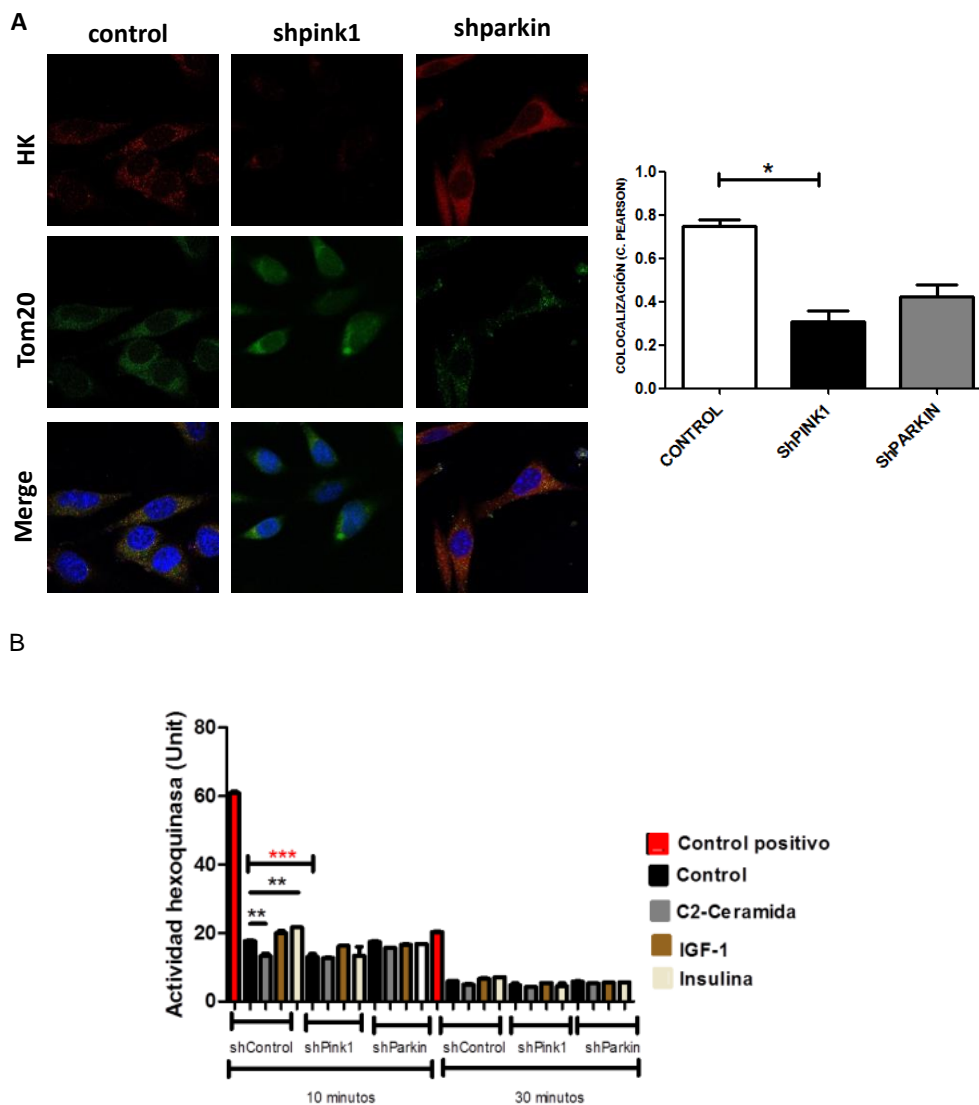
## N.Verificación de la sobre-exposición de Parkin en células silenciadas para PINK1



*Western blot* representativo de la verificación de la sobre-exposición de Parkin en las células silenciadas para PINK1. **(A)** Parkin, tiempo de exposición 1 min. **(B)** Parkin, tiempo de exposición 9 min, (tapando los carriles del 8 al 13). **(C)** PINK1 y **(D)**  $\beta$ -actina. SE (sobre-exposición).



## O.El silenciamiento de PINK1 afecta la localización mitocondrial de HK1 y su actividad



El silenciamiento de PINK1 disminuye significativamente la expresión de HK1, su localización en la mitocondria y su actividad quinasa. **(A)** Izquierda: Microfotografías representativas de inmunofluorescencia de HK1 (rojo) y TOM20 (verde) de CAD shControl CAD shPINK1 y CAD shParkin, núcleos en azul marcados con *Hoechst*. Derecha: gráfica **(B)** Actividad HK en células shControl, shPink1 y shParkin, tratadas con IGF-1 (100ng/mL), insulina (200ng/mL) y C2-Ceramida (25µM) durante 6 horas. n=3 (Figura B tomada de [632]).



## Bibliografía

1. Wirdefeldt K, Adami HO, Cole P et al (2011) Epidemiology and etiology of Parkinson's disease: a review of the evidence. *Eur J Epidemiol* 26 Suppl 1:S1-58
2. Von Campenhausen S, Bornschein B, Wick R et al (2005) Prevalence and incidence of Parkinson's disease in Europe. *Eur Neuropsychopharmacol* 15:473-490
3. Troiano AR, Micheli FE, Alarcon F et al (2006) Movement disorders in Latin America. *Parkinsonism Relat Disord* 12:125-138
4. Schoenberg BS, Anderson DW, Haerer AF (1985) Prevalence of Parkinson's disease in the biracial population of Copiah County, Mississippi. *Neurology* 35:841-845
5. Muangpaisan W, Hori H, Brayne C (2009) Systematic review of the prevalence and incidence of Parkinson's disease in Asia. *J Epidemiol* 19:281-293
6. Okubadejo NU, Bower JH, Rocca WA et al (2006) Parkinson's disease in Africa: A systematic review of epidemiologic and genetic studies. *Mov Disord* 21:2150-2156
7. Parkinson J (2002) An essay on the shaking palsy. 1817. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 14:223-236; discussion 222
8. Widnell K (2005) Pathophysiology of motor fluctuations in Parkinson's disease. *Movement Disorders* 20:S17-S22
9. Merello M (2008) [Non-motor disorders in Parkinson's disease]. *Rev Neurol* 47:261-270
10. Bonnet AM (2000) Involvement of Non-Dopaminergic Pathways in Parkinson's Disease: Pathophysiology and Therapeutic Implications. *CNS Drugs* 13:351-364
11. Jellinger KA (2002) Recent developments in the pathology of Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl*:347-376
12. Pavese N, Brooks DJ (2009) Imaging neurodegeneration in Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta* 1792:722-729
13. Langston JW (1996) The etiology of Parkinson's disease with emphasis on the MPTP story. *Neurology* 47:S153-S160
14. Tanner CM, Kamel F, Ross GW et al (2011) Rotenone, paraquat, and Parkinson's disease. *Environ Health Perspect* 119:866-872
15. Soto-Otero R, Mendez-Alvarez E, Hermida-Ameijeiras A et al (2000) Autoxidation and neurotoxicity of 6-hydroxydopamine in the presence of some antioxidants: potential implication in relation to the pathogenesis of Parkinson's disease. *J Neurochem*. 74:1605-1612
16. France-Lanord V, Brugg B, Michel PP et al (1997) Mitochondrial free radical signal in ceramide-dependent apoptosis: a putative mechanism for neuronal death in Parkinson's disease. *J Neurochem* 69:1612-1621
17. Bekris LM, Mata IF, Zabetian CP (2010) The genetics of Parkinson disease. *J Geriatr Psychiatry Neurol* 23:228-242

18. Schapira AH, Jenner P (2011) Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Mov Disord* 26:1049-1055
19. Collier TJ, Kanaan NM, Kordower JH (2011) Ageing as a primary risk factor for Parkinson's disease: evidence from studies of non-human primates. *Nat Rev Neurosci* 12:359-366
20. Tatton WG, Olanow CW (1999) Apoptosis in neurodegenerative diseases: the role of mitochondria. *Biochim.Biophys.Acta* 1410:195-213
21. Van Laar VS, Berman SB (2009) Mitochondrial dynamics in Parkinson's disease. *Exp Neurol* 218:247-256
22. Stoica BA, Movsesyan VA, Lea PMT et al (2003) Ceramide-induced neuronal apoptosis is associated with dephosphorylation of Akt, BAD, FKHR, GSK-3beta, and induction of the mitochondrial-dependent intrinsic caspase pathway. *Mol Cell Neurosci* 22:365-382
23. Mandemakers W, Morais VA, De Strooper B (2007) A cell biological perspective on mitochondrial dysfunction in Parkinson disease and other neurodegenerative diseases. *Journal of cell science* 120:1707-1716
24. Pankratz N, Foroud T (2004) Genetics of Parkinson disease. *NeuroRx* 1:235-242
25. Leroux P-D (1880) Contribution a l'etude des causes de l'aparalysie agitante. In: *These de Paris*
26. Pankratz N, Foroud T (2007) Genetics of Parkinson disease. *Genet Med* 9:801-811
27. Tanner CM, Ottman R, Goldman SM et al (1999) Parkinson disease in twins: an etiologic study. *JAMA* 281:341-346
28. Xu J, Kao S-Y, Lee FJS et al (2002) Dopamine-dependent neurotoxicity of alpha-synuclein: a mechanism for selective neurodegeneration in Parkinson disease. *Nature medicine* 8:600-606
29. Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E et al (1997) Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 276:2045-2047
30. Kruger R, Kuhn W, Muller T et al (1998) Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Nat Genet* 18:106-108
31. Singleton AB, Farrer M, Johnson J et al (2003) alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science* 302:841
32. Chartier-Harlin MC, Kachergus J, Roumier C et al (2004) Alpha-synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease. *Lancet* 364:1167-1169
33. Farrer M, Kachergus J, Forno L et al (2004) Comparison of kindreds with parkinsonism and alpha-synuclein genomic multiplications. *Ann Neurol* 55:174-179
34. Ibanez P, Bonnet AM, Debarges B et al (2004) Causal relation between alpha-synuclein gene duplication and familial Parkinson's disease. *Lancet* 364:1169-1171
35. Zarranz JJ, Alegre J, Gomez-Esteban JC et al (2004) The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia. *Ann Neurol* 55:164-173
36. Nishioka K, Hayashi S, Farrer MJ et al (2006) Clinical heterogeneity of alpha-synuclein gene duplication in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 59:298-309
37. Fuchs J, Nilsson C, Kachergus J et al (2007) Phenotypic variation in a large Swedish pedigree due to SNCA duplication and triplication. *Neurology* 68:916-922
38. Kitada T, Asakawa S, Hattori N et al (1998) Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* 392:605-608
39. Gasser T, Muller-Myhsok B, Wszolek ZK et al (1998) A susceptibility locus for Parkinson's disease maps to chromosome 2p13. *Nat Genet* 18:262-265

40. Destefano AL, Lew MF, Golbe LI et al (2002) PARK3 influences age at onset in Parkinson disease: a genome scan in the GenePD study. *Am J Hum Genet* 70:1089-1095
41. Sharma M, Mueller JC, Zimprich A et al (2006) The sepiapterin reductase gene region reveals association in the PARK3 locus: analysis of familial and sporadic Parkinson's disease in European populations. *J Med Genet* 43:557-562
42. Farrer M, Gwinn-Hardy K, Muentner M et al (1999) A chromosome 4p haplotype segregating with Parkinson's disease and postural tremor. *Hum Mol Genet* 8:81-85
43. Gwinn-Hardy K, Mehta ND, Farrer M et al (2000) Distinctive neuropathology revealed by alpha-synuclein antibodies in hereditary parkinsonism and dementia linked to chromosome 4p. *Acta Neuropathol* 99:663-672
44. Liu Z, Meray RK, Grammatopoulos TN et al (2009) Membrane-associated farnesylated UCH-L1 promotes alpha-synuclein neurotoxicity and is a therapeutic target for Parkinson's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106:4635-4640
45. Leroy E, Boyer R, Auburger G et al (1998) The ubiquitin pathway in Parkinson's disease. *Nature* 395:451-452
46. Lincoln S, Vaughan J, Wood N et al (1999) Low frequency of pathogenic mutations in the ubiquitin carboxy-terminal hydrolase gene in familial Parkinson's disease. *Neuroreport* 10:427-429
47. Farrer M, Destee T, Becquet E et al (2000) Linkage exclusion in French families with probable Parkinson's disease. *Mov Disord* 15:1075-1083
48. Valente EM, Abou-Sleiman PM, Caputo V et al (2004) Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science* 304:1158-1160
49. Valente EM, Salvi S, Ialongo T et al (2004) PINK1 mutations are associated with sporadic early-onset parkinsonism. *Ann Neurol* 56:336-341
50. Sim CH, Lio DS, Mok SS et al (2006) C-terminal truncation and Parkinson's disease-associated mutations down-regulate the protein serine/threonine kinase activity of PTEN-induced kinase-1. *Hum Mol Genet* 15:3251-3262
51. Abou-Sleiman PM, Healy DG, Quinn N et al (2003) The role of pathogenic DJ-1 mutations in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 54:283-286
52. Bonifati V, Rizzu P, Squitieri F et al (2003) DJ-1( PARK7), a novel gene for autosomal recessive, early onset parkinsonism. *Neurol.Sci.* 24:159-160
53. Hague S, Rogaeva E, Hernandez D et al (2003) Early-onset Parkinson's disease caused by a compound heterozygous DJ-1 mutation. *Ann Neurol* 54:271-274
54. Hedrich K, Djarmati A, Schafer N et al (2004) DJ-1 (PARK7) mutations are less frequent than Parkin (PARK2) mutations in early-onset Parkinson disease. *Neurology* 62:389-394
55. Hedrich K, Schafer N, Hering R et al (2004) The R98Q variation in DJ-1 represents a rare polymorphism. *Ann.Neurol.* 55:145-146
56. Ghazavi F, Fazlali Z, Banihosseini SS et al (2011) PRKN, DJ-1, and PINK1 screening identifies novel splice site mutation in PRKN and two novel DJ-1 mutations. *Mov Disord* 26:80-89
57. West AB, Moore DJ, Biskup S et al (2005) Parkinson's disease-associated mutations in leucine-rich repeat kinase 2 augment kinase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:16842-16847
58. Gloeckner CJ, Kinkl N, Schumacher A et al (2006) The Parkinson disease causing LRRK2 mutation I2020T is associated with increased kinase activity. *Hum Mol Genet* 15:223-232
59. Lesage S, Durr A, Tazir M et al (2006) LRRK2 G2019S as a cause of Parkinson's disease in North African Arabs. *N Engl J Med* 354:422-423

60. Ozelius LJ, Senthil G, Saunders-Pullman R et al (2006) LRRK2 G2019S as a cause of Parkinson's disease in Ashkenazi Jews. *N Engl J Med* 354:424-425
61. Ramirez A, Heimbach A, Grundemann J et al (2006) Hereditary parkinsonism with dementia is caused by mutations in ATP13A2, encoding a lysosomal type 5 P-type ATPase. *Nat Genet* 38:1184-1191
62. Di Fonzo A, Dekker MC, Montagna P et al (2009) FBXO7 mutations cause autosomal recessive, early-onset parkinsonian-pyramidal syndrome. *Neurology* 72:240-245
63. Bruggemann N, Hagenah J, Reetz K et al (2010) Recessively inherited parkinsonism: effect of ATP13A2 mutations on the clinical and neuroimaging phenotype. *Arch Neurol* 67:1357-1363
64. Dos Santos AV, Pestana CP, Diniz KR et al (2010) Mutational analysis of GIGYF2, ATP13A2 and GBA genes in Brazilian patients with early-onset Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 485:121-124
65. Li YJ, Deng J, Mayhew GM et al (2007) Investigation of the PARK10 gene in Parkinson disease. *Ann Hum Genet* 71:639-647
66. Haugarvoll K, Toft M, Skipper L et al (2009) Fine-mapping and candidate gene investigation within the PARK10 locus. *Eur J Hum Genet* 17:336-343
67. Pankratz N, Nichols WC, Uniacke SK et al (2002) Genome screen to identify susceptibility genes for Parkinson disease in a sample without parkin mutations. *Am J Hum Genet* 71:124-135
68. Pankratz N, Nichols WC, Uniacke SK et al (2003) Genome-wide linkage analysis and evidence of gene-by-gene interactions in a sample of 362 multiplex Parkinson disease families. *Hum Mol Genet* 12:2599-2608
69. Lautier C, Goldwurm S, Durr A et al (2008) Mutations in the GIGYF2 (TNRC15) gene at the PARK11 locus in familial Parkinson disease. *Am J Hum Genet* 82:822-833
70. Zimprich A, Schulte C, Reinthaler E et al (2009) PARK11 gene (GIGYF2) variants Asn56Ser and Asn457Thr are not pathogenic for Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 15:532-534
71. Strauss KM, Martins LM, Plun-Favreau H et al (2005) Loss of function mutations in the gene encoding Omi/HtrA2 in Parkinson's disease. *Hum Mol Genet* 14:2099-2111
72. Kruger R, Sharma M, Riess O et al (2011) A large-scale genetic association study to evaluate the contribution of Omi/HtrA2 (PARK13) to Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* 32:548 e549-518
73. Tan EK, Ho P, Tan L et al (2010) PLA2G6 mutations and Parkinson's disease. *Ann Neurol* 67:148
74. Yoshino H, Tomiyama H, Tachibana N et al (2010) Phenotypic spectrum of patients with PLA2G6 mutation and PARK14-linked parkinsonism. *Neurology* 75:1356-1361
75. Luo LZ, Xu Q, Guo JF et al (2010) FBXO7 gene mutations may be rare in Chinese early-onset Parkinsonism patients. *Neurosci Lett* 482:86-89
76. Paisan-Ruiz C, Guevara R, Federoff M et al (2010) Early-onset L-dopa-responsive parkinsonism with pyramidal signs due to ATP13A2, PLA2G6, FBXO7 and spatacsin mutations. *Mov Disord* 25:1791-1800
77. Tan EK, Kwok HH, Tan LC et al (2010) Analysis of GWAS-linked loci in Parkinson disease reaffirms PARK16 as a susceptibility locus. *Neurology* 75:508-512
78. Vilarino-Guell C, Ross OA, Aasly JO et al (2010) An independent replication of PARK16 in Asian samples. *Neurology* 75:2248-2249

## Bibliografía

79. Miura E, Hasegawa T, Konno M et al (2014) VPS35 dysfunction impairs lysosomal degradation of  $\alpha$ -synuclein and exacerbates neurotoxicity in a *Drosophila* model of Parkinson's disease. *Neurobiology of disease* 71:1-13
80. Tang F-L, Erion JR, Tian Y et al (2015) VPS35 in Dopamine Neurons Is Required for Endosome-to-Golgi Retrieval of Lamp2a, a Receptor of Chaperone-Mediated Autophagy That Is Critical for  $\alpha$ -Synuclein Degradation and Prevention of Pathogenesis of Parkinson's Disease. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 35:10613-10628
81. Ando M, Funayama M, Li Y et al (2012) VPS35 mutation in Japanese patients with typical Parkinson's disease. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 27:1413-1417
82. Vilariño-Güell C, Wider C, Ross OA et al (2011) VPS35 mutations in Parkinson disease. *American journal of human genetics* 89:162-167
83. Zimprich A, Benet-Pagès A, Struhal W et al (2011) A mutation in VPS35, encoding a subunit of the retromer complex, causes late-onset Parkinson disease. *American journal of human genetics* 89:168-175
84. Huttenlocher J, Krüger R, Capetian P et al (2015) EIF4G1 is neither a strong nor a common risk factor for Parkinson's disease: evidence from large European cohorts. *Journal of medical genetics* 52:37-41
85. Chartier-Harlin M-C, Dachsel JC, Vilariño-Güell C et al (2011) Translation initiator EIF4G1 mutations in familial Parkinson disease. *American journal of human genetics* 89:398-406
86. Edvardson S, Cinnamon Y, Ta-Shma A et al (2012) A deleterious mutation in DNAJC6 encoding the neuronal-specific clathrin-uncoating co-chaperone auxilin, is associated with juvenile parkinsonism. *PloS one* 7:e36458
87. Köroğlu Ç, Baysal L, Cetinkaya M et al (2013) DNAJC6 is responsible for juvenile parkinsonism with phenotypic variability. *Parkinsonism & related disorders* 19:320-324
88. Krebs CE, Karkheiran S, Powell JC et al (2013) The Sac1 domain of SYNJ1 identified mutated in a family with early-onset progressive Parkinsonism with generalized seizures. *Human mutation* 34:1200-1207
89. Quadri M, Fang M, Picillo M et al (2013) Mutation in the SYNJ1 gene associated with autosomal recessive, early-onset Parkinsonism. *Human mutation* 34:1208-1215
90. Appel-Cresswell S, Rajput AH, Sossi V et al (2014) Clinical, positron emission tomography, and pathological studies of DNAJC13 p.N855S Parkinsonism. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 29:1684-1687
91. Vilariño-Güell C, Rajput A, Milnerwood AJ et al (2014) DNAJC13 mutations in Parkinson disease. *Human Molecular Genetics* 23:1794-1801
92. Lorenzo-Betancor O, Ogaki K, Soto-Ortolaza AI et al (2015) DNAJC13 p.Asn855Ser mutation screening in Parkinson's disease and pathologically confirmed Lewy body disease patients. *European journal of neurology* 22:1323-1325
93. Jaramillo J (2010) Análisis del Efecto del Gen Dj-1 frente Aa C2-Ceramida, 6-Hidroxidopamina y Rotenona y su relación con la vía PI3K/AKT en un modelo de neuronas mesencefálicas In: *Maestría en Neurociencias. Facultad de Medicina Universidad Nacional de Colombia., Bogotá*, p 198
94. Cookson MR (2004) Molecules that cause or prevent Parkinson's disease. *PLoS.Biol.* 2:e401
95. Chiocco MJ, Harvey BK, Wang Y et al (2007) Neurotrophic factors for the treatment of Parkinson's disease. *Parkinsonism & Related Disorders* 13, Supplement 3:S321-S328
96. Blesch A (2006) Neurotrophic Factors in Neurodegeneration. *Brain Pathology* 16:295-303

97. Unoki M, Nakamura Y (2001) Growth-suppressive effects of BPOZ and EGR2, two genes involved in the PTEN signaling pathway. *Oncogene* 20:4457-4465
98. Puschmann A (2013) Monogenic Parkinson's disease and parkinsonism: clinical phenotypes and frequencies of known mutations. *Parkinsonism Relat Disord* 19:407-415
99. Cardona F, Sánchez-Mut JV, Dopazo H et al (2011) Phylogenetic and in silico structural analysis of the Parkinson disease-related kinase PINK1. *Human mutation* 32:369-378
100. Jiménez J (2012) PhD thesis: PINK1: a critical protein kinase in the molecular mechanisms involved in Cancer and Parkinson's disease. In: Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de Valencia, p 151
101. Rogaeva E, Johnson J, Lang AE et al (2004) Analysis of the PINK1 gene in a large cohort of cases with Parkinson disease. *Archives of neurology* 61:1898-1904
102. Mills RD, Sim CH, Mok SS et al (2008) Biochemical aspects of the neuroprotective mechanism of PTEN-induced kinase-1 (PINK1). *J Neurochem* 105:18-33
103. Mei Y, Zhang Y, Yamamoto K et al (2009) FOXO3a-dependent regulation of Pink1 (Park6) mediates survival signaling in response to cytokine deprivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106:5153-5158
104. Berthier A, Navarro S, Jimenez-Sainz J et al (2011) PINK1 displays tissue-specific subcellular location and regulates apoptosis and cell growth in breast cancer cells. *Hum Pathol* 42:75-87
105. Deas E, Plun-Favreau H, Gandhi S et al (2011) PINK1 cleavage at position A103 by the mitochondrial protease PARL. *Hum Mol Genet* 20:867-879
106. Jin SM, Lazarou M, Wang C et al (2010) Mitochondrial membrane potential regulates PINK1 import and proteolytic destabilization by PARL. *J Cell Biol* 191:933-942
107. Lin W, Kang UJ (2010) Structural determinants of PINK1 topology and dual subcellular distribution. *BMC Cell Biol* 11:90
108. Lazarou M, Jin SM, Kane LA et al (2012) Role of PINK1 binding to the TOM complex and alternate intracellular membranes in recruitment and activation of the E3 ligase Parkin. *Dev Cell* 22:320-333
109. Meissner C, Lorenz H, Weihofen A et al (2011) The mitochondrial intramembrane protease PARL cleaves human Pink1 to regulate Pink1 trafficking. *J Neurochem* 117:856-867
110. Liu W, Vives-Bauza C, Acin-Perez R et al (2009) PINK1 defect causes mitochondrial dysfunction, proteasomal deficit and alpha-synuclein aggregation in cell culture models of Parkinson's disease. *PloS one* 4:e4597
111. Matsuda N, Sato S, Shiba K et al (2010) PINK1 stabilized by mitochondrial depolarization recruits Parkin to damaged mitochondria and activates latent Parkin for mitophagy. *J Cell Biol* 189:211-221
112. Weihofen A, Thomas KJ, Ostaszewski BL et al (2009) Pink1 forms a multiprotein complex with Miro and Milton, linking Pink1 function to mitochondrial trafficking. *Biochemistry* 48:2045-2052
113. Yamano K, Youle RJ (2013) PINK1 is degraded through the N-end rule pathway. *Autophagy* 9:1758-1769
114. Lin W, Kang UJ (2008) Characterization of PINK1 processing, stability, and subcellular localization. *J Neurochem* 106:464-474
115. Narendra D, Tanaka A, Suen DF et al (2008) Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *J Cell Biol* 183:795-803



116. Okatsu K, Kimura M, Oka T et al (2015) Unconventional PINK1 localization to the outer membrane of depolarized mitochondria drives Parkin recruitment. *Journal of cell science* 128:964-978
117. Okatsu K, Oka T, Iguchi M et al (2012) PINK1 autophosphorylation upon membrane potential dissipation is essential for Parkin recruitment to damaged mitochondria. *Nat Commun* 3:1016
118. Aerts L, Craessaerts K, De Strooper B et al (2015) PINK1 Kinase Catalytic Activity Is Regulated by Phosphorylation on Serines 228 and 402. *Journal of Biological Chemistry* 290:2798-2811
119. Narendra DP, Jin SM, Tanaka A et al (2010) PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin. *PLoS biology* 8:e1000298
120. Steer EK, Dail MK, Chu CT (2015) Beyond mitophagy: cytosolic PINK1 as a messenger of mitochondrial health. *Antioxidants & redox signaling* 22:1047-1059
121. Dagda RK, Pien I, Wang R et al (2014) Beyond the mitochondrion: cytosolic PINK1 remodels dendrites through Protein Kinase A. *Journal of Neurochemistry* 128:864-877
122. Pridgeon JW, Olzmann JA, Chin LS et al (2007) PINK1 protects against oxidative stress by phosphorylating mitochondrial chaperone TRAP1. *PLoS biology* 5:e172
123. Murata H, Sakaguchi M, Jin Y et al (2011) A new cytosolic pathway from a Parkinson disease-associated kinase, BRPK/PINK1: activation of AKT via mTORC2. *The Journal of biological chemistry* 286:7182-7189
124. Plun-Favreau H, Klupsch K, Moiso N et al (2007) The mitochondrial protease HtrA2 is regulated by Parkinson's disease-associated kinase PINK1. *Nat Cell Biol* 9:1243-1252
125. Wang X, Winter D, Ashrafi G et al (2011) PINK1 and Parkin Target Miro for Phosphorylation and Degradation to Arrest Mitochondrial Motility. *Cell* 147:893-906
126. Matsuda N, Tanaka K (2015) The PARK2/Parkin receptor on damaged mitochondria revisited-uncovering the role of phosphorylated ubiquitin chains. *Autophagy* 11:1700-1701
127. Kane LA, Lazarou M, Fogel AI et al (2014) PINK1 phosphorylates ubiquitin to activate Parkin E3 ubiquitin ligase activity. *The Journal of Cell Biology* 205:143-153
128. Van Der Merwe C, Jalali Sefid Dashti Z, Christoffels A et al (2015) Evidence for a common biological pathway linking three Parkinson's disease-causing genes: parkin, PINK1 and DJ-1. *The European journal of neuroscience* 41:1113-1125
129. Xiong H, Wang D, Chen L et al (2009) Parkin, PINK1, and DJ-1 form a ubiquitin E3 ligase complex promoting unfolded protein degradation. *J Clin Invest* 119:650-660
130. Triplett JC, Zhang Z, Sultana R et al (2015) Quantitative expression proteomics and phosphoproteomics profile of brain from PINK1 knockout mice: insights into mechanisms of familial Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry* 133:750-765
131. Wood-Kaczmar A, Gandhi S, Yao Z et al (2008) PINK1 is necessary for long term survival and mitochondrial function in human dopaminergic neurons. *PLoS one* 3:e2455
132. Deng H, Jankovic J, Guo Y et al (2005) Small interfering RNA targeting the PINK1 induces apoptosis in dopaminergic cells SH-SY5Y. *Biochemical and biophysical research communications* 337:1133-1138
133. Wang HL, Chou AH, Wu AS et al (2011) PARK6 PINK1 mutants are defective in maintaining mitochondrial membrane potential and inhibiting ROS formation of substantia nigra dopaminergic neurons. *Biochim Biophys Acta* 1812:674-684
134. Exner N, Treske B, Paquet D et al (2007) Loss-of-function of human PINK1 results in mitochondrial pathology and can be rescued by parkin. *J Neurosci* 27:12413-12418

135. Petit A, Kawarai T, Paitel E et al (2005) Wild-type PINK1 prevents basal and induced neuronal apoptosis, a protective effect abrogated by Parkinson disease-related mutations. *The Journal of biological chemistry* 280:34025-34032
136. Sandebring A, Thomas KJ, Beilina A et al (2009) Mitochondrial alterations in PINK1 deficient cells are influenced by calcineurin-dependent dephosphorylation of dynamin-related protein 1. *PLoS one* 4:e5701
137. Haque ME, Thomas KJ, D'souza C et al (2008) Cytoplasmic Pink1 activity protects neurons from dopaminergic neurotoxin MPTP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:1716-1721
138. Morais VA, Verstreken P, Roethig A et al (2009) Parkinson's disease mutations in PINK1 result in decreased Complex I activity and deficient synaptic function. *EMBO Mol Med* 1:99-111
139. Gandhi S, Wood-Kaczmar A, Yao Z et al (2009) PINK1-associated Parkinson's disease is caused by neuronal vulnerability to calcium-induced cell death. *Mol Cell* 33:627-638
140. Marongiu R, Spencer B, Crews L et al (2009) Mutant Pink1 induces mitochondrial dysfunction in a neuronal cell model of Parkinson's disease by disturbing calcium flux. *J Neurochem* 108:1561-1574
141. Knott AB, Bossy-Wetzel E (2008) Impairing the mitochondrial fission and fusion balance: a new mechanism of neurodegeneration. *Ann N Y Acad Sci* 1147:283-292
142. Jones AC, Yamamura Y, Almasy L et al (1998) Autosomal recessive juvenile parkinsonism maps to 6q25.2-q27 in four ethnic groups: detailed genetic mapping of the linked region. *Am J Hum Genet* 63:80-87
143. Leroy E, Anastasopoulos D, Konitsiotis S et al (1998) Deletions in the Parkin gene and genetic heterogeneity in a Greek family with early onset Parkinson's disease. *Human genetics* 103:424-427
144. Hattori N, Matsumine H, Asakawa S et al (1998) Point mutations (Thr240Arg and Gln311Stop) [correction of Thr240Arg and Ala311Stop] in the Parkin gene. *Biochemical and biophysical research communications* 249:754-758
145. Shimura H, Hattori N, Kubo S et al (1999) Immunohistochemical and subcellular localization of Parkin protein: absence of protein in autosomal recessive juvenile parkinsonism patients. *Ann.Neurol.* 45:668-672
146. Shimura H, Hattori N, Kubo S et al (2000) Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. *Nat.Genet.* 25:302-305
147. Imai Y, Soda M, Takahashi R (2000) Parkin suppresses unfolded protein stress-induced cell death through its E3 ubiquitin-protein ligase activity. *The Journal of biological chemistry* 275:35661-35664
148. Zhang Y, Dawson VL, Dawson TM (2000) Oxidative stress and genetics in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 7:240-250
149. Beasley SA, Hristova VA, Shaw GS (2007) Structure of the Parkin in-between-ring domain provides insights for E3-ligase dysfunction in autosomal recessive Parkinson's disease. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S A* 104:3095-3100
150. Kitada T, Asakawa S, Minoshima S et al (2000) Molecular cloning, gene expression, and identification of a splicing variant of the mouse parkin gene. *Mamm Genome* 11:417-421
151. Kao SY (2009) DNA damage induces nuclear translocation of parkin. *J Biomed Sci* 16:67
152. Da Costa CA, Sunyach C, Giaime E et al (2009) Transcriptional repression of p53 by parkin and impairment by mutations associated with autosomal recessive juvenile Parkinson's disease. *Nat.Cell Biol.* 11:1370-1375

## Bibliografía

153. Durcan TM, Fon EA (2015) The three 'P's of mitophagy: PARKIN, PINK1, and post-translational modifications. *Genes & development* 29:989-999
154. Dachselt JC, Lucking CB, Deeg S et al (2005) Parkin interacts with the proteasome subunit alpha4. *FEBS Lett* 579:3913-3919
155. Ren Y, Zhao J, Feng J (2003) Parkin binds to alpha/beta tubulin and increases their ubiquitination and degradation. *J Neurosci* 23:3316-3324
156. Huynh DP, Scoles DR, Ho TH et al (2000) Parkin is associated with actin filaments in neuronal and nonneuronal cells. *Ann.Neurol.* 48:737-744
157. Suzuki Y, Imai Y, Nakayama H et al (2001) A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. *Mol Cell* 8:613-621
158. Darios F, Corti O, Lucking CB et al (2003) Parkin prevents mitochondrial swelling and cytochrome c release in mitochondria-dependent cell death. *Hum Mol Genet* 12:517-526
159. Geisler S, Holmstrom KM, Skujat D et al (2010) PINK1/Parkin-mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1. *Nat Cell Biol* 12:119-131
160. Fallon L, Moreau F, Croft BG et al (2002) Parkin and CASK/LIN-2 associate via a PDZ-mediated interaction and are co-localized in lipid rafts and postsynaptic densities in brain. *The Journal of biological chemistry* 277:486-491
161. Chung KK, Dawson VL, Dawson TM (2001) The role of the ubiquitin-proteasomal pathway in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci* 24:S7-14
162. Liu X, Shibata T, Hisaka S et al (2009) Astaxanthin inhibits reactive oxygen species-mediated cellular toxicity in dopaminergic SH-SY5Y cells via mitochondria-targeted protective mechanism. *Brain Res.* 1254:18-27
163. Kalia SK, Lee S, Smith PD et al (2004) BAG5 inhibits parkin and enhances dopaminergic neuron degeneration. *Neuron* 44:931-945
164. Moore DJ, Zhang L, Troncoso J et al (2005) Association of DJ-1 and parkin mediated by pathogenic DJ-1 mutations and oxidative stress. *Hum Mol Genet* 14:71-84
165. Yu F, Zhou J (2008) Parkin is ubiquitinated by Nrdp1 and abrogates Nrdp1-induced oxidative stress. *Neurosci Lett* 440:4-8
166. Kitada T, Asakawa S, Matsumine H et al (2000) Progress in the clinical and molecular genetics of familial parkinsonism. *Neurogenetics.* 2:207-218
167. Moore DJ (2006) Parkin: a multifaceted ubiquitin ligase. *Biochem.Soc.Trans.* 34:749-753
168. Hyun DH, Lee M, Hattori N et al (2002) Effect of wild-type or mutant Parkin on oxidative damage, nitric oxide, antioxidant defenses, and the proteasome. *The Journal of biological chemistry* 277:28572-28577
169. Safadi SS, Shaw GS (2010) Differential interaction of the E3 ligase parkin with the proteasomal subunit S5a and the endocytic protein Eps15. *The Journal of biological chemistry* 285:1424-1434
170. Da Costa CA, Ancolio K, Checler F (2000) Wild-type but not Parkinson's disease-related ala-53 --> Thr mutant alpha -synuclein protects neuronal cells from apoptotic stimuli. *J.Biol.Chem.* 275:24065-24069
171. Rakovic A, Grunewald A, Kottwitz J et al (2011) Mutations in PINK1 and Parkin impair ubiquitination of Mitofusins in human fibroblasts. *PloS one* 6:e16746
172. Deng H, Dodson MW, Huang H et al (2008) The Parkinson's disease genes pink1 and parkin promote mitochondrial fission and/or inhibit fusion in Drosophila. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:14503-14508
173. Ziviani E, Whitworth AJ (2010) How could Parkin-mediated ubiquitination of mitofusin promote mitophagy? *Autophagy* 6

174. Mckeon JE, Sha D, Li L et al (2015) Parkin-mediated K63-polyubiquitination targets ubiquitin C-terminal hydrolase L1 for degradation by the autophagy-lysosome system. *Cellular and molecular life sciences* : CMLS 72:1811-1824
175. Kolesnick RN, Kronke M (1998) Regulation of ceramide production and apoptosis. *Annu Rev Physiol* 60:643-665
176. Mathias S, Pena LA, Kolesnick RN (1998) Signal transduction of stress via ceramide. *The Biochemical journal* 335 ( Pt 3):465-480
177. Basu S, Kolesnick R (1998) Stress signals for apoptosis: ceramide and c-Jun kinase. *Oncogene* 17:3277-3285
178. Bourbon NA, Yun J, Berkey D et al (2001) Inhibitory actions of ceramide upon PKC-epsilon/ERK interactions. *Am J Physiol Cell Physiol* 280:C1403-1411
179. Gill JS, Windebank AJ (2000) Ceramide initiates NFkappaB-mediated caspase activation in neuronal apoptosis. *Neurobiol Dis* 7:448-461
180. Kishikawa K, Chalfant CE, Perry DK et al (1999) Phosphatidic acid is a potent and selective inhibitor of protein phosphatase 1 and an inhibitor of ceramide-mediated responses. *The Journal of biological chemistry* 274:21335-21341
181. Spiegel S, Foster D, Kolesnick R (1996) Signal transduction through lipid second messengers. *Curr Opin Cell Biol* 8:159-167
182. Arboleda G, Morales LC, Benitez B et al (2009) Regulation of ceramide-induced neuronal death: cell metabolism meets neurodegeneration. *Brain Res Rev* 59:333-346
183. Napolitano A, Pezzella A, Prota G (1999) New reaction pathways of dopamine under oxidative stress conditions: nonenzymatic iron-assisted conversion to norepinephrine and the neurotoxins 6-hydroxydopamine and 6, 7-dihydroxytetrahydroisoquinoline. *Chem Res Toxicol* 12:1090-1097
184. Siskind LJ, Colombini M (2000) The lipids C2- and C16-ceramide form large stable channels. Implications for apoptosis. *The Journal of biological chemistry* 275:38640-38644
185. Siskind LJ, Kolesnick RN, Colombini M (2006) Ceramide forms channels in mitochondrial outer membranes at physiologically relevant concentrations. *Mitochondrion* 6:118-125
186. Di Paola M, Cocco T, Lorusso M (2000) Ceramide interaction with the respiratory chain of heart mitochondria. *Biochemistry* 39:6660-6668
187. Guduz TI, Tserng KY, Hoppel CL (1997) Direct inhibition of mitochondrial respiratory chain complex III by cell-permeable ceramide. *The Journal of biological chemistry* 272:24154-24158
188. Scarlatti F, Bauvy C, Ventruti A et al (2004) Ceramide-mediated macroautophagy involves inhibition of protein kinase B and up-regulation of beclin 1. *The Journal of biological chemistry* 279:18384-18391
189. Schubert KM, Scheid MP, Duronio V (2000) Ceramide inhibits protein kinase B/Akt by promoting dephosphorylation of serine 473. *The Journal of biological chemistry* 275:13330-13335
190. Zhou H, Summers SA, Birnbaum MJ et al (1998) Inhibition of Akt kinase by cell-permeable ceramide and its implications for ceramide-induced apoptosis. *The Journal of biological chemistry* 273:16568-16575
191. Edinger AL (2009) Starvation in the midst of plenty: making sense of ceramide-induced autophagy by analysing nutrient transporter expression. *Biochemical Society transactions* 37:253-258

192. Guenther GG, Edinger AL (2009) A new take on ceramide: starving cells by cutting off the nutrient supply. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 8:1122-1126
193. Peralta ER, Edinger AL (2009) Ceramide-induced starvation triggers homeostatic autophagy. *Autophagy* 5:407-409
194. Sun T, Li D, Wang L et al (2011) c-Jun NH2-terminal kinase activation is essential for up-regulation of LC3 during ceramide-induced autophagy in human nasopharyngeal carcinoma cells. *Journal of translational medicine* 9:161
195. Jiang W, Ogretmen B (2014) Autophagy paradox and ceramide. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1841:783-792
196. Sentelle RD, Senkal CE, Jiang W et al (2012) Ceramide targets autophagosomes to mitochondria and induces lethal mitophagy. *Nature chemical biology* 8:831-838
197. Jackson WT, Giddings TH, Taylor MP et al (2005) Subversion of cellular autophagosomal machinery by RNA viruses. *PLoS biology* 3:e156
198. Kimura S, Noda T, Yoshimori T (2007) Dissection of the autophagosome maturation process by a novel reporter protein, tandem fluorescent-tagged LC3. *Autophagy* 3:452-460
199. Qi Y, Wang JK, Mcmillian M et al (1997) Characterization of a CNS cell line, CAD, in which morphological differentiation is initiated by serum deprivation. *J Neurosci* 17:1217-1225
200. Suri C, Fung BP, Tischler AS et al (1993) Catecholaminergic cell lines from the brain and adrenal glands of tyrosine hydroxylase-SV40 T antigen transgenic mice. *J Neurosci* 13:1280-1291
201. Baraban SC, Lothman EW, Lee A et al (1995) Kappa opioid receptor-mediated suppression of voltage-activated potassium current in a catecholaminergic neuronal cell line. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 273:927-933
202. Lazaroff M, Qi Y, Chikaraishi DM (1998) Differentiation of a catecholaminergic CNS cell line modifies tyrosine hydroxylase transcriptional regulation. *J.Neurochem.* 71:51-59
203. Lazaroff M, Dunlap K, Chikaraishi DM (1996) A CNS catecholaminergic cell line expresses voltage-gated currents. *J Membr Biol* 151:279-291
204. Horton CD, Qi Y, Chikaraishi D et al (2001) Neurotrophin-3 mediates the autocrine survival of the catecholaminergic CAD CNS neuronal cell line. *J Neurochem* 76:201-209
205. Wang H, Oxford GS (2000) Voltage-dependent ion channels in CAD cells: A catecholaminergic neuronal line that exhibits inducible differentiation. *J Neurophysiol* 84:2888-2895
206. Hashemi SH, Li JY, Faigle R et al (2003) Adrenergic differentiation and SSR2a receptor expression in CAD-cells cultured in serum-free medium. *Neurochem.Int.* 42:9-17
207. Bai X, Strong R (2014) Expression of synaptophysin protein in different dopaminergic cell lines. *Journal of biochemical and pharmacological research* 2:185-190
208. Byun J, Kim BT, Kim YT et al (2012) Slit2 inactivates GSK3 $\beta$  to signal neurite outgrowth inhibition. *PLoS one* 7:e51895
209. Arboleda G, Waters C, Gibson RM (2005) Metabolic activity: a novel indicator of neuronal survival in the murine dopaminergic cell line CAD. *J Mol Neurosci* 27:65-77
210. Biedler JL, Helson L, Spengler BA (1973) Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer research* 33:2643-2652
211. 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* 123:1086-1092

212. Singh J, Kaur G (2007) Transcriptional regulation of polysialylated neural cell adhesion molecule expression by NMDA receptor activation in retinoic acid-differentiated SH-SY5Y neuroblastoma cultures. *Brain Research* 1154:8-21
213. Carmichael J, Degraff WG, Gazdar AF et al (1987) Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer research* 47:936-942
214. Scudiero DA, Shoemaker RH, Paull KD et al (1988) Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer research* 48:4827-4833
215. Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65:55-63
216. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M et al (2006) The real-time polymerase chain reaction. *Molecular aspects of medicine* 27:95-125
217. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. *Methods* 25:402-408
218. Oppenheim RW (1991) Cell death during development of the nervous system. *Annu Rev Neurosci* 14:453-501
219. Williams RW, Herrup K (1988) The control of neuron number. *Annu Rev Neurosci* 11:423-453
220. Von Bohlen Und Halbach O, Unsicker K (2009) Neurotrophic support of midbrain dopaminergic neurons. *Adv Exp Med Biol* 651:73-80
221. Dudek H, Datta SR, Franke TF et al (1997) Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt. *Science* 275:661-665
222. Brunet A, Datta SR, Greenberg ME (2001) Transcription-dependent and -independent control of neuronal survival by the PI3K-Akt signaling pathway. *Curr Opin Neurobiol.* 11:297-305
223. Huang EJ, Reichardt LF (2001) Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci.* 24:677-736
224. Reichardt LF (2006) Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 361:1545-1564
225. Twiss JL, Chang JH, Schanen NC (2006) Pathophysiological Mechanisms for Actions of the Neurotrophins. *Brain Pathology* 16:320-332
226. Yano H, Chao MV (2000) Neurotrophin receptor structure and interactions. *Pharmaceutica Acta Helvetiae* 74:253-260
227. Lanave C, Colangelo AM, Saccone C et al (2007) Molecular evolution of the neurotrophin family members and their Trk receptors. *Gene* 394:1-12
228. Schneider R, Schweiger M (1991) A novel modular mosaic of cell adhesion motifs in the extracellular domains of the neurogenic trk and trkB tyrosine kinase receptors. *Oncogene* 6:1807-1811
229. Lin LF, Doherty DH, Lile JD et al (1993) GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *Science* 260:1130-1132
230. Sariola H, Saarma M (2003) Novel functions and signalling pathways for GDNF. *Journal of cell science* 116:3855-3862
231. Voutilainen MH, Bäck S, Pörsti E et al (2009) Mesencephalic Astrocyte-Derived Neurotrophic Factor Is Neurorestorative in Rat Model of Parkinson's Disease. *The Journal of Neuroscience* 29:9651-9659

232. Lindholm P, Voutilainen MH, Lauren J et al (2007) Novel neurotrophic factor CDFN protects and rescues midbrain dopamine neurons in vivo. *Nature* 448:73-77
233. Humbel RE (1990) Insulin-like growth factors I and II. *European Journal of Biochemistry* 190:445-462
234. Russo VC, Gluckman PD, Feldman EL et al (2005) The Insulin-Like Growth Factor System and Its Pleiotropic Functions in Brain. *Endocrine Reviews* 26:916-943
235. Wine R, Mcpherson C, Harry G (2009) IGF-1 and pAKT Signaling Promote Hippocampal CA1 Neuronal Survival Following Injury to Dentate Granule Cells. *Neurotoxicity research* 16:280-292
236. Canossa M, Rovelli G, Shooter EM (1996) Transphosphorylation of the Neurotrophin Trk Receptors. *Journal of Biological Chemistry* 271:5812-5818
237. Ponta H, Sherman L, Herrlich PA (2003) CD44: From adhesion molecules to signalling regulators. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:33-45
238. Trusolino L, Bertotti A, Comoglio PM (2001) A Signaling Adapter Function for  $\alpha 6\beta 4$  Integrin in the Control of HGF-Dependent Invasive Growth. *Cell* 107:643-654
239. Klominek J, Baskin B, Hauenberger D (1998) Platelet-derived growth factor (PDGF) BB acts as chemoattractant for human malignant mesothelioma cells via PDGF receptor b - integrin  $\alpha 3\beta 1$  interaction. *Clinical and Experimental Metastasis* 16:529-539
240. Morrison H, Sperka T, Manent J et al (2007) Merlin/Neurofibromatosis Type 2 Suppresses Growth by Inhibiting the Activation of Ras and Rac. *Cancer Research* 67:520-527
241. Orian-Rousseau V, Morrison H, Matzke A et al (2007) Hepatocyte Growth Factor-induced Ras Activation Requires ERM Proteins Linked to Both CD44v6 and F-Actin. *Molecular Biology of the Cell* 18:76-83
242. Sperka T, Geissler KJ, Merkel U et al (2011) Activation of Ras requires the ERM-dependent link of actin to the plasma membrane. *PloS one* 6:e27511
243. Brummer T, Schmitz-Peiffer C, Daly RJ (2010) Docking proteins. *FEBS Journal* 277:4356-4369
244. Vadas O, Burke JE, Zhang X et al (2011) Structural Basis for Activation and Inhibition of Class I Phosphoinositide 3-Kinases. *Sci. Signal.* 4:re2-
245. Choi Y, Zhang J, Murga C et al (2002) PTEN, but not SHIP and SHIP2, suppresses the PI3K/Akt pathway and induces growth inhibition and apoptosis of myeloma cells. *Oncogene* 21:5289-5300
246. Song G, Ouyang G, Bao S (2005) The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *J Cell Mol Med* 9:59-71
247. Andjelkovic M, Alessi DR, Meier R et al (1997) Role of translocation in the activation and function of protein kinase B. *The Journal of biological chemistry* 272:31515-31524
248. Bayascas JR, Alessi DR (2005) Regulation of Akt/PKB Ser473 phosphorylation. *Mol Cell* 18:143-145
249. Persad S, Attwell S, Gray V et al (2001) Regulation of Protein Kinase B/Akt-Serine 473 Phosphorylation by Integrin-linked Kinase. *Journal of Biological Chemistry* 276:27462-27469
250. Hresko RC, Mueckler M (2005) mTOR.RICTOR is the Ser473 kinase for Akt/protein kinase B in 3T3-L1 adipocytes. *The Journal of biological chemistry* 280:40406-40416
251. Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM et al (2005) Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 307:1098-1101

252. Lu D, Huang J, Basu A (2006) Protein kinase Cepsilon activates protein kinase B/Akt via DNA-PK to protect against tumor necrosis factor-alpha-induced cell death. *The Journal of biological chemistry* 281:22799-22807
253. Viniegra JG, Martinez N, Modirassari P et al (2005) Full activation of PKB/Akt in response to insulin or ionizing radiation is mediated through ATM. *The Journal of biological chemistry* 280:4029-4036
254. Scheid MP, Marignani PA, Woodgett JR (2002) Multiple phosphoinositide 3-kinase-dependent steps in activation of protein kinase B. *Molecular and cellular biology* 22:6247-6260
255. Toker A, Newton AC (2000) Akt/protein kinase B is regulated by autophosphorylation at the hypothetical PDK-2 site. *The Journal of biological chemistry* 275:8271-8274
256. Yang J, Cron P, Good VM et al (2002) Crystal structure of an activated Akt/protein kinase B ternary complex with GSK3-peptide and AMP-PNP. *Nat Struct Biol* 9:940-944
257. Meier R, Alessi DR, Cron P et al (1997) Mitogenic activation, phosphorylation, and nuclear translocation of protein kinase Bbeta. *The Journal of biological chemistry* 272:30491-30497
258. Datta SR, Dudek H, Tao X et al (1997) Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 91:231-241
259. Claerhout S, Decraene D, Van Laethem A et al (2007) AKT delays the early-activated apoptotic pathway in UVB-irradiated keratinocytes via BAD translocation. *J Invest Dermatol* 127:429-438
260. Gardai SJ, Hildeman DA, Frankel SK et al (2004) Phosphorylation of Bax Ser184 by Akt regulates its activity and apoptosis in neutrophils. *The Journal of biological chemistry* 279:21085-21095
261. Qi XJ, Wildey GM, Howe PH (2006) Evidence that Ser87 of BimEL is phosphorylated by Akt and regulates BimEL apoptotic function. *The Journal of biological chemistry* 281:813-823
262. Cardone MH, Roy N, Stennicke HR et al (1998) Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* 282:1318-1321
263. Kim AH, Khursigara G, Sun X et al (2001) Akt phosphorylates and negatively regulates apoptosis signal-regulating kinase 1. *Molecular and cellular biology* 21:893-901
264. Fukunaga K, Ishigami T, Kawano T (2005) Transcriptional regulation of neuronal genes and its effect on neural functions: expression and function of forkhead transcription factors in neurons. *J Pharmacol Sci* 98:205-211
265. Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ et al (1999) Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 96:857-868
266. Burgering BM, Medema RH (2003) Decisions on life and death: FOXO Forkhead transcription factors are in command when PKB/Akt is off duty. *J Leukoc Biol* 73:689-701
267. Pugazhenti S, Nesterova A, Sable C et al (2000) Akt/protein kinase B up-regulates Bcl-2 expression through cAMP-response element-binding protein. *The Journal of biological chemistry* 275:10761-10766
268. Du K, Montminy M (1998) CREB is a regulatory target for the protein kinase Akt/PKB. *The Journal of biological chemistry* 273:32377-32379
269. Del Peso L, Gonzalez-Garcia M, Page C et al (1997) Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science* 278:687-689
270. Madrid LV, Mayo MW, Reuther JY et al (2001) Akt stimulates the transactivation potential of the RelA/p65 Subunit of NF-kappa B through utilization of the Ikappa B kinase and



- activation of the mitogen-activated protein kinase p38. *The Journal of biological chemistry* 276:18934-18940
271. Abell K, Watson CJ (2005) The Jak/Stat pathway: a novel way to regulate PI3K activity. *Cell Cycle* 4:897-900
  272. Gottlieb TM, Leal JF, Seger R et al (2002) Cross-talk between Akt, p53 and Mdm2: possible implications for the regulation of apoptosis. *Oncogene* 21:1299-1303
  273. Mayo LD, Donner DB (2001) A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:11598-11603
  274. Basu S, Totty NF, Irwin MS et al (2003) Akt phosphorylates the Yes-associated protein, YAP, to induce interaction with 14-3-3 and attenuation of p73-mediated apoptosis. *Mol Cell* 11:11-23
  275. Cross DA, Alessi DR, Cohen P et al (1995) Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* 378:785-789
  276. Maurer U, Charvet C, Wagman AS et al (2006) Glycogen synthase kinase-3 regulates mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis by destabilization of MCL-1. *Mol Cell* 21:749-760
  277. Beurel E, Jope RS (2006) The paradoxical pro- and anti-apoptotic actions of GSK3 in the intrinsic and extrinsic apoptosis signaling pathways. *Prog Neurobiol* 79:173-189
  278. Diehl JA, Cheng M, Roussel MF et al (1998) Glycogen synthase kinase-3 $\beta$  regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes & development* 12:3499-3511
  279. Welcker M, Singer J, Loeb KR et al (2003) Multisite phosphorylation by Cdk2 and GSK3 controls cyclin E degradation. *Mol Cell* 12:381-392
  280. Wei W, Jin J, Schlisio S et al (2005) The v-Jun point mutation allows c-Jun to escape GSK3-dependent recognition and destruction by the Fbw7 ubiquitin ligase. *Cancer cell* 8:25-33
  281. Welcker M, Orian A, Jin J et al (2004) The Fbw7 tumor suppressor regulates glycogen synthase kinase 3 phosphorylation-dependent c-Myc protein degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:9085-9090
  282. Skeen JE, Bhaskar PT, Chen CC et al (2006) Akt deficiency impairs normal cell proliferation and suppresses oncogenesis in a p53-independent and mTORC1-dependent manner. *Cancer Cell* 10:269-280
  283. Thedieck K, Polak P, Kim ML et al (2007) PRAS40 and PRR5-like protein are new mTOR interactors that regulate apoptosis. *PloS one* 2:e1217
  284. Cai SL, Tee AR, Short JD et al (2006) Activity of TSC2 is inhibited by AKT-mediated phosphorylation and membrane partitioning. *J Cell Biol* 173:279-289
  285. Mamane Y, Petroulakis E, Rong L et al (2004) eIF4E--from translation to transformation. *Oncogene* 23:3172-3179
  286. Jastrzebski K, Hannan KM, Tchoubrieva EB et al (2007) Coordinate regulation of ribosome biogenesis and function by the ribosomal protein S6 kinase, a key mediator of mTOR function. *Growth Factors* 25:209-226
  287. King FW, Skeen J, Hay N et al (2004) Inhibition of Chk1 by activated PKB/Akt. *Cell Cycle* 3:634-637
  288. Puc J, Parsons R (2005) PTEN loss inhibits CHK1 to cause double stranded-DNA breaks in cells. *Cell Cycle* 4:927-929
  289. Shtivelman E, Sussman J, Stokoe D (2002) A role for PI 3-kinase and PKB activity in the G2/M phase of the cell cycle. *Current biology* : CB 12:919-924

290. Leon J, Guerrero I, Pellicer A (1987) Differential expression of the ras gene family in mice. *Molecular and cellular biology* 7:1535-1540
291. Crespo P, Leon J (2000) Ras proteins in the control of the cell cycle and cell differentiation. *Cell Mol Life Sci* 57:1613-1636
292. Castellano E, Santos E (2011) Functional specificity of ras isoforms: so similar but so different. *Genes Cancer* 2:216-231
293. Malumbres M, Pellicer A (1998) RAS pathways to cell cycle control and cell transformation. *Front Biosci* 3:d887-912
294. Dance M, Montagner A, Salles J-P et al (2008) The molecular functions of Shp2 in the Ras/Mitogen-activated protein kinase (ERK1/2) pathway. *Cellular signalling* 20:453-459
295. Ong SH, Guy GR, Hadari YR et al (2000) FRS2 Proteins Recruit Intracellular Signaling Pathways by Binding to Diverse Targets on Fibroblast Growth Factor and Nerve Growth Factor Receptors. *Molecular and cellular biology* 20:979-989
296. Hadari YR, Gotoh N, Kouhara H et al (2001) Critical role for the docking-protein FRS2 alpha in FGF receptor-mediated signal transduction pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:8578-8583
297. Lowenstein EJ, Daly RJ, Batzer AG et al (1992) The SH2 and SH3 domain-containing protein GRB2 links receptor tyrosine kinases to ras signaling. *Cell* 70:431-442
298. Rozakis-Adcock M, Mcglade J, Mbamalu G et al (1992) Association of the Shc and Grb2/Sem5 SH2-containing proteins is implicated in activation of the Ras pathway by tyrosine kinases. *Nature* 360:689-692
299. Roskoski Jr R (2010) RAF protein-serine/threonine kinases: Structure and regulation. *Biochemical and biophysical research communications* 399:313-317
300. Zheng CF, Guan KL (1994) Activation of MEK family kinases requires phosphorylation of two conserved Ser/Thr residues. *EMBO J* 13:1123-1131
301. Ramos JW (2008) The regulation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) in mammalian cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 40:2707-2719
302. Cagnol S, Chambard J-C (2010) ERK and cell death: Mechanisms of ERK-induced cell death – apoptosis, autophagy and senescence. *FEBS Journal* 277:2-21
303. Frödin M, Gammeltoft S (1999) Role and regulation of 90 kDa ribosomal S6 kinase (RSK) in signal transduction. *Molecular and Cellular Endocrinology* 151:65-77
304. Balmanno K, Cook SJ (2008) Tumour cell survival signalling by the ERK1/2 pathway. *Cell Death Differ* 16:368-377
305. She Q-B, Ma W-Y, Zhong S et al (2002) Activation of JNK1, RSK2, and MSK1 Is Involved in Serine 112 Phosphorylation of Bad by Ultraviolet B Radiation. *Journal of Biological Chemistry* 277:24039-24048
306. Yang JY, Zong CS, Xia W et al (2008) ERK promotes tumorigenesis by inhibiting FOXO3a via MDM2-mediated degradation. *Nat Cell Biol* 10:138-148
307. Riccio A, Ahn S, Davenport CM et al (1999) Mediation by a CREB family transcription factor of NGF-dependent survival of sympathetic neurons. *Science* 286:2358-2361
308. Ha S, Redmond L (2008) ERK mediates activity dependent neuronal complexity via sustained activity and CREB-mediated signaling. *Developmental Neurobiology* 68:1565-1579

309. Fukami K, Inanobe S, Kanemaru K et al (2010) Phospholipase C is a key enzyme regulating intracellular calcium and modulating the phosphoinositide balance. *Progress in Lipid Research* 49:429-437
310. Rhee SG (2001) Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Annu Rev Biochem* 70:281-312
311. Kim MJ, Chang JS, Park SK et al (2000) Direct interaction of SOS1 Ras exchange protein with the SH3 domain of phospholipase C-gamma1. *Biochemistry* 39:8674-8682
312. Minamikawa T, Sriratana A, Williams DA et al (1999) Chloromethyl-X-rosamine (MitoTracker Red) photosensitises mitochondria and induces apoptosis in intact human cells. *Journal of cell science* 112:2419-2430
313. Tashiro A, Minden A, Yuste R (2000) Regulation of Dendritic Spine Morphology by the Rho Family of Small GTPases: Antagonistic Roles of Rac and Rho. *Cerebral Cortex* 10:927-938
314. Govek E-E, Newey SE, Van Aelst L (2005) The role of the Rho GTPases in neuronal development. *Genes & development* 19:1-49
315. Stankiewicz TR, Linseman DA (2014) Rho family GTPases: key players in neuronal development, neuronal survival, and neurodegeneration. *Frontiers in cellular neuroscience* 8:314
316. Amo T, Sato S, Saiki S et al (2011) Mitochondrial membrane potential decrease caused by loss of PINK1 is not due to proton leak, but to respiratory chain defects. *Neurobiology of disease* 41:111-118
317. Akundi RS, Zhi L, Sullivan PG et al (2013) Shared and cell type-specific mitochondrial defects and metabolic adaptations in primary cells from PINK1-deficient mice. *Neuro-degenerative diseases* 12:136-149
318. Requejo-Aguilar R, Lopez-Fabuel I, Fernandez E et al (2014) PINK1 deficiency sustains cell proliferation by reprogramming glucose metabolism through HIF1. *Nature communications* 5:4514
319. Yao Z, Gandhi S, Burchell VS et al (2011) Cell metabolism affects selective vulnerability in PINK1-associated Parkinson's disease. *Journal of cell science* 124:4194-4202
320. Presgraves SP, Ahmed T, Borwege S et al (2004) Terminally differentiated SH-SY5Y cells provide a model system for studying neuroprotective effects of dopamine agonists. *Neurotoxicity research* 5:579-598
321. Encinas M, Iglesias M, Llecha N et al (1999) Extracellular-regulated kinases and phosphatidylinositol 3-kinase are involved in brain-derived neurotrophic factor-mediated survival and neuritogenesis of the neuroblastoma cell line SH-SY5Y. *J Neurochem* 73:1409-1421
322. Rodríguez Y (2006) Trabajo de Grado: Protección contra la neurotoxicidad inducida por ceramida: Efecto de factores de crecimiento, inhibidores de proteasas y contribución de la vía PI3K/AKT en un modelo neuronal mesencefálico. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Maestría en Biología. Bogotá. p 23-25. .
323. Hayashi Y, Kitaoka Y, Munemasa Y et al (2007) Neuroprotective effect of 17beta-estradiol against N-methyl-D-aspartate-induced retinal neurotoxicity via p-ERK induction. *Journal of neuroscience research* 85:386-394
324. Pernet V, Hauswirth WW, Di Polo A (2005) Extracellular signal-regulated kinase 1/2 mediates survival, but not axon regeneration, of adult injured central nervous system neurons in vivo. *J Neurochem* 93:72-83
325. Yang X, Wei A, Liu Y et al (2013) IGF-1 protects retinal ganglion cells from hypoxia-induced apoptosis by activating the Erk-1/2 and Akt pathways. *Molecular Vision* 19:1901-1912

326. Zhuang S, Schnellmann RG (2006) A death-promoting role for extracellular signal-regulated kinase. *J Pharmacol Exp Ther* 319:991-997
327. Dibble CC, Asara JM, Manning BD (2009) Characterization of Rictor Phosphorylation Sites Reveals Direct Regulation of mTOR Complex 2 by S6K1. *Molecular and cellular biology* 29:5657-5670
328. Contreras-Zarate MJ, Nino A, Rojas L et al (2015) Silencing of PINK1 Inhibits Insulin-Like Growth Factor-1-Mediated Receptor Activation and Neuronal Survival. *J Mol Neurosci* 56:188-197
329. Mccoy MK, Kaganovich A, Rudenko IN et al (2014) Hexokinase activity is required for recruitment of parkin to depolarized mitochondria. *Hum Mol Genet* 23:145-156
330. Gual P, Le Marchand-Brustel Y, Tanti J-F (2005) Positive and negative regulation of insulin signaling through IRS-1 phosphorylation. *Biochimie* 87:99-109
331. Vojtek AB, Taylor J, Deruiter SL et al (2003) Akt regulates basic helix-loop-helix transcription factor-coactivator complex formation and activity during neuronal differentiation. *Molecular and cellular biology* 23:4417-4427
332. Peltier J, O'neill A, Schaffer DV (2007) PI3K/Akt and CREB regulate adult neural hippocampal progenitor proliferation and differentiation. *Developmental neurobiology* 67:1348-1361
333. Le Grand JN, Gonzalez-Cano L, Pavlou MA et al (2015) Neural stem cells in Parkinson's disease: a role for neurogenesis defects in onset and progression. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 72:773-797
334. Pertz O (2010) Spatio-temporal Rho GTPase signaling - where are we now? *Journal of cell science* 123:1841-1850
335. Li Z, Aizenman CD, Cline HT (2002) Regulation of rho GTPases by crosstalk and neuronal activity in vivo. *Neuron* 33:741-750
336. Chan D, Citro A, Cordy JM et al (2011) Rac1 protein rescues neurite retraction caused by G2019S leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2). *The Journal of biological chemistry* 286:16140-16149
337. Sánchez S, Jiménez C, Carrera AC et al (2004) A cAMP-activated pathway, including PKA and PI3K, regulates neuronal differentiation. *Neurochemistry international* 44:231-242
338. Sanchez-Mora RM, Arboleda H, Arboleda G (2012) PINK1 overexpression protects against C2-ceramide-induced CAD cell death through the PI3K/AKT pathway. *J Mol Neurosci* 47:582-594
339. Haque ME, Thomas KJ, D'souza C et al (2008) Cytoplasmic Pink1 activity protects neurons from dopaminergic neurotoxin MPTP. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105:1716-1721
340. Durgados L, Nidadavolu P, Valli RK et al (2012) Redox modification of Akt mediated by the dopaminergic neurotoxin MPTP, in mouse midbrain, leads to down-regulation of pAkt. *FASEB J* 26:1473-1483
341. Avila-Gomez IC, Velez-Pardo C, Jimenez-Del-Rio M (2010) Effects of insulin-like growth factor-1 on rotenone-induced apoptosis in human lymphocyte cells. *Basic Clin.Pharmacol.Toxicol.* 106:53-61
342. Ha KS, Kim KM, Kwon YG et al (2003) Nitric oxide prevents 6-hydroxydopamine-induced apoptosis in PC12 cells through cGMP-dependent PI3 kinase/Akt activation. *FASEB J.* 17:1036-1047

343. Shimoke K, Chiba H (2001) Nerve growth factor prevents 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced cell death via the Akt pathway by suppressing caspase-3-like activity using PC12 cells: relevance to therapeutical application for Parkinson's disease. *J.Neurosci.Res.* 63:402-409
344. Wu Z, Sawada T, Shiba K et al (2013) Tricornered/NDR kinase signaling mediates PINK1-directed mitochondrial quality control and tissue maintenance. *Genes & development* 27:157-162
345. Akundi RS, Zhi L, Bueler H (2012) PINK1 enhances insulin-like growth factor-1-dependent Akt signaling and protection against apoptosis. *Neurobiol Dis* 45:469-478
346. Choi I, Kim J, Jeong H-K et al (2013) Pink1 deficiency attenuates astrocyte proliferation through mitochondrial dysfunction, reduced akt and increased p38 mapk activation, and downregulation of egfr. *Glia* 61:800-812
347. Dagda RK, Cherra SJ, 3rd, Kulich SM et al (2009) Loss of PINK1 function promotes mitophagy through effects on oxidative stress and mitochondrial fission. *The Journal of biological chemistry* 284:13843-13855
348. Kim SJ, Winter K, Nian C et al (2005) Glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) stimulation of pancreatic beta-cell survival is dependent upon phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (PKB) signaling, inactivation of the forkhead transcription factor Foxo1, and down-regulation of bax expression. *The Journal of biological chemistry* 280:22297-22307
349. Cheng Z, Tseng Y, White MF (2010) Insulin signaling meets mitochondria in metabolism. *Trends Endocrinol Metab* 21:589-598
350. Betz C, Stracka D, Prescianotto-Baschong C et al (2013) Feature Article: mTOR complex 2-Akt signaling at mitochondria-associated endoplasmic reticulum membranes (MAM) regulates mitochondrial physiology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:12526-12534
351. Frey TG, Mannella CA (2000) The internal structure of mitochondria. *Trends in Biochemical Sciences* 25:319-324
352. Marchi S, Patergnani S, Pinton P (2014) The endoplasmic reticulum–mitochondria connection: One touch, multiple functions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1837:461-469
353. Van Vliet AR, Verfaillie T, Agostinis P (2014) New functions of mitochondria associated membranes in cellular signaling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1843:2253-2262
354. Mcinnes J (2013) Mitochondrial-associated metabolic disorders: foundations, pathologies and recent progress. *Nutr Metab (Lond)* 10:63
355. Liemburg-Apers D, Willems PGM, Koopman WH et al (2015) Interactions between mitochondrial reactive oxygen species and cellular glucose metabolism. *Arch Toxicol*:1-18
356. Turrens JF (2003) Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal of Physiology* 552:335-344
357. Xiong S, Mu T, Wang G et al (2014) Mitochondria-mediated apoptosis in mammals. *Protein & Cell* 5:737-749
358. Bereiter-Hahn J, Voth M (1994) Dynamics of mitochondria in living cells: shape changes, dislocations, fusion, and fission of mitochondria. *Microscopy research and technique* 27:198-219
359. Wu M, Kalyanasundaram A, Zhu J (2013) Structural and biomechanical basis of mitochondrial movement in eukaryotic cells. *International Journal of Nanomedicine* 8:4033-4042

360. Anesti V, Scorrano L (2006) The relationship between mitochondrial shape and function and the cytoskeleton. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1757:692-699
361. Narayanareddy BRJ, Vartiainen S, Hariri N et al (2014) A biophysical analysis of mitochondrial movement: differences between transport in neuronal cell bodies versus processes. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 15:762-771
362. Chan DC (2006) Mitochondrial fusion and fission in mammals. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* 22:79-99
363. Chen H, Chan DC (2009) Mitochondrial dynamics--fusion, fission, movement, and mitophagy--in neurodegenerative diseases. *Hum Mol Genet* 18:R169-176
364. Arduino DM, Esteves AR, Cardoso SM (2011) Mitochondrial fusion/fission, transport and autophagy in Parkinson's disease: when mitochondria get nasty. *Parkinsons Dis* 2011:767230
365. Burte F, Carelli V, Chinnery PF et al (2015) Disturbed mitochondrial dynamics and neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurol* 11:11-24
366. Itoh K, Nakamura K, Iijima M et al (2013) Mitochondrial Dynamics in Neurodegeneration. *Trends in Cell Biology* 23:64-71
367. Taguchi N, Ishihara N, Jofuku A et al (2007) Mitotic Phosphorylation of Dynamin-related GTPase Drp1 Participates in Mitochondrial Fission. *Journal of Biological Chemistry* 282:11521-11529
368. Ishihara N, Nomura M, Jofuku A et al (2009) Mitochondrial fission factor Drp1 is essential for embryonic development and synapse formation in mice. *Nat Cell Biol* 11:958-966
369. Wakabayashi J, Zhang Z, Wakabayashi N et al (2009) The dynamin-related GTPase Drp1 is required for embryonic and brain development in mice. *The Journal of Cell Biology* 186:805-816
370. Frank S, Gaume B, Bergmann-Leitner ES et al (2001) The Role of Dynamin-Related Protein 1, a Mediator of Mitochondrial Fission, in Apoptosis. *Developmental Cell* 1:515-525
371. Lee Y, Lee HY, Hanna RA et al (2011) Mitochondrial autophagy by Bnip3 involves Drp1-mediated mitochondrial fission and recruitment of Parkin in cardiac myocytes. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 301:H1924-1931
372. Cribbs JT, Strack S (2007) Reversible phosphorylation of Drp1 by cyclic AMP-dependent protein kinase and calcineurin regulates mitochondrial fission and cell death.
373. Cereghetti GM, Stangherlin A, Martins De Brito O et al (2008) Dephosphorylation by calcineurin regulates translocation of Drp1 to mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:15803-15808
374. Cho SG, Du Q, Huang S et al (2010) Drp1 dephosphorylation in ATP depletion-induced mitochondrial injury and tubular cell apoptosis. *American journal of physiology. Renal physiology* 299:F199-206
375. Harder Z, Zunino R, McBride H (2004) Sumo1 conjugates mitochondrial substrates and participates in mitochondrial fission. *Current biology : CB* 14:340-345
376. Pyakurel A, Savoia C, Hess D et al (2015) Extracellular Regulated Kinase Phosphorylates Mitofusin 1 to Control Mitochondrial Morphology and Apoptosis. *Molecular Cell* 58:244-254
377. Loson OC, Song Z, Chen H et al (2013) Fis1, Mff, MiD49, and MiD51 mediate Drp1 recruitment in mitochondrial fission. *Mol Biol Cell* 24:659-667
378. Griffin EE, Detmer SA, Chan DC (2006) Molecular mechanism of mitochondrial membrane fusion. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1763:482-489

379. Papanicolaou KN, Phillippo MM, Walsh K (2012) Mitofusins and the mitochondrial permeability transition: the potential downside of mitochondrial fusion. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 303:H243-H255
380. Chan DC (2012) Fusion and fission: interlinked processes critical for mitochondrial health. *Annual review of genetics* 46:265-287
381. Koshiba T, Detmer SA, Kaiser JT et al (2004) Structural basis of mitochondrial tethering by mitofusin complexes. *Science* 305:858-862
382. Chen H, Detmer SA, Ewald AJ et al (2003) Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *The Journal of Cell Biology* 160:189-200
383. Song Z, Ghochani M, Mccaffery JM et al (2009) Mitofusins and OPA1 Mediate Sequential Steps in Mitochondrial Membrane Fusion. *Molecular Biology of the Cell* 20:3525-3532
384. Cipolat S, Martins De Brito O, Dal Zilio B et al (2004) OPA1 requires mitofusin 1 to promote mitochondrial fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:15927-15932
385. De Brito OM, Scorrano L (2008) Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria. *Nature* 456:605-610
386. Huang P, Galloway CA, Yoon Y (2011) Control of mitochondrial morphology through differential interactions of mitochondrial fusion and fission proteins. *PloS one* 6:e20655
387. Leboucher GP, Tsai YC, Yang M et al (2012) Stress-Induced Phosphorylation and Proteasomal Degradation of Mitofusin 2 Facilitates Mitochondrial Fragmentation and Apoptosis. *Molecular Cell* 47:547-557
388. Ziviani E, Tao RN, Whitworth AJ (2010) Drosophila Parkin requires PINK1 for mitochondrial translocation and ubiquitinates Mitofusin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107:5018-5023
389. Glauser L, Sonnay S, Stafa K et al (2011) Parkin promotes the ubiquitination and degradation of the mitochondrial fusion factor mitofusin 1. *Journal of Neurochemistry* 118:636-645
390. Tanaka A, Cleland MM, Xu S et al (2010) Proteasome and p97 mediate mitophagy and degradation of mitofusins induced by Parkin. *The Journal of Cell Biology* 191:1367-1380
391. Gegg ME, Cooper JM, Chau K-Y et al (2010) Mitofusin 1 and mitofusin 2 are ubiquitinated in a PINK1/parkin-dependent manner upon induction of mitophagy. *Human Molecular Genetics* 19:4861-4870
392. Chen Y, Dorn GW (2013) PINK1- Phosphorylated Mitofusin 2 is a Parkin Receptor for Culling Damaged Mitochondria. *Science (New York, N.Y.)* 340:471-475
393. Chan NC, Salazar AM, Pham AH et al (2011) Broad activation of the ubiquitin–proteasome system by Parkin is critical for mitophagy. *Human Molecular Genetics* 20:1726-1737
394. The Uniprot C (2015) UniProt: a hub for protein information. *Nucleic Acids Research* 43:D204-D212
395. Lee J-Y, Kapur M, Li M et al (2014) MFN1 deacetylation activates adaptive mitochondrial fusion and protects metabolically challenged mitochondria. *Journal of cell science* 127:4954-4963
396. Olichon A, Baricault L, Gas N et al (2003) Loss of OPA1 Perturbates the Mitochondrial Inner Membrane Structure and Integrity, Leading to Cytochrome c Release and Apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* 278:7743-7746
397. Alavi M, Fuhrmann N (2013) Dominant optic atrophy, OPA1, and mitochondrial quality control: understanding mitochondrial network dynamics. *Molecular Neurodegeneration* 8:32

398. Delettre C, Griffoin JM, Kaplan J et al (2001) Mutation spectrum and splicing variants in the OPA1 gene. *Human genetics* 109:584-591
399. Guillery O, Malka F, Landes T et al (2008) Metalloprotease-mediated OPA1 processing is modulated by the mitochondrial membrane potential. *Biology of the Cell* 100:315-325
400. Anand R, Wai T, Baker MJ et al (2014) The i-AAA protease YME1L and OMA1 cleave OPA1 to balance mitochondrial fusion and fission. *The Journal of Cell Biology* 204:919-929
401. Frezza C, Cipolat S, Martins De Brito O et al (2006) OPA1 Controls Apoptotic Cristae Remodeling Independently from Mitochondrial Fusion. *Cell* 126:177-189
402. Zhang K, Li H, Song Z (2014) Membrane depolarization activates the mitochondrial protease OMA1 by stimulating self-cleavage. *EMBO Reports* 15:576-585
403. Song Z, Chen H, Fiket M et al (2007) OPA1 processing controls mitochondrial fusion and is regulated by mRNA splicing, membrane potential, and Yme1L. *The Journal of Cell Biology* 178:749-755
404. Rainbolt TK, Saunders JM, Wiseman RL (2015) YME1L degradation reduces mitochondrial proteolytic capacity during oxidative stress.
405. Mishra P, Carelli V, Manfredi G et al (2014) Proteolytic cleavage of Opa1 stimulates mitochondrial inner membrane fusion and couples fusion to oxidative phosphorylation. *Cell metabolism* 19:630-641
406. Howng S-L, Sy W-D, Cheng T-S et al (2004) Genomic organization, alternative splicing, and promoter analysis of human dynamin-like protein gene. *Biochemical and biophysical research communications* 314:766-772
407. Yoon Y, Krueger EW, Oswald BJ et al (2003) The mitochondrial protein hFis1 regulates mitochondrial fission in mammalian cells through an interaction with the dynamin-like protein DLP1. *Molecular and cellular biology* 23:5409-5420
408. Otera H, Wang C, Cleland MM et al (2010) Mff is an essential factor for mitochondrial recruitment of Drp1 during mitochondrial fission in mammalian cells. *J Cell Biol* 191:1141-1158
409. Palmer CS, Osellame LD, Laine D et al (2011) MiD49 and MiD51, new components of the mitochondrial fission machinery. *EMBO Reports* 12:565-573
410. Palmer CS, Elgass KD, Parton RG et al (2013) Adaptor Proteins MiD49 and MiD51 Can Act Independently of Mff and Fis1 in Drp1 Recruitment and Are Specific for Mitochondrial Fission. *Journal of Biological Chemistry* 288:27584-27593
411. Hoppins S, Lackner L, Nunnari J (2007) The Machines that Divide and Fuse Mitochondria. *Annual Review of Biochemistry* 76:751-780
412. Wilson TJ, Slupe AM, Strack S (2013) Cell signaling and mitochondrial dynamics: implications for neuronal function and neurodegenerative disease. *Neurobiology of disease* 51:13-26
413. Chen CH, Howng SL, Hwang SL et al (2000) Differential expression of four human dynamin-like protein variants in brain tumors. *DNA and cell biology* 19:189-194
414. Chang C-R, Blackstone C (2007) Cyclic AMP-dependent Protein Kinase Phosphorylation of Drp1 Regulates Its GTPase Activity and Mitochondrial Morphology. *Journal of Biological Chemistry* 282:21583-21587
415. Figueroa-Romero C, Iñiguez-Lluhí JA, Stadler J et al (2009) SUMOylation of the mitochondrial fission protein Drp1 occurs at multiple nonconsensus sites within the B domain and is linked to its activity cycle. *The FASEB Journal* 23:3917-3927



## Bibliografía

416. Wasiak S, Zunino R, McBride HM (2007) Bax/Bak promote sumoylation of DRP1 and its stable association with mitochondria during apoptotic cell death. *The Journal of Cell Biology* 177:439-450
417. Karbowski M, Neutzner A, Youle RJ (2007) The mitochondrial E3 ubiquitin ligase MARCH5 is required for Drp1 dependent mitochondrial division. *The Journal of Cell Biology* 178:71-84
418. Park Y-Y, Lee S, Karbowski M et al (2010) Loss of MARCH5 mitochondrial E3 ubiquitin ligase induces cellular senescence through dynamin-related protein 1 and mitofusin 1. *Journal of cell science* 123:619-626
419. Fang L, Hemion C, Goldblum D et al (2012) Inactivation of MARCH5 Prevents Mitochondrial Fragmentation and Interferes with Cell Death in a Neuronal Cell Model. *PloS one* 7:e52637
420. Gawlowski T, Suarez J, Scott B et al (2012) Modulation of Dynamin-related Protein 1 (DRP1) Function by Increased O-linked- $\beta$ -N-acetylglucosamine Modification (O-GlcNAc) in Cardiac Myocytes. *The Journal of biological chemistry* 287:30024-30034
421. Cho D-H, Nakamura T, Fang J et al (2009) S-Nitrosylation of Drp1 Mediates  $\beta$ -Amyloid-Related Mitochondrial Fission and Neuronal Injury. *Science (New York, N.Y.)* 324:102
422. Haun F, Nakamura T, Shiu AD et al (2013) S-Nitrosylation of Dynamin-Related Protein 1 Mediates Mutant Huntingtin-Induced Mitochondrial Fragmentation and Neuronal Injury in Huntington's Disease. *Antioxidants & redox signaling* 19:1173-1184
423. Han X-J, Lu Y-F, Li S-A et al (2008) CaM kinase  $\alpha$ -induced phosphorylation of Drp1 regulates mitochondrial morphology. *The Journal of Cell Biology* 182:573-585
424. Kashatus DF, Lim K-H, Brady DC et al (2011) RalA and RalBP1 regulate mitochondrial fission at mitosis. *Nature cell biology* 13:1108-1115
425. Watts FZ (2004) SUMO modification of proteins other than transcription factors. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 15:211-220
426. Braschi E, Zunino R, McBride HM (2009) MAPL is a new mitochondrial SUMO E3 ligase that regulates mitochondrial fission. *EMBO Reports* 10:748-754
427. Chang CR, Blackstone C (2010) Dynamic regulation of mitochondrial fission through modification of the dynamin-related protein Drp1. *Ann N Y Acad Sci* 1201:34-39
428. Nakamura N, Kimura Y, Tokuda M et al (2006) MARCH-V is a novel mitofusin 2- and Drp1-binding protein able to change mitochondrial morphology. *EMBO Reports* 7:1019-1022
429. Hess DT, Matsumoto A, Kim S-O et al (2005) Protein S-nitrosylation: purview and parameters. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:150-166
430. Bui HT, Shaw JM (2013) Adapt and Divide: The Emerging Importance of Dynamin Adaptors in Mitochondrial Fission. *Current biology : CB* 23:10.1016/j.cub.2013.1008.1040
431. Dohm JA, Lee SJ, Hardwick JM et al (2004) Cytosolic Domain of the Human Mitochondrial Fission Protein Fis1 Adopts a TPR Fold. *Proteins* 54:153-156
432. Suzuki M, Jeong S-Y, Karbowski M et al (2003) The Solution Structure of Human Mitochondria Fission Protein Fis1 Reveals a Novel TPR-like Helix Bundle. *Journal of Molecular Biology* 334:445-458
433. Zhao J, Liu T, Jin S et al (2011) Human MIEF1 recruits Drp1 to mitochondrial outer membranes and promotes mitochondrial fusion rather than fission. *EMBO J* 30:2762-2778
434. Richter V, Palmer CS, Osellame LD et al (2014) Structural and functional analysis of MiD51, a dynamin receptor required for mitochondrial fission. *The Journal of Cell Biology* 204:477-486
435. Roy M, Reddy PH, Iijima M et al (2015) Mitochondrial division and fusion in metabolism. *Curr Opin Cell Biol* 33:111-118

436. Losón OC, Meng S, Ngo H et al (2015) Crystal structure and functional analysis of MiD49, a receptor for the mitochondrial fission protein Drp1. *Protein Science* 24:386-394
437. Gerencser AA, Chinopoulos C, Birket MJ et al (2012) Quantitative measurement of mitochondrial membrane potential in cultured cells: calcium-induced de- and hyperpolarization of neuronal mitochondria. *The Journal of Physiology* 590:2845-2871
438. Salvioli S, Ardizzoni A, Franceschi C et al (1997) JC-1, but not DiOC6(3) or rhodamine 123, is a reliable fluorescent probe to assess  $\Delta\Psi$  changes in intact cells: implications for studies on mitochondrial functionality during apoptosis. *FEBS Letters* 411:77-82
439. Cossarizza A, Baccaranicontri M, Kalashnikova G et al (1993) A New Method for the Cytofluorometric Analysis of Mitochondrial Membrane Potential Using the J-Aggregate Forming Lipophilic Cation 5,5',6,6'-Tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine Iodide (JC-1). *Biochemical and biophysical research communications* 197:40-45
440. Johri A, Beal MF (2012) Mitochondrial Dysfunction in Neurodegenerative Diseases. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 342:619-630
441. Yu W, Sun Y, Guo S et al (2011) The PINK1/Parkin pathway regulates mitochondrial dynamics and function in mammalian hippocampal and dopaminergic neurons. *Hum Mol Genet* 20:3227-3240
442. Lutz AK, Exner N, Fett ME et al (2009) Loss of parkin or PINK1 function increases Drp1-dependent mitochondrial fragmentation. *The Journal of biological chemistry* 284:22938-22951
443. Choudhary V, Kaddour-Djebbar I, Alaisami R et al (2014) Mitofusin 1 degradation is induced by a disruptor of mitochondrial calcium homeostasis, CGP37157: a role in apoptosis in prostate cancer cells. *International journal of oncology* 44:1767-1773
444. Kwon SH, Hong SI, Jung YH et al (2012) *Lonicera japonica* THUNB. protects 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity by inhibiting activation of MAPKs, PI3K/Akt, and NF-kappaB in SH-SY5Y cells. *Food Chem Toxicol* 50:797-807
445. Bach D, Pich S, Soriano FX et al (2003) Mitofusin-2 Determines Mitochondrial Network Architecture and Mitochondrial Metabolism: A NOVEL REGULATORY MECHANISM ALTERED IN OBESITY. *Journal of Biological Chemistry* 278:17190-17197
446. Scheele C, Nielsen AR, Walden TB et al (2007) Altered regulation of the PINK1 locus: a link between type 2 diabetes and neurodegeneration? *FASEB J* 21:3653-3665
447. Mortiboys H, Thomas KJ, Koopman WJH et al (2008) Mitochondrial function and morphology are impaired in parkin mutant fibroblasts. *Annals of neurology* 64:555-565
448. Van Der Merwe C, Loos B, Swart C et al (2014) Mitochondrial impairment observed in fibroblasts from South African Parkinson's disease patients with parkin mutations. *Biochemical and biophysical research communications* 447:334-340
449. Zanellati MC, Monti V, Barzaghi C et al (2015) Mitochondrial dysfunction in Parkinson disease: evidence in mutant PARK2 fibroblasts. *Frontiers in Genetics* 6:78
450. Sandebring A, Dehvari N, Perez-Manso M et al (2009) Parkin deficiency disrupts calcium homeostasis by modulating phospholipase C signaling. *The FEBS journal* 276:5041-5052
451. Wang H, Song P, Du L et al (2011) Parkin Ubiquitinates Drp1 for Proteasome-dependent Degradation: IMPLICATION OF DYSREGULATED MITOCHONDRIAL DYNAMICS IN PARKINSON DISEASE. *The Journal of biological chemistry* 286:11649-11658

452. Calì T, Ottolini D, Negro A et al (2013) Enhanced parkin levels favor ER-mitochondria crosstalk and guarantee Ca<sup>2+</sup> transfer to sustain cell bioenergetics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1832:495-508
453. Skulachev VP (2001) Mitochondrial filaments and clusters as intracellular power-transmitting cables. *Trends in Biochemical Sciences* 26:23-29
454. Szabadkai G, Simoni AM, Bianchi K et al (2006) Mitochondrial dynamics and Ca<sup>2+</sup> signaling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1763:442-449
455. Tondera D, Grandemange S, Jourdain A et al (2009) SLP-2 is required for stress-induced mitochondrial hyperfusion. *The EMBO Journal* 28:1589-1600
456. Sanchez-Wandelmer J, Ktistakis NT, Reggiori F (2015) ERES: sites for autophagosome biogenesis and maturation? *Journal of cell science* 128:185-192
457. Todde V, Veenhuis M, Van Der Klei IJ (2009) Autophagy: principles and significance in health and disease. *Biochim Biophys Acta* 1792:3-13
458. Mizushima N (2005) The pleiotropic role of autophagy: from protein metabolism to bactericide. *Cell Death Differ* 12 Suppl 2:1535-1541
459. Klionsky DJ, Cregg JM, Dunn WA, Jr. et al (2003) A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Dev.Cell* 5:539-545
460. Yorimitsu T, Klionsky DJ (2005) Autophagy: molecular machinery for self-eating. *Cell Death Differ* 12:1542-1552
461. Behrends C, Sowa ME, Gygi SP et al (2010) Network organization of the human autophagy system. *Nature* 466:68-76
462. Dengjel J, Høyer-Hansen M, Nielsen MO et al (2012) Identification of Autophagosome-associated Proteins and Regulators by Quantitative Proteomic Analysis and Genetic Screens. *Molecular & Cellular Proteomics* : MCP 11:M111.014035
463. Boya P, Reggiori F, Codogno P (2013) Emerging regulation and functions of autophagy. *Nat Cell Biol* 15:713-720
464. Mizushima N, Levine B, Cuervo AM et al (2008) Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* 451:1069-1075
465. Klionsky DJ, Abeliovich H, Agostinis P et al (2008) Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. *Autophagy* 4:151-175
466. Boya P, Gonzalez-Polo RA, Casares N et al (2005) Inhibition of macroautophagy triggers apoptosis. *Molecular and cellular biology* 25:1025-1040
467. Lum JJ, Bauer DE, Kong M et al (2005) Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis. *Cell* 120:237-248
468. Scarlatti F, Granata R, Meijer AJ et al (2008) Does autophagy have a license to kill mammalian cells? *Cell Death Differ* 16:12-20
469. Zou C-G, Ma Y-C, Dai L-L et al (2014) Autophagy protects *C. elegans* against necrosis during *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111:12480-12485
470. Qu X, Zou Z, Sun Q et al (2007) Autophagy gene-dependent clearance of apoptotic cells during embryonic development. *Cell* 128:931-946
471. Galluzzi L, Morselli E, Vicencio JM et al (2008) Life, death and burial: multifaceted impact of autophagy. *Biochemical Society transactions* 36:786-790
472. Scarlatti F, Granata R, Meijer AJ et al (2009) Does autophagy have a license to kill mammalian cells? *Cell Death and Differentiation* 16:12-20

473. Bergamini E, Cavallini G, Donati A et al (2007) The role of autophagy in aging: its essential part in the anti-aging mechanism of caloric restriction. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1114:69-78
474. Levine B, Deretic V (2007) Unveiling the roles of autophagy in innate and adaptive immunity. *Nature reviews. Immunology* 7:767-777
475. Schmid D, Münz C (2007) Immune surveillance via self digestion. *Autophagy* 3:133-135
476. Klionsky DJ (2003 ) Autophagy. *Eurekah and Landes Bioscience, Texas*
477. Suzuki K, Kubota Y, Sekito T et al (2007) Hierarchy of Atg proteins in pre-autophagosomal structure organization. *Genes to Cells* 12:209-218
478. Axe EL, Walker SA, Manifava M et al (2008) Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. *The Journal of Cell Biology* 182:685-701
479. Biazik J, Ylä-Anttila P, Vihinen H et al (2015) Ultrastructural relationship of the phagophore with surrounding organelles. *Autophagy* 11:439-451
480. Hailey DW, Kim PK, Satpute-Krishnan P et al (2010) Mitochondria supply membranes for autophagosome biogenesis during starvation. *Cell* 141:656-667
481. Hamasaki M, Furuta N, Matsuda A et al (2013) Autophagosomes form at ER-mitochondria contact sites. *Nature* 495:389-393
482. Ravikumar B, Moreau K, Jahreiss L et al (2010) Plasma membrane contributes to the formation of pre-autophagosomal structures. *Nature cell biology* 12:747-757
483. Sohda M, Misumi Y, Ogata S et al (2015) Trans-Golgi protein p230/golgin-245 is involved in phagophore formation. *Biochemical and biophysical research communications* 456:275-281
484. Ge L, Melville D, Zhang M et al (2013) The ER–Golgi intermediate compartment is a key membrane source for the LC3 lipidation step of autophagosome biogenesis. *Elife* 2:e00947
485. Graef M, Friedman JR, Graham C et al (2013) ER exit sites are physical and functional core autophagosome biogenesis components. *Molecular Biology of the Cell* 24:2918-2931
486. Zoppino FC, Militello RD, Slavin I et al (2010) Autophagosome formation depends on the small GTPase Rab1 and functional ER exit sites. *Traffic* 11:1246-1261
487. Moreau K, Ravikumar B, Renna M et al (2011) Autophagosome Precursor Maturation Requires Homotypic Fusion. *Cell* 146:303-317
488. Juhasz G, Neufeld TP (2006) Autophagy: A Forty-Year Search for a Missing Membrane Source. *PLoS biology* 4:e36
489. Tooze SA, Yoshimori T (2010) The origin of the autophagosomal membrane. *Nat Cell Biol* 12:831-835
490. Carlsson SR, Simonsen A (2015) Membrane dynamics in autophagosome biogenesis. *Journal of cell science*
491. Koyama-Honda I, Itakura E, Fujiwara TK et al (2013) Temporal analysis of recruitment of mammalian ATG proteins to the autophagosome formation site. *Autophagy* 9:1491-1499
492. Chan EYW, Longatti A, Mcknight NC et al (2009) Kinase-Inactivated ULK Proteins Inhibit Autophagy via Their Conserved C-Terminal Domains Using an Atg13-Independent Mechanism. *Molecular and cellular biology* 29:157-171
493. Ragusa MJ, Stanley RE, Hurley JH (2012) Architecture of the Atg17 Complex as a Scaffold for Autophagosome Biogenesis. *Cell* 151:1501-1512

494. Karanasios E, Stapleton E, Manifava M et al (2013) Dynamic association of the ULK1 complex with omegasomes during autophagy induction. *Journal of cell science* 126:5224-5238
495. Jao CC, Ragusa MJ, Stanley RE et al (2013) A HORMA domain in Atg13 mediates PI 3-kinase recruitment in autophagy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110:5486-5491
496. Matsunaga K, Morita E, Saitoh T et al (2010) Autophagy requires endoplasmic reticulum targeting of the PI3-kinase complex via Atg14L. *The Journal of Cell Biology* 190:511-521
497. Russell RC, Tian Y, Yuan H et al (2013) ULK1 induces autophagy by phosphorylating Beclin-1 and activating Vps34 lipid kinase. *Nature cell biology* 15:10.1038/ncb2757
498. Levine B, Liu R, Dong X et al (2015) Beclin orthologs: integrative hubs of cell signaling, membrane trafficking, and physiology. *Trends in Cell Biology* 25:533-544
499. Molejon MI, Ropolo A, Re AL et al (2013) The VMP1-Beclin 1 interaction regulates autophagy induction. *Scientific Reports* 3:1055
500. Devereaux K, Dall'armi C, Alcazar-Roman A et al (2013) Regulation of Mammalian Autophagy by Class II and III PI 3-Kinases through PI3P Synthesis. *PloS one* 8:e76405
501. Mizushima N, Yamamoto A, Hatano M et al (2001) Dissection of Autophagosome Formation Using Apg5-Deficient Mouse Embryonic Stem Cells. *The Journal of Cell Biology* 152:657-668
502. Mizushima N, Sugita H, Yoshimori T et al (1998) A new protein conjugation system in human. The counterpart of the yeast Apg12p conjugation system essential for autophagy. *The Journal of biological chemistry* 273:33889-33892
503. Mizushima N, Yoshimori T, Ohsumi Y (2002) Mouse Apg10 as an Apg12-conjugating enzyme: analysis by the conjugation-mediated yeast two-hybrid method. *FEBS Lett* 532:450-454
504. Tanida I, Mizushima N, Kiyooka M et al (1999) Apg7p/Cvt2p: A novel protein-activating enzyme essential for autophagy. *Mol Biol Cell* 10:1367-1379
505. Mizushima N, Kuma A, Kobayashi Y et al (2003) Mouse Apg16L, a novel WD-repeat protein, targets to the autophagic isolation membrane with the Apg12-Apg5 conjugate. *Journal of cell science* 116:1679-1688
506. Gammoh N, Florey O, Overholtzer M et al (2013) Interaction Between FIP200 and ATG16L1 Distinguishes ULK1 Complex-Dependent and -Independent Autophagy. *Nature structural & molecular biology* 20:144-149
507. Nishimura T, Kaizuka T, Cadwell K et al (2013) FIP200 regulates targeting of Atg16L1 to the isolation membrane. *EMBO Reports* 14:284-291
508. Dooley Hannah c, Razi M, Polson Hannah eJ et al (2014) WIPI2 Links LC3 Conjugation with PI3P, Autophagosome Formation, and Pathogen Clearance by Recruiting Atg12-5-16L1. *Molecular Cell* 55:238-252
509. Kabeya Y, Mizushima N, Yamamoto A et al (2004) LC3, GABARAP and GATE16 localize to autophagosomal membrane depending on form-II formation. *Journal of cell science* 117:2805-2812
510. Ichimura Y, Kirisako T, Takao T et al (2000) A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature* 408:488-492
511. Weidberg H, Shvets E, Shpilka T et al (2010) LC3 and GATE-16/GABARAP subfamilies are both essential yet act differently in autophagosome biogenesis. *The EMBO Journal* 29:1792-1802

512. Mizushima N (2007) Autophagy: process and function. *Genes & development* 21:2861-2873
513. Yamamoto A, Simonsen A (2011) The elimination of accumulated and aggregated proteins: A role for aggrephagy in neurodegeneration. *Neurobiology of disease* 43:17-28
514. Kaarniranta K, Sinha D, Blasiak J et al (2013) Autophagy and heterophagy dysregulation leads to retinal pigment epithelium dysfunction and development of age-related macular degeneration. *Autophagy* 9:973-984
515. Weckman A, Rotondo F, Di Ieva A et al (2015) Autophagy in endocrine tumors. *Endocrine-related cancer* 22:R205-218
516. Weidberg H, Shvets E, Elazar Z (2009) Lipophagy: selective catabolism designed for lipids. *Developmental Cell* 16:628-630
517. Mijaljica D, Prescott M, Devenish RJ (2007) Different fates of mitochondria: alternative ways for degradation? *Autophagy* 3:4-9
518. Oku M, Sakai Y (2010) Peroxisomes as dynamic organelles: autophagic degradation. *The FEBS journal* 277:3289-3294
519. Kraft C, Deplazes A, Sohrmann M et al (2008) Mature ribosomes are selectively degraded upon starvation by an autophagy pathway requiring the Ubp3p/Bre5p ubiquitin protease. *Nature cell biology* 10:602-610
520. Khaminets A, Heinrich T, Mari M et al (2015) Regulation of endoplasmic reticulum turnover by selective autophagy. *Nature* 522:354-358
521. Bernales S, Schuck S, Walter P (2007) ER-phagy: selective autophagy of the endoplasmic reticulum. *Autophagy* 3:285-287
522. Knodler LA, Celli J (2011) Eating the strangers within: host control of intracellular bacteria via xenophagy. *Cellular microbiology* 13:1319-1327
523. Boyle KB, Randow F (2013) The role of 'eat-me' signals and autophagy cargo receptors in innate immunity. *Current Opinion in Microbiology* 16:339-348
524. Welchman RL, Gordon C, Mayer RJ (2005) Ubiquitin and ubiquitin-like proteins as multifunctional signals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:599-609
525. Thurston TLM, Wandel MP, Von Muhlinen N et al (2012) Galectin 8 targets damaged vesicles for autophagy to defend cells against bacterial invasion. *Nature* 482:414-418
526. Johansen T, Lamark T (2011) Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins. *Autophagy* 7:279-296
527. Birgisdottir ÅB, Lamark T, Johansen T (2013) The LIR motif – crucial for selective autophagy. *Journal of cell science* 126:3237-3247
528. Tooze J, Hollinshead M, Ludwig T et al (1990) In exocrine pancreas, the basolateral endocytic pathway converges with the autophagic pathway immediately after the early endosome. *J Cell Biol* 111:329-345
529. Berg TO, Fengsrud M, Strømhaug PE et al (1998) Isolation and Characterization of Rat Liver Amphisomes: EVIDENCE FOR FUSION OF AUTOPHAGOSOMES WITH BOTH EARLY AND LATE ENDOSOMES. *Journal of Biological Chemistry* 273:21883-21892
530. Itakura E, Kishi-Itakura C, Mizushima N (2012) The Hairpin-type Tail-Anchored SNARE Syntaxin 17 Targets to Autophagosomes for Fusion with Endosomes/Lysosomes. *Cell* 151:1256-1269
531. Gutierrez MG, Master SS, Singh SB et al (2004) Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and Mycobacterium tuberculosis survival in infected macrophages. *Cell* 119:753-766

532. Jager S, Bucci C, Tanida I et al (2004) Role for Rab7 in maturation of late autophagic vacuoles. *Journal of cell science* 117:4837-4848
533. Wang X, Zhang X, Dong X-P et al (2012) TPC Proteins Are Phosphoinositide- Activated Sodium-Selective Ion Channels in Endosomes and Lysosomes. *Cell* 151:372-383
534. Cang C, Zhou Y, Navarro B et al (2013) mTOR Regulates Lysosomal ATP-Sensitive Two-Pore Na<sup>+</sup> Channels to Adapt to Metabolic State. *Cell* 152:778-790
535. Cang C, Bekele B, Ren D (2014) The voltage-gated sodium channel TPC1 confers endolysosomal excitability. *Nat Chem Biol* 10:463-469
536. Tian X, Gala U, Zhang Y et al (2015) A voltage-gated calcium channel regulates lysosomal fusion with endosomes and autophagosomes and is required for neuronal homeostasis. *PLoS biology* 13:e1002103
537. Noda T, Fujita N, Yoshimori T (2009) The late stages of autophagy: how does the end begin[quest]. *Cell Death Differ* 16:984-990
538. Wong P-M, Puente C, Ganley IG et al (2013) The ULK1 complex: Sensing nutrient signals for autophagy activation. *Autophagy* 9:124-137
539. Wong P-M, Feng Y, Wang J et al (2015) Regulation of autophagy by coordinated action of mTORC1 and protein phosphatase 2A. *Nature communications* 6:8048
540. Chan EY (2009) mTORC1 phosphorylates the ULK1-mAtg13-FIP200 autophagy regulatory complex. *Science signaling* 2:pe51
541. Kamada Y, Funakoshi T, Shintani T et al (2000) Tor-Mediated Induction of Autophagy via an App1 Protein Kinase Complex. *The Journal of Cell Biology* 150:1507-1513
542. Ha J, Guan K-L, Kim J (2015) AMPK and autophagy in glucose/glycogen metabolism. *Molecular aspects of medicine*
543. Egan D, Kim J, Shaw RJ et al (2011) The autophagy initiating kinase ULK1 is regulated via opposing phosphorylation by AMPK and mTOR. *Autophagy* 7:643-644
544. Kim J, Kundu M, Viollet B et al (2011) AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nature cell biology* 13:132-141
545. Shang L, Chen S, Du F et al (2011) Nutrient starvation elicits an acute autophagic response mediated by Ulk1 dephosphorylation and its subsequent dissociation from AMPK. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108:4788-4793
546. Jung CH, Seo M, Otto NM et al (2011) ULK1 inhibits the kinase activity of mTORC1 and cell proliferation. *Autophagy* 7:1212-1221
547. Dunlop EA, Hunt DK, Acosta-Jaquez HA et al (2011) ULK1 inhibits mTORC1 signaling, promotes multisite Raptor phosphorylation and hinders substrate binding. *Autophagy* 7:737-747
548. Wang RC, Wei Y, An Z et al (2012) Akt-mediated regulation of autophagy and tumorigenesis through Beclin 1 phosphorylation. *Science (New York, N.Y.)* 338:956-959
549. Tan X, Thapa N, Sun Y et al (2015) A kinase-independent role for EGF receptor in autophagy initiation. *Cell* 160:145-160
550. Wei Y, Zou Z, Becker N et al (2013) EGFR-mediated Beclin 1 phosphorylation in autophagy suppression, tumor progression, and tumor chemoresistance. *Cell* 154:1269-1284
551. Kim J, Kim YC, Fang C et al (2013) Differential regulation of distinct Vps34 complexes by AMPK in nutrient stress and autophagy. *Cell* 152:290-303
552. Taguchi-Atarashi N, Hamasaki M, Matsunaga K et al (2010) Modulation of local PtdIns3P levels by the PI phosphatase MTMR3 regulates constitutive autophagy. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 11:468-478

553. Vergne I, Roberts E, Elmaoued RA et al (2009) Control of autophagy initiation by phosphoinositide 3-phosphatase Jumpy. *The EMBO Journal* 28:2244-2258
554. Codogno P, Mehrpour M, Proikas-Cezanne T (2012) Canonical and non-canonical autophagy: variations on a common theme of self-eating? *Nat Rev Mol Cell Biol* 13:7-12
555. Dupont N, Codogno P (2013) Non-canonical Autophagy: Facts and Prospects. *Curr Pathobiol Rep* 1:263-271
556. Grishchuk Y, Ginet V, Truttmann AC et al (2011) Beclin 1-independent autophagy contributes to apoptosis in cortical neurons. *Autophagy* 7:1115-1131
557. Mauthe M, Jacob A, Freiberger S et al (2011) Resveratrol-mediated autophagy requires WIPI-1-regulated LC3 lipidation in the absence of induced phagophore formation. *Autophagy* 7:1448-1461
558. Scarlatti F, Maffei R, Beau I et al (2008) Role of non-canonical Beclin 1-independent autophagy in cell death induced by resveratrol in human breast cancer cells. *Cell Death Differ* 15:1318-1329
559. Tian S, Lin J, Jun Zhou J et al (2010) Beclin 1-independent autophagy induced by a Bcl-XL/Bcl-2 targeting compound, Z18. *Autophagy* 6:1032-1041
560. Zhu JH, Horbinski C, Guo F et al (2007) Regulation of autophagy by extracellular signal-regulated protein kinases during 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced cell death. *Am J Pathol* 170:75-86
561. Arsov I, Adebayo A, Kucerova-Levisohn M et al (2011) A role for autophagic protein Beclin 1 early in lymphocyte development. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 186:2201-2209
562. Mestre MB, Fader CM, Sola C et al (2010)  $\alpha$ -hemolysin is required for the activation of the autophagic pathway in *Staphylococcus aureus* infected cells. *Autophagy* 6:110-125
563. Cheong H, Lindsten T, Wu J et al (2011) Ammonia-induced autophagy is independent of ULK1/ULK2 kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108:11121-11126
564. Grotemeier A, Alers S, Pfisterer SG et al (2010) AMPK-independent induction of autophagy by cytosolic Ca<sup>2+</sup> increase. *Cellular signalling* 22:914-925
565. Yamamoto A, Cremona ML, Rothman JE (2006) Autophagy-mediated clearance of huntingtin aggregates triggered by the insulin-signaling pathway. *J Cell Biol* 172:719-731
566. Sarkar S, Floto RA, Berger Z et al (2005) Lithium induces autophagy by inhibiting inositol monophosphatase. *J Cell Biol* 170:1101-1111
567. Nishida Y, Arakawa S, Fujitani K et al (2009) Discovery of Atg5/Atg7-independent alternative macroautophagy. *Nature* 461:654-658
568. Youle RJ, Narendra DP (2011) Mechanisms of mitophagy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 12:9-14
569. Wang K, Klionsky DJ (2011) Mitochondria removal by autophagy. *Autophagy* 7:297-300
570. Vives-Bauza C, De Vries RL, Tocilescu M et al (2010) PINK1/Parkin direct mitochondria to autophagy. *Autophagy* 6:315-316
571. Tanaka A (2010) Parkin-mediated selective mitochondrial autophagy, mitophagy: Parkin purges damaged organelles from the vital mitochondrial network. *FEBS Lett* 584:1386-1392
572. Poole AC, Thomas RE, Yu S et al (2010) The mitochondrial fusion-promoting factor mitofusin is a substrate of the PINK1/parkin pathway. *PloS one* 5:e10054
573. Sarraf SA, Raman M, Guarani-Pereira V et al (2013) Landscape of the PARKIN-dependent ubiquitylome in response to mitochondrial depolarization. *Nature* 496:372-376



574. Ordureau A, Münch C, Harper JW (2015) Quantifying Ubiquitin Signaling. *Molecular Cell* 58:660-676
575. Ordureau A, Sarraf Shireen a, Duda David m et al (2014) Quantitative Proteomics Reveal a Feedforward Mechanism for Mitochondrial PARKIN Translocation and Ubiquitin Chain Synthesis. *Molecular Cell* 56:360-375
576. Sauvé V, Lilov A, Seirafi M et al (2015) A Ubl/ubiquitin switch in the activation of Parkin. *The EMBO Journal*
577. Liu S, Sawada T, Lee S et al (2012) Parkinson's Disease-Associated Kinase PINK1 Regulates Miro Protein Level and Axonal Transport of Mitochondria. *PLoS Genet* 8:e1002537
578. Shiba-Fukushima K, Inoshita T, Hattori N et al (2014) Lysine 63-linked Polyubiquitination Is Dispensable for Parkin-mediated Mitophagy. *Journal of Biological Chemistry* 289:33131-33136
579. Cunningham CN, Baughman JM, Phu L et al (2015) USP30 and parkin homeostatically regulate atypical ubiquitin chains on mitochondria. *Nat Cell Biol* 17:160-169
580. Okatsu K, Saisho K, Shimanuki M et al (2010) p62/SQSTM1 cooperates with Parkin for perinuclear clustering of depolarized mitochondria. *Genes to Cells* 15:887-900
581. Ding WX, Ni HM, Li M et al (2010) Nix is critical to two distinct phases of mitophagy, reactive oxygen species-mediated autophagy induction and Parkin-ubiquitin-p62-mediated mitochondrial priming. *The Journal of biological chemistry* 285:27879-27890
582. Schweers RL, Zhang J, Randall MS et al (2007) NIX is required for programmed mitochondrial clearance during reticulocyte maturation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104:19500-19505
583. Sandoval H, Thiagarajan P, Dasgupta SK et al (2008) Essential role for Nix in autophagic maturation of erythroid cells. *Nature* 454:232-235
584. Lazarou M, Sliter DA, Kane LA et al (2015) The ubiquitin kinase PINK1 recruits autophagy receptors to induce mitophagy. *Nature* 524:309-314
585. Wong YC, Holzbaur ELF (2014) Optineurin is an autophagy receptor for damaged mitochondria in parkin-mediated mitophagy that is disrupted by an ALS-linked mutation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111:E4439-E4448
586. Strappazon F, Nazio F, Corrado M et al (2015) AMBRA1 is able to induce mitophagy via LC3 binding, regardless of PARKIN and p62/SQSTM1. *Cell Death Differ* 22:419-432
587. Maria Fimia G, Stoykova A, Romagnoli A et al (2007) Ambra1 regulates autophagy and development of the nervous system. *Nature* v447:1121-1125
588. Allen GFG, Toth R, James J et al (2013) Loss of iron triggers PINK1/Parkin-independent mitophagy. *EMBO Reports* 14:1127-1135
589. Kageyama Y, Hoshijima M, Seo K et al (2014) Parkin-independent mitophagy requires Drp1 and maintains the integrity of mammalian heart and brain.
590. Durcan TM, Kontogiannea M, Bedard N et al (2012) Ataxin-3 Deubiquitination Is Coupled to Parkin Ubiquitination via E2 Ubiquitin-conjugating Enzyme. *The Journal of biological chemistry* 287:531-541
591. Durcan TM, Tang MY, Pérusse JR et al (2014) USP8 regulates mitophagy by removing K6-linked ubiquitin conjugates from parkin. *The EMBO Journal* 33:2473-2491
592. Cornelissen T, Haddad D, Wauters F et al (2014) The deubiquitinase USP15 antagonizes Parkin-mediated mitochondrial ubiquitination and mitophagy. *Human Molecular Genetics* 23:5227-5242
593. Bingol B, Tea JS, Phu L et al (2014) The mitochondrial deubiquitinase USP30 opposes parkin-mediated mitophagy. *Nature* 510:370-375

594. Liang J-R, Martinez A, Lane JD et al (2015) USP30 deubiquitylates mitochondrial Parkin substrates and restricts apoptotic cell death. *EMBO Reports* 16:618-627
595. Parzych KR, Klionsky DJ (2014) An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation. *Antioxidants & redox signaling* 20:460-473
596. Mijaljica D, Prescott M, Devenish RJ (2011) Microautophagy in mammalian cells: revisiting a 40-year-old conundrum. *Autophagy* 7:673-682
597. Dubouloz F, Deloche O, Wanke V et al (2005) The TOR and EGO Protein Complexes Orchestrate Microautophagy in Yeast. *Molecular Cell* 19:15-26
598. Bejarano E, Cuervo AM (2010) Chaperone-Mediated Autophagy. *Proceedings of the American Thoracic Society* 7:29-39
599. Biederbick A, Kern HF, Elsasser HP (1995) Monodansylcadaverine (MDC) is a specific in vivo marker for autophagic vacuoles. *European journal of cell biology* 66:3-14
600. Vázquez CL, Colombo MI (2009) Chapter 6 Assays to Assess Autophagy Induction and Fusion of Autophagic Vacuoles with a Degradative Compartment, Using Monodansylcadaverine (MDC) and DQ-BSA. In: Daniel JK (ed) *Methods in Enzymology*. Academic Press, p 85-95
601. Niemann A, Takatsuki A, Elsasser HP (2000) The lysosomotropic agent monodansylcadaverine also acts as a solvent polarity probe. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 48:251-258
602. Munafo DB, Colombo MI (2001) A novel assay to study autophagy: regulation of autophagosome vacuole size by amino acid deprivation. *Journal of cell science* 114:3619-3629
603. Clark IE, Dodson MW, Jiang C et al (2006) *Drosophila pink1* is required for mitochondrial function and interacts genetically with parkin. *Nature* 441:1162-1166
604. Park J, Lee SB, Lee S et al (2006) Mitochondrial dysfunction in *Drosophila* PINK1 mutants is complemented by parkin. *Nature* 441:1157-1161
605. Yang Y, Gehrke S, Imai Y et al (2006) Mitochondrial pathology and muscle and dopaminergic neuron degeneration caused by inactivation of *Drosophila* Pink1 is rescued by Parkin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:10793-10798
606. Mizushima N, Yoshimori T (2007) How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy* 3:542-545
607. Martinez-Lopez N, Athonvarangkul D, Mishall P et al (2013) Autophagy proteins regulate ERK phosphorylation. *Nature communications* 4:2799
608. Noguchi M, Hirata N, Suizu F (2014) The links between AKT and two intracellular proteolytic cascades: Ubiquitination and autophagy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* 1846:342-352
609. Kim J-H, Hong S-K, Wu P-K et al (2014) Raf/MEK/ERK can regulate cellular levels of LC3B and SQSTM1/p62 at expression levels. *Experimental Cell Research* 327:340-352
610. Li J, Li S, Zhang L et al (2015) Deconvoluting the complexity of autophagy and Parkinson's disease for potential therapeutic purpose. *Oncotarget*
611. Crews L, Spencer B, Desplats P et al (2010) Selective molecular alterations in the autophagy pathway in patients with Lewy body disease and in models of alpha-synucleinopathy. *PLoS one* 5:e9313
612. Tanji K, Mori F, Kakita A et al (2011) Alteration of autophagosomal proteins (LC3, GABARAP and GATE-16) in Lewy body disease. *Neurobiology of disease* 43:690-697

613. Lachenmayer ML, Yue Z (2012) Genetic animal models for evaluating the role of autophagy in etiopathogenesis of Parkinson disease. *Autophagy* 8:1837-1838
614. Pattingre S, Tassa A, Qu X et al (2005) Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell* 122:927-939
615. Cui T, Fan C, Gu L et al (2011) Silencing of PINK1 induces mitophagy via mitochondrial permeability transition in dopaminergic MN9D cells. *Brain Research* 1394:1-13
616. Vives-Bauza C, Zhou C, Huang Y et al (2010) PINK1-dependent recruitment of Parkin to mitochondria in mitophagy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:378-383
617. Kubli DA, Cortez MQ, Moyzis AG et al (2015) PINK1 Is Dispensable for Mitochondrial Recruitment of Parkin and Activation of Mitophagy in Cardiac Myocytes. *PLoS one* 10:e0130707
618. Wu W, Xu H, Wang Z et al (2015) PINK1-Parkin-Mediated Mitophagy Protects Mitochondrial Integrity and Prevents Metabolic Stress-Induced Endothelial Injury. *PLoS one* 10:e0132499
619. Ashrafi G, Schlehe JS, Lavoie MJ et al (2014) Mitophagy of damaged mitochondria occurs locally in distal neuronal axons and requires PINK1 and Parkin. *The Journal of Cell Biology* 206:655-670
620. Kitada T, Pisani A, Porter DR et al (2007) Impaired dopamine release and synaptic plasticity in the striatum of PINK1-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104:11441-11446
621. Sudhof TC (2004) The synaptic vesicle cycle. *Annual review of neuroscience* 27:509-547
622. Huynh DP, Scoles DR, Nguyen D et al (2003) The autosomal recessive juvenile Parkinson disease gene product, parkin, interacts with and ubiquitinates synaptotagmin XI. *Human Molecular Genetics* 12:2587-2597
623. Park D, Lee MN, Jeong H et al (2014) Parkin ubiquitinates mTOR to regulate mTORC1 activity under mitochondrial stress. *Cellular signalling* 26:2122-2130
624. Von Stockum S, Nardin A, Schrepfer E et al (2015) Mitochondrial dynamics and mitophagy in Parkinson's disease: A fly point of view. *Neurobiology of disease*
625. Li X, Gehring K (2015) Structural studies of parkin and salsin: Mitochondrial dynamics in neurodegenerative diseases. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 30:1610-1619
626. Exner N, Lutz AK, Haass C et al (2012) Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease: molecular mechanisms and pathophysiological consequences. *The EMBO Journal* 31:3038-3062
627. Perier C, Bove J, Vila M et al (2003) The rotenone model of Parkinson's disease. *Trends Neurosci* 26:345-346
628. Perier C, Vila M (2012) Mitochondrial Biology and Parkinson's Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2:a009332
629. Van Laar VS, Berman SB (2013) The Interplay of Neuronal Mitochondrial Dynamics and Bioenergetics: Implications for Parkinson's Disease. *Neurobiology of disease* 51:43-55
630. Subramaniam SR, Chesselet M-F (2013) Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in Parkinson's disease. *Progress in neurobiology* 0:17-32
631. Rojas L (2012) Evaluación de la disminución de la expresión de Pink1 en eventos de fusión y fisión mitocondrial en un modelo de neuronas dopaminérgicas. In: *Maestría en Bioquímica. Facultad de Medicina. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá*, p 81

632. Niño A (2013) Efecto de la disminución de la expresión de Pink1 y Parkin sobre vías de supervivencia y metabolismo en un modelo de neuronas dopaminérgicas. In: Maestría en Neurociencias. Facultad de Medicina. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, p 96