



Universidad
Zaragoza



Trabajo Fin de Máster

Interacción entre alfa-sinucleína y tau en
modelos celulares de la enfermedad de
Parkinson.

Autora

Beatriz Sáenz de Buruaga Corrochano

Directores

José Alberto Carrodeguas Villar

Nunilo Cremades Casasín

Máster en Biología Molecular y Celular
Facultad de Ciencias

Curso 2019/2020

INDICE

1. INTRODUCCIÓN / ANTECEDENTES	1
1.1 LA ENFERMEDAD DE PARKINSON	1
1.1.1 <i>Epidemiología</i>	1
1.1.2 <i>Patogenia</i>	1
1.1.3 <i>Cuerpos de Lewy</i>	2
1.2 α -SINUCLEÍNA	3
1.2.1 <i>Estructura de la α-Sinucleína</i>	3
1.2.2 <i>Malplegamiento y agregación de la α-Sinucleína</i>	4
1.2.3 <i>α-Sinucleína en la célula, función y toxicidad</i>	4
1.3 TAU	6
1.4 PROPAGACIÓN DE LA ALFA-SYNUCLEÍNA EN LA ENFERMEDAD DE PARKINSON.....	7
2. OBJETIVOS	8
3. MATERIALES Y MÉTODOS	9
3.1 CLONAJES	9
pJAC321: <i>pCMV-Myc-mRFP-aSyn</i>	9
pJAC322: <i>pCMV-Myc-mRFP-aSyn(N103)</i>	9
pJAC323: <i>pRK5-EGFP-Tau(4R/ON)N368</i>	9
3.1.1 <i>Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)</i>	11
3.1.2 <i>Digestión y purificación</i>	12
3.1.3 <i>Ligación</i>	13
3.1.4 <i>Transformación</i>	14
3.1.5 <i>Amplificación, purificación y control de los nuevos plásmidos.</i>	14
3.1.6 <i>Electroforesis de DNA</i>	16
3.2 CULTIVOS CELULARES	16
3.2.1 <i>Líneas celulares</i>	16
3.2.2 <i>Descongelación de células eucariotas</i>	16
3.2.3 <i>Mantenimiento de los cultivos</i>	17
3.2.4 <i>Siembra en placa en distintas superficies</i>	17
3.2.5 <i>Diferenciación de células SH-SY5Y a neuronas</i>	17
3.2.6 <i>Fijación con paraformaldehído</i>	18
3.3 TRANSFECCIONES	18
3.4 TRATAMIENTOS	19
3.4.1 <i>Tratamientos para la inducción de estrés oxidativo</i>	19
3.4.2 <i>Tratamiento de células con aSyn exógena</i>	20
3.5 WESTERN BLOT	20
3.5.1 <i>Extracción de proteínas</i>	20
3.5.2 <i>Electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE)</i>	20
3.5.3 <i>Transferencia</i>	21
3.5.4 <i>Incubación anticuerpos y revelado</i>	21
3.5.5 <i>Electroforesis “nativa” en gel de poliacrilamida</i>	21
3.6 MICROSCOPIA	22
4. RESULTADOS	23
4.1 PLÁSMIDOS Y SOBREEXPRESIÓN DE PROTEÍNAS	23
4.1.1 <i>Construcción de los plásmidos</i>	23

4.1.2 Comprobación de la eficiencia de transfección de células con los vectores.	25
4.1.3 Análisis mediante microscopía del efecto de la sobreexpresión de las proteínas en células.	27
4.1.4 Análisis mediante Western blot de la sobreexpresión de las proteínas en células.	29
4.2 COTRANSFECCIONES Y ESTUDIO DE COLOCALIZACIÓN	31
4.2.1 Cotransfecciones y estudio de colocalización de <i>aSyn</i> y <i>tau</i> en HeLa	31
4.2.2 Puesta a punto de la transfección de las SH-SY5Y	35
4.2.3 Cotransfecciones y estudio de colocalización de <i>aSyn</i> y <i>tau</i> en SH-SY5Y	37
4.3 TRATAMIENTOS	38
4.3.1 Inducción de estrés oxidativo en HeLa y SH-SY5Y	38
4.3.2 Tratamiento de células SH-SY5Y con α -Sinucleína exógena.	40
5. DISCUSIÓN.....	41
6. CONCLUSIONES / CONCLUSIONS	44
7. BIBLIOGRAFÍA.....	45
ANEXO A	50
ANEXO B: MAPAS DE LOS PLÁSMIDOS EMPLEADOS EN EL TRABAJO	51

ABREVIATURAS

AEP	Asparagine endopeptidase
aSyn	Alfa-sinucleína
ATRA	<i>All-trans retinoic acid</i>
CNS	Sistema nervioso central
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPBS	<i>Dulbecco's phosphate buffered saline</i>
DTT	Diitiotriol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGFP	<i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i>
ER	Enzima de restricción
FBS	Suero Fetal bovino (por sus siglas en inglés)
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GJ	GeneJuice
LB	Cuerpos de Lewy
LN	Neuritas de Lewy
MPTP	1-metil-4-fenil,6-tetrahidropiridina
mRFP	<i>monomeric Red fluorescent protein</i>
NAC	<i>Non Amyloid Component</i>
PCR	Reacción en cadena de la Polimerasa
PD	Enfermedad de Parkinson
PDL	Poli-D-Lisina
PFA	Paraformaldehído
PVDF	Fluoruro de polivinilideno
RIPA	<i>Radioimmunoprecipitation assay buffer</i>
SDS	Dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis desnaturalizante
SNC	Sustancia Negra pars compacta
SOB	<i>Super Optimal Broth</i>
TB	Tris-Borato
TBE	Tris-Borato EDTA
TBST	Tris Buffer Saline Tween
TH	Tirosina Hidroxilasa
VF	ViaFect
WB	Western blot
WT	<i>wild type</i>

RESUMEN / ABSTRACT

La enfermedad de Parkinson (PD) es la segunda enfermedad neurodegenerativa más común después del Alzheimer y su característica anatómico-patológica principal son los cuerpos de Lewy compuestos mayoritariamente por alfa-sinucleína (aSyn), una proteína intrínsecamente desordenada que se encuentra en los terminales presinápticos del sistema nervioso central (SNC). Aunque se conoce que la enfermedad se extiende progresivamente desde el sistema nervioso entérico hasta el cerebro, todavía no se sabe cómo empieza a nivel molecular. Hoy en día se ha demostrado que también está implicada en la patología de PD la proteína tau y se ha verificado la interacción de la isoforma (4R/2N)N368 con la aSyn(N103) las cuales son producto de la actividad de la asparagina endopeptidasa (AEP) en condiciones fisiológicas. El presente trabajo se generan nuevos modelos celulares de PD basados, entre otros, en la interacción de estas dos proteínas, pero empleando la isoforma 4R/0N de tau para comprobar si también hay interacción con aSyn o con aSyn(N103). Para ello se generaron los vectores correspondientes para la sobreexpresión de las distintas isoformas fusionadas a proteínas fluorescentes. Los datos visualizados por microscopía no muestran cambios en la localización celular de aSyn frente a aSyn(N103), sin embargo, se manifiestan cambios en la localización celular de tau(4R/0N) frente a la localización de tau(4R/0N)N368 la cual parece perder la capacidad de unión a microtúbulos. Por otra parte, no se detecta colocalización ni interacción de dichas proteínas con los métodos empleados. Además, se indujo estrés oxidativo a cultivos celulares sobreexpresando dichas proteínas siendo los tratamientos con citrato amónico férrico, arsenito de sodio los que muestran un indicio de agregación de aSyn. No se detectaron diferencias en presencia o no de tau en el tratamiento de estrés oxidativo ni en la captación de aSyn exógena.

Parkinson's Disease (PD) is the second most common neurodegenerative disease after Alzheimer's disease and its anatomopathological hallmark are Lewy Bodies (LB), primarily composed of alpha-synuclein (aSyn). aSyn is an intrinsically disordered protein typically localised in presynaptic terminals of the central nervous system (CNS). Although it has been previously described the disease spreading from the enteric nervous system (ENS) to the central nervous system (CNS) it remains unclear how the initial process is regulated at a molecular level. Tau protein has been recently implicated in PD and the interaction of the (4R/2N(N368) isoform with aSyn(N103) has been reported. Both protein isoforms are produced by the selective cleavage of the asparagine endopeptidase (AEP) and show a stronger interaction with respect to the full-length isoforms, promoting the aggregation of each other. From here we generate new PD cellular models based on this interaction but using instead tau(4R/0N) isoform to analyse the interaction of this tau isoform with aSyn and aSyn(N103). Vectors were generated to overexpress the different isoforms with fluorescent protein tags. We did not find differences in the cellular localization of aSyn and aSyn(N103) by microscopy, nevertheless we described changes in tau(4R/0N) localization versus tau(4R/0N)N368, which loses its ability to bind to microtubules. No colocalization was found for the different tau and aSyn protein variants. In addition, we induced oxidative stress in the cells, and found that sodium arsenite and ferric ammonium citrate apparently triggered aSyn aggregation. The effects of cellular stress and aSyn uptake were apparently independent on the overexpression of either tau isoform.

1. INTRODUCCIÓN / ANTECEDENTES

1.1 La enfermedad de Parkinson

La enfermedad de Parkinson (PD) es el trastorno neurodegenerativo más común después de la enfermedad de Alzheimer. Descrita en 1817 por el doctor James Parkinson y posteriormente redefinida por el neurólogo Jean-Martin Charcot, se trata de una enfermedad crónica y compleja caracterizada por manifestaciones clínicas motoras como bradicinesia, rigidez muscular, temblor y alteraciones en la postura y en la forma de andar, así como por manifestaciones no motoras como pérdida del olfato, trastornos del sueño, depresión y ansiedad (1,2).

1.1.1 Epidemiología

Se estima que actualmente hay entre 7 y 10 millones de personas con PD en el mundo, habiendo una prevalencia con valores que varían entre 100 y 200 por 100.000 habitantes (3). Los valores de incidencia incrementan con la edad alcanzándose el pico en el grupo de 70-79 años, donde los valores llegan a 100-130 casos anuales por 100.000 habitantes. Además de la edad, otro factor influyente es el sexo, habiendo mayor incidencia de PD en hombres (4). Por otra parte, los avances en medicina y el incremento de la esperanza de vida, se relacionan también con el aumento de la prevalencia del Parkinson. Entre 1990 y 2016 la prevalencia de la PD incrementó un 74% y, dada la tendencia actual a una población cada vez más envejecida, se espera que en las próximas décadas la prevalencia continúe aumentando del mismo modo suponiendo cada vez una carga social y económica mayor (5,6). En cuanto a la mortalidad, aunque no aumenta en la primera década tras el diagnóstico, sí lo hace ligeramente en los años posteriores.

1.1.2 Patogenia

La enfermedad de Parkinson se caracteriza por la degeneración de neuronas dopaminérgicas en la porción compacta de la sustancia negra (SNC) del mesencéfalo y su marcador anatomopatológico más característico son los Cuerpos de Lewy (LB), compuestos preferentemente por α -sinucleína (aSyn), que se distribuyen tanto por diferentes estructuras cerebrales (núcleo olfatorio, corteza cerebral, troncoencéfalo) como a lo largo del tubo digestivo.

La zona más afectada de la sustancia negra, la SNC, contiene neuronas dopaminérgicas pigmentadas que proyectan sobre el núcleo estriado, de modo que el daño en esta región supone una depleción de los niveles de dopamina en este núcleo. El estriado está implicado en el control del movimiento a través de la proyección corticoestriada y regula dicho movimiento mediante dos vías, directa (activadora) e indirecta (inhibidora), las cuales a su vez se encuentran influenciadas por la dopamina procedente de la SNC. En la PD la falta de dopamina causa alteraciones en estas vías provocando una disminución del control del movimiento que se manifiesta con síntomas motores tales como bradicinesia, temblores o inestabilidad postural (7,8).

Aunque ni la pérdida de neuronas en la sustancia negra ni el depósito de aSyn son exclusivos de la enfermedad de Parkinson, estas dos características neuropatológicas son específicas para su diagnóstico cuando aparecen juntas (5,9,10). Además de la lesión distintiva en la sustancia negra, en la PD también puede producirse pérdida neuronal en otros sistemas no dopaminérgicos como el colinérgico (núcleo basal de Meynert, núcleo pedúnculo-pontino), noradrenérgico (*locus coeruleus*) e incluso el sistema vegetativo autónomo (8,11).

1.1.3 Cuerpos de Lewy

Los cuerpos de Lewy son inclusiones intracitoplasmáticas esféricas, de 8-30 µm de diámetro que pueden visualizarse de color rosa en una tinción típica de hematoxilina/eosina (12). Generalmente se distingue entre los cuerpos de Lewy clásicos del tronco del encéfalo y los cuerpos de Lewy corticales. Mientras que los LB clásicos presentan un núcleo denso de aspecto granular y un halo periférico compuesto por filamentos radiales dispuestos de manera más ordenada, los LB corticales suelen tener una forma más irregular y aspecto homogéneo sin regiones/estructuras bien definidas (12,13). Además, también pueden encontrarse lo que se conoce como cuerpos pálidos (posibles precursores de los LB), las Neuritas de Lewy (LN) en los procesos neuronales, principalmente axones, y placas de Lewy en el espacio extracelular en la corteza cerebral en presencia de LN y LB (14).

En cuanto a su composición, aunque la aSyn es la proteína mayoritaria en los LB (15) hay otras presentes entre las que destacan neurofilamentos, ubiquitina o la proteína p62 de unión a ubiquitina (11). Estudios inmunohistoquímicos han demostrado que los LB contienen más de 90 moléculas diferentes que incluyen proteínas que interaccionan con aSyn (tau, MAP 1B, synphilin-1), productos genéticos relacionados con la PD (aSyn, LRRK2, parkin, Pink-1), proteínas relacionadas con la mitocondria y moléculas relacionadas con el sistema de ubiquitina-proteasoma, autofagia y formación de agresomas (13).

En la PD los cuerpos de Lewy se localizan típicamente en las neuronas dopaminérgicas de la SNc pero también pueden encontrarse en otras zonas del sistema nervioso central incluyendo bulbo olfatorio, hipotálamo, *locus coeruleus*, núcleos basales de Meynert, núcleo dorsal del rafe, núcleo dorsal del nervio vago, corteza cerebral, cerebelo o espina dorsal, así como en el sistema nervioso periférico (12). A pesar de ser el hallazgo histopatológico típico de la enfermedad de Parkinson, no son específicos de esta enfermedad y están presentes en otros trastornos como la demencia con cuerpos de Lewy, “Incidental LB disease” o la enfermedad de Alzheimer con LB límbicos predominantes (13).

El mecanismo de formación de los cuerpos de Lewy así como su papel en la neurodegeneración y en la enfermedad de Parkinson no está del todo claro y está en debate si se trata de inclusiones neurotóxicas o por el contrario de procesos neuroprotectores. Algunos estudios defienden su acción neuroprotectora, relacionando

la formación de los LB con los agresomas que aparecen en respuesta al estrés proteolítico (12), afirmando que no son el primer signo de degeneración en las neuronas vulnerables de la SNc (16) o sugiriendo que los agregados fibrilares de los LB secuestran otras formas neurotóxicas no fibrilares de aSyn (13). Otros, en cambio, sostienen que las LN pueden interrumpir el transporte axonal induciendo así una mayor concentración de aSyn en el soma, pudiendo desencadenar la formación de LB (14) y que el proceso de formación de LB promueve la neurodegeneración alterando las funciones celulares e induciendo daño en las mitocondrias y disfunción sináptica (17).

1.2 α-Sinucleína

1.2.1 Estructura de la α-Sinucleína

La aSyn es una proteína perteneciente a la familia de las sinucleínas, de la que también forman parte la beta-sinucleína y la gamma-sinucleína (18). Se trata de una proteína pequeña, de 140 aminoácidos, intrínsecamente desordenada en solución acuosa aunque con capacidad de formar hélices alfa mediante la unión a lípidos cargados negativamente (19). En su estructura pueden distinguirse tres regiones, la región amino-terminal que contiene los 60 primeros residuos, es anfipática y está implicada en la unión de la proteína con lípidos. Esta región muestra además gran similitud con el dominio de unión a lípidos de las apolipoproteínas contando con cuatro repeticiones de 11 aminoácidos con tendencia a formar hélices alfa (18,20,21). La parte central, formada por los residuos 61-95, es una región hidrofóbica denominada región NAC (non-amyloid component) conocida por ser el dominio de agregación. Por último, el extremo C-terminal está relacionado con la unión a calcio, la interacción con otras proteínas como tau e inhibición de la agregación (20–22). La aSyn está además sometida a modificaciones postraduccionales (PTMs) que influyen en su estructura y función. La más estudiada es la fosforilación por su implicación en la patología. La aSyn fosforilada en S129 se encuentra comúnmente en depósitos intracelulares en diferentes sinucleopatías y se ha relacionado con la agregación de la proteína (23). Otras modificaciones relevantes en la aSyn son la oxidación, nitración y ubiquitinación, típica en los LB.

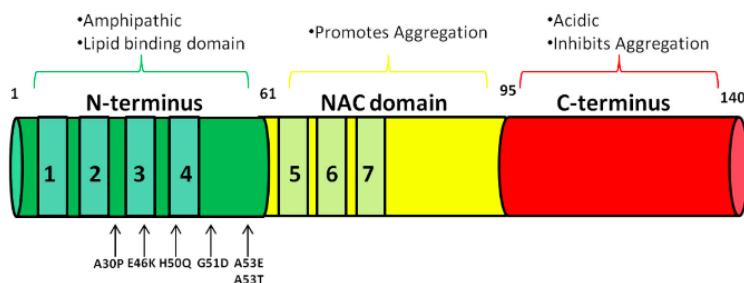


Figura 1. Representación esquemática de la estructura de aSyn con los dominios principales y sus implicaciones, así como con algunas de las mutaciones más características de la PD. (Imagen tomada de Butler et al (2017))

1.2.2 Malplegamiento y agregación de la α -Sinucleína

Generalmente las proteínas intrínsecamente desordenadas tienen una secuencia primaria que previene la agregación. En el caso de la aSyn la región NAC, más hidrofóbica, es la responsable de la agregación pero en condiciones fisiológicas las cargas de los extremos terminales la estabilizan evitando que la proteína agregue (23). No obstante, este equilibrio puede ser alterado por cambios en el entorno, mutaciones o modificaciones posttraduccionales que conducen al malplegamiento y la agregación. Alteraciones en el entorno como, por ejemplo, un pH más ácido (como puede ser el del interior de endosomas y lisosomas) promueve la agregación de la aSyn (24). Asimismo, se han descrito al menos 6 mutaciones puntuales en la aSyn relacionadas con sinucleopatías hereditarias: A30P, E46K, H50Q, G51D, A53T y A53E. Además de afectar a la función de la proteína alterando por ejemplo su interacción con lípidos, estas mutaciones influyen en su capacidad para agregar. Las mutaciones E46K, H50Q y A53T aumentan la tendencia a agregar de la aSyn (25–28), G51D y A53E la disminuyen (26,29) y A30P parece promover la formación de oligómeros pero no de fibrillas (30). La tendencia a agregar también puede verse influida por modificaciones posttraduccionales como determinadas fosforilaciones o por la truncación del extremo C terminal. El proceso de agregación es termodinámicamente favorable ya que hace que disminuya la superficie hidrofóbica expuesta de la proteína. Primero se forman oligómeros, éstos dan lugar a fibrillas que más tarde se asocian para formar las fibras amiloides las cuales crecen rápidamente mediante la adición de monómeros (24).

1.2.3 α -Sinucleína en la célula, función y toxicidad

La aSyn se expresa preferentemente en las neuronas del sistema nervioso central (CNS) principalmente en el núcleo estriado, neocortex, hipocampo, tálamo y cerebelo (31). En dichas neuronas la aSyn puede representar hasta un 1% de las proteínas citoplasmáticas (19) localizándose mayoritariamente en los terminales presinápticos aunque también se ha confirmado su presencia en núcleo y mitocondrias (19,32–34). Es difícil determinar la función, así como el carácter tóxico de la proteína ya que como se muestra a continuación, la aSyn está implicada en multitud de procesos celulares.

1.2.3.1 Papel de la aSyn en membranas/vesículas sinápticas

La función fisiológica de la aSyn es un tema todavía en debate. Gran parte de la investigación al respecto apunta a que actúa en los terminales presinápticos regulando la transmisión en la sinapsis, lo cual estaría en concordancia con su localización subcelular y la colocalización con las vesículas sinápticas. De acuerdo con esto, se ha sugerido que la aSyn desempeña diversas funciones en el reciclaje de las vesículas modulando su tamaño y movilización. Dado que carece de un claro dominio transmembrana, la aSyn depende de su extremo N-terminal para la unión a membranas. Se ha visto que tiene preferencia por membranas con gran curvatura, como son las de las vesículas debido a su pequeño tamaño, y por determinados dominios ricos en colesterol tipo balsas lipídicas. No obstante, la interacción con las vesículas sinápticas parece ser débil y la proteína muestra gran movilidad (33). Todas las mutaciones del gen de la aSyn (SNCA) relacionadas con el Parkinson hereditario afectan a este dominio

N-terminal, poniendo en evidencia su importancia para la funcionalidad de la proteína. Otros estudios sostienen que la aSyn no solo interacciona con estos microdominios de membrana sino que contribuye a su formación mediante la interacción con lípidos pudiendo influir en el tráfico y la fluidez de las membranas (33). Además, la aSyn se purificó como un inhibidor de la fosfolipasa D2 (PLD2), proteína implicada en el tráfico de membranas y la exocitosis (35). Por otro lado, se ha descrito también la interacción entre el extremo C-terminal de la aSyn con la proteína VAMP2 cuyo papel es esencial en la exocitosis durante la sinapsis, así como la capacidad de la aSyn para promover la formación del complejo SNARE también fundamental en la liberación del contenido de las vesículas sinápticas (23,36).

1.2.3.1 aSyn en la Señalización Ca²⁺

El Ca²⁺ regula diferentes mecanismos de señalización, salud neuronal y neurotoxicidad. Se ha propuesto que un exceso de aSyn podría tener efectos tóxicos en las neuronas dopaminérgicas mediante la disruptión de la homeostasis del Ca²⁺. Diversos estudios han investigado el potencial mecanismo centrándose en diferentes aspectos como la posible función de la región NAC de la aSyn en la regulación del flujo de Ca²⁺ (37), o la influencia de la aSyn monomérica extracelular sobre los canales de calcio Cav2.2 (38). Asimismo, se ha observado que la alteración de las balsas lipídicas en la membrana debido a la sobreexpresión de aSyn puede provocar cambios en los microdominios en los que se encuentran los canales Cav2.2 afectando a su función y a la liberación de dopamina (38).

1.2.3.3 aSyn influye en los niveles de dopamina

El aumento de la aSyn (WT) en la célula afecta a la transmisión de la dopamina a múltiples niveles: síntesis, almacenamiento, reciclaje, recuperación y eflujo. Se han observado desajustes en la función y actividad de la tirosina hidroxilasa (TH), la enzima necesaria para la síntesis de DOPA, precursor de la dopamina, transportador de dopamina (DAT) y el transportador VMAT2 previos a la muerte celular (21,39–44).

1.2.3.4 aSyn en la mitocondria

Una de las características de las sinucleinopatías es la actividad deficiente de las mitocondrias. De hecho, una de las maneras de generar modelos de PD es el uso de toxinas como el MPTP o la rotenona, que inducen disfunción mitocondrial (23). Múltiples estudios han confirmado la presencia de aSyn en la mitocondria así como su capacidad para alterar la función de esta provocando un aumento del estrés oxidativo en la neurona (19,45,46). Existe un grupo de 32 aminoácidos en la región N-terminal de la aSyn que actúa de secuencia señal para su localización en la mitocondria, donde se encuentra mayoritariamente en la membrana interna asociada al complejo I (47). Aunque los niveles constitutivos de aSyn en la mitocondria podrían ser importantes para el mantenimiento de los complejos respiratorios se ha demostrado la correlación entre el aumento de aSyn mitocondrial y la inhibición de la función del complejo I (47–49). Además de la inhibición del complejo I, la aSyn interfiere en la membrana mitocondrial promoviendo la fragmentación (50,51), alterando la dinámica mitocondrial (52), morfología, permeabilidad y el potencial de membrana aumentando los niveles de las

especies reactivas de oxígeno (ROS) (53–55), y causando defectos en la mitofagia (56). Muchos de estos efectos sobre la mitocondria son más prominentes en la expresión de la aSyn con la mutación A53T.

1.2.3.5 aSyn y el citoesqueleto

Cabe la posibilidad de que la aSyn afecte a la dinámica de los microtúbulos. Se ha detectado interacción entre la aSyn y la tubulina, no obstante no está claro cual es el efecto que tiene esta interacción (19). Aunque no se sabe de qué manera, la aSyn puede afectar a la polimerización de la tubulina, y a su vez la despolimerización de ésta parece interferir en la maduración de las fibras de aSyn, produciendo mayor neurotoxicidad (57). Otra interacción descrita relacionada es la de aSyn y la proteína tau, de hecho, se ha visto que cada una de ellas tiene la capacidad de inducir la agregación de la otra (58). Además se ha demostrado que el aumento de aSyn promueve la fosforilación de tau (en Ser 262) y causa inestabilidad en los microtúbulos (59).

1.3 Tau

La proteína tau es una proteína que se identificó como factor de ensamblaje de los microtúbulos y cuya función está relacionada con la regulación de los microtúbulos en los axones. Esta proteína se conoce ampliamente por ser el componente principal de los agregados fibrilares característicos de la enfermedad de Alzheimer (60), no obstante, se encuentra presente en muchas otras enfermedades neurodegenerativas denominadas tauopatías. Además, se han descrito inclusiones de tau en pacientes con la enfermedad de LB, una sinucleopatía.

En el sistema nervioso central (SNC) se pueden encontrar 6 isoformas de tau, que difieren entre sí según la presencia o ausencia de los exones sujetos a *splicing* alternativo, estos son el exón 2 el 3 y el 10 (61). Respecto a su secuencia, en la proteína tau se pueden distinguir 4 regiones; del aminoácido 1 al 171 la región N-terminal (NTR), del 172 al 243 la región rica en prolina (PRR), del 244 al 368 la región de unión a microtúbulos (MBR) y del 369 al 441 (en la isoforma más larga) la región C-terminal (CTR) (62). La región NTR sobresale de la superficie del microtúbulo cuando la proteína se une a éste por la región MBR y puede mediar interacciones con otros componentes. La región MBR de unión a microtúbulos se caracteriza por constar de cuatro repeticiones a través de las cuales además de mediar la unión a microtúbulos se ha visto que puede interaccionar con aSyn, lo cual se detallará en el siguiente apartado.

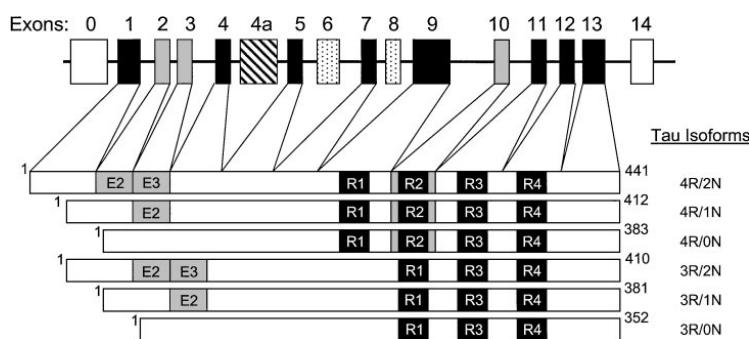


Figura 2. Esquema de las diferentes isoformas de la proteína tau en el que se representan los exones sujetos a *splicing* alternativo (gris) así como las repeticiones de la región de unión a microtúbulos (negro). Imagen tomada de Lee et al. (2001)

1.4 Propagación de la alfa-synucleína en la Enfermedad de Parkinson.

Desde hace décadas hay estudios describiendo la transmisión retrógrada de la aSyn por el nervio vago hacia el cerebro y se ha cuestionado si la PD podía ser una enfermedad tipo *prion-like* dada la transmisión aparente de célula a célula. Característicamente todas las neuronas susceptibles a captar y transmitir la aSyn tienen en común cinco características: contienen aSyn presináptica, pertenecen a las llamadas neuronas de proyección, contienen gránulos de lipofuscina o neuromelanina, tienen un axón de calibre delgado y extremadamente largo y por último son neuronas no mielinizadas o cubiertas por una capa muy fina de melanina. (14) Braak et al describió en 2003 como era la transmisión de la PD en el cerebro dividiéndola en 6 etapas según se va avanzando por las diferentes regiones del cerebro (63). Asimismo, como se ha mencionado ya había sido descrita con anterioridad la transmisión de la aSyn a través del nervio vago hacia el cerebro (64), pero se desconocía el proceso por el cual se inicia la agregación de la aSyn en el intestino.

Estudios recientes han descrito la acción de la asparagina endopeptidasa (AEP) sobre la aSyn. Esta enzima es capaz de cortar la aSyn promoviendo su agregación y neurotoxicidad. La AEP la cual se activa de manera dependiente a la edad, escinde la aSyn por la posición N103 y se ha visto que está altamente activa en los cerebros de pacientes con PD. Resulta de gran interés conocer que también se ha descrito la acción de esta enzima sobre la proteína tau, a la cual corta por la posición N368 y que ambas proteínas escindidas interaccionan e inducen la agregación de la otra (65–67). Asimismo, se ha demostrado que es la única enzima por el momento que corta en la asparagina por el extremo C-terminal y cuya actividad es capaz de activarse por la rotenona, vía intestinal. Partiendo de esta base se ha planteado la hipótesis del inicio de la PD en el intestino mediado por la activación de la AEP y su función sobre aSyn y Tau. Cabe destacar que en los estudios de interacción llevados a cabo con aSyn y tau, la aSyn(N103) y tau(N368) son las especies que muestran mayor afinidad (67).

2. OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo es el estudio de la interacción entre α -sinucleína y tau en modelos celulares de la enfermedad de Parkinson. Partiendo de la hipótesis de que α -sinucleína y tau (4R/2N)N368 interaccionan en condiciones fisiológicas se propone el estudio de la interacción entre α -sinucleína y tau (4R/0N)N368 en modelos celulares. Para lograrlo se dividió dicho objetivo general en cuatro objetivos específicos.

1. Obtención de vectores que permitan expresar α -sinucleína, α -sinucleína (N103), tau y tau (N368) en diferentes tipos celulares.
 - Diseñar y construir plásmidos que permitan expresar α -sinucleína y α -sinucleína (N103) como proteínas de fusión a una proteína roja fluorescente.
 - Diseñar y construir plásmidos que permitan expresar tau y tau (N368) como proteínas de fusión a una proteína verde fluorescente.
2. Estudiar la localización e interacción de las proteínas en diferentes líneas celulares.
 - Sobreexpresar ambas especies de α -sinucleína y tau en diferentes tipos celulares, juntas y por separado.
3. Estudio del inicio de la agregación de α -sinucleína en SH-SY5Y.
 - Inducir estrés oxidativo para estudiar el comportamiento de las proteínas, juntas y por separado, en diferentes condiciones.
4. Comprobar el efecto de las diferentes proteínas sobre la internalización de la α -sinucleína exógena.
 - Comprobar si la captación de α -sinucleína, así como su comportamiento una vez en el interior de la célula, se ve modificado en células que sobreexpresen α -sinucleína o alguna de las dos formas de tau.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Clonajes

Se procedió al diseño y construcción de plásmidos que permitiesen el estudio de distintas especies de aSyn y tau dentro de la célula mediante la sobreexpresión de las mismas fusionadas a proteínas fluorescentes. Partiendo de que se disponía de prK5-EGFP-Tau(4R/0N) (Addgene, #46904) se diseñaron los plásmidos de aSyn con mRFP (proteína fluorescente roja monomérica) para poder estudiar ambas proteínas de manera simultánea en las células. Se obtuvieron por tanto cuatro plásmidos para el consiguiente trabajo en células, dos de tau con EGFP con fluorescencia verde y dos de aSyn con mRFP con fluorescencia roja. A cada uno de los nuevos plásmidos se le otorgó un código siguiendo la nomenclatura del laboratorio como se muestra a continuación.

pJAC321: pCMV-Myc-mRFP-aSyn

Para la construcción de pJAC321 se obtuvo la secuencia de aSyn(wt) de pJAC300 (pT7.7-aS(wt)) y se introdujo en pJAC295 (pCMV-Myc-mRFP-TM BclXL) del cual se elimina el TM (dominio transmembrana) de BclXL, ambos plásmidos disponibles en el laboratorio. De esta forma se consigue la expresión en eucariotas de una proteína de fusión Myc-mRFP-aSyn (el epitopo myc permite la detección de la proteína con anticuerpos anti-myc). TM BclXL está clonado después de un sitio Hind III (al final de mRFP) por lo que se diseña un cebador directo para aSyn(wt) con HindIII en el marco de lectura adecuado y uno reverso con un codón de stop y un sitio NotI de manera que tras amplificar el fragmento por PCR se pueda clonar en pJAC295 digerido con HindIII y NotI.

pJAC322: pCMV-Myc-mRFP-aSyn(N103)

En este caso, el objetivo fue expresar la aSyn delecionada a partir de la asparagina 103 (N103). Al igual que para el pJAC321, se emplea pJAC300 (pT7.7-aS(wt)) para obtener el inserto por el que se sustituye TM-BclXL en el plásmido pJAC 295 (pCMV-Myc-mRFP-TM BclXL). Se usa el mismo cebador directo que para el pJAC 321 pero un cebador reverso diferente que introduce un sitio NotI y un codón de terminación pero hibridando en la región de la N103.

pJAC323: pRK5-EGFP-Tau(4R/0N)N368

Para el diseño del plásmido pJAC323 partimos de pJAC318 (pRK5-EGFP-Tau(4R/0N)). Al igual que sucede con la aSyn se ha observado que la AEP corta tau. De éste amplificamos por PCR Tau únicamente hasta la asparagina **N310**, que equivale a la N368 de la isoforma 4R/2N, es decir, el aminoácido por donde cortaría la AEP. Los cebadores primers empleados en este caso son un primer forward EGFPF y un primer reverse que introduce un codón de stop tras la asparagina y un sitio Sall. De esta forma tras la PCR y la posterior digestión el nuevo inserto puede ligarse al plásmido pJAC318 al que se le ha eliminado la secuencia correspondiente a la proteína tau entera mediante las enzimas de restricción BamHI y Sall.

La información acerca de todos los plásmidos utilizados en el presente trabajo puede consultarse en la Tabla A1 del Anexo A.

Tabla 1. Resumen de los plásmidos utilizados en este trabajo.

pJAC 321 (pCMV-Myc-mRFP-aSyn)	
Plásmido donador	pJAC300: (pT7.7-aS(wt))
Plásmido aceptor	pJAC295: (pCMV-Myc-mRFP-TM BclXL)
Inserto	aSyn(wt)
Cebador directo 5'→3'	aSHind-F: CTAGGATCAAGCTTatggatgtattcatgaaagg
Cebador reverso 5'→3'	aSNot-R: CTAGGATCGCGGCCGC <u>ttaggcttcaggttcgtagtc</u>
Tm PCR	54,9 °C
Producto PCR	453 pb
Producto PCR digerido	430 pb
pJAC 295 digerido	4441 pb
Plásmido resultante	4871 pb
pJAC322 (pCMV-Myc-mRFP-aSyn(N103))	
Plásmido donador	pJAC300 (pT7.7-aS(wt))
Plásmido aceptor	pJAC 295 (pCMV-Myc-mRFP-TM BclXL)
Inserto	pJAC 295 (pCMV-Myc-mRFP-TM BclXL)
Cebador directo 5'→3'	aSHind-F: CTAGGATCAAGCTTatggatgtattcatgaaagg
Cebador reverso 5'→3'	aSN103NotR: CTAGGATCGCGGCCG <u>ctaattctgcccaactggcct</u>
Tm PCR	54,9 °C
Producto PCR	342 pb
Producto PCR digerido	319 pb
pJAC 295 digerido	4441 pb
Plásmido resultante	4760 pb
pJAC323 (pRK5-EGFP-Tau(N368))	
Plásmido donador	pJAC318 (pRK5-EGFP-Tau (4R/0N))
Plásmido aceptor	pJAC318 (pRK5-EGFP-Tau (4R/0N))
Inserto	Tau(N368)
Cebador directo 5'→3'	EGFPF(Forward-VN173(EGFP)(C_T)): caagatccgccacaacatcgag
Cebador reverso 5'→3'	Tau368SalR: CTAGGATCGTCGACT <u>CAattcctccgccaggacgt</u>
Tm PCR	65,3 °C
Producto PCR	1152 pb
Producto PCR digerido	936 pb
pJAC 318 digerido	5364 pb
Plásmido resultante	6300 pb

3.1.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Con el objetivo de amplificar los diferentes insertos a clonar se llevó a cabo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Todas las reacciones se hicieron en un volumen final de 25 μl de mezcla de PCR, cuyos componentes se recogen en la Tabla 2, utilizando un termociclador MiniCycler (MJ Research) siguiendo el programa que se muestra en la Tabla 3. Una vez amplificados, se tomaron alícuotas de los productos de PCR amplificados para realizar una electroforesis en gel de agarosa (1,2% agarosa, 90V, 30-40 min) para comprobar la correcta amplificación. Una vez confirmado, se purificó el resto de la muestra con el kit FavorPrep™ GEL/PCR Purification Kit (Favorgen) siguiendo los pasos de la casa comercial y eluyendo el DNA con un volumen de 40 μl .

Tabla 2. Composición de las mezclas de reacciones de PCR empleadas en los clonajes.

Reactivos	Volumen	Concentración final
Primers (5μM)	1 μl	0,2 μM
DNA molde (1ng/μl)	1 μl	0,04 ng/ μl
Buffer 5x	5 μl	1x
dNTPs (2,5 mM)	2,5 μl	0,25 mM
DNA polimerasa Phusion (2 U/μl)	0,25 μl	0,02 U/ μl
Betaína (5M)	5 μl	1 M
DMSO	0,625 μl	0,025%
Agua MiliQ	9,625 μl	

Tabla 3. Programa de PCR empleado. Los pasos del 2 al 4 se repiten un total de 30 ciclos.

Paso	Temperatura	Tiempo
1. “Hot start”	98°C	30”
2. Desnaturalización	98°C	10”
3. Hibridación	Tm	30”
4. Extensión	72°C	1'
5. Final reacción	72°C	10'
	4°C	∞



30 ciclos

3.1.2 Digestión y purificación

Por un lado, se llevaron a cabo las digestiones (37°C, 1 h) de los plásmidos aceptores en los que se van a introducir los insertos.

- pJAC 295 - pCMV-Myc-mRFP-TM BclXL. Se digirió 2 µg de DNA con 1 µl de HindIII y 1 µl de NotI .
- pJAC 318 - pRK5-EGFP-Tau(4R/0N), se digirió 2 µg de DNA con 1 µl de BamHI y 1 µl de Sall en un volumen total de 30 µl.

(Se hizo en este volumen ya que las enzimas están disueltas en 50% glicerol y no es recomendable que éste supere una concentración del 10% en la reacción final para no inhibir la actividad enzimática).

Una vez digeridos los plásmidos, se cargó todo el volumen de digestión en un gel de agarosa (1,2%) en TBE y se realizó una electroforesis a 80V para separar por tamaños el fragmento cortado del plásmido restante. A continuación, se cortó con bisturí, directamente del gel, la banda de interés que contiene el plásmido digerido, el cual se purificó con el kit FavorPrep™ GEL/PCR Purification Kit (Favorgen) siguiendo los pasos de la casa comercial. Una vez eluido se determinó su concentración espectrofotométricamente.

Obtenidos los productos de PCR purificados y revisados se procedió a su digestión con las enzimas de restricción correspondientes para cada fragmento de manera que queden con extremos complementarios a los de los plásmidos digeridos en los que se van a clonar. Las digestiones se realizaron en un volumen total de 50µl tal y como muestra la Tabla 4, a una temperatura de 37°C durante una hora. Todas las enzimas de restricción utilizadas son enzimas Fast Digest™ (Thermo Fisher Scientific) y, por tanto, todas funcionan en el mismo tampón de reacción. Tras la digestión con enzimas de restricción, los productos de PCR digeridos se purificaron con el kit FavorPrep™ GEL/PCR Purification Kit (Favorgen) y se midió su concentración.

Tabla 4. Digestión de los productos de PCR purificados.

aS(wt)	aS(N103)	Tau(N368)	Volumen
Producto PCR purificado	Producto PCR purificado	Producto PCR purificado	40 µl
HindIII	HindIII	BamHI	2 µl
NotI	NotI	Sall	2 µl
Fast Digest Buffer (5x)	Fast Digest Buffer (5x)	Fast Digest Buffer (5x)	5 µl
Agua MiliQ	Agua MiliQ	Agua MiliQ	1 µl

3.1.3 Ligación

Una vez purificados los vectores y los insertos digeridos y sabiendo su concentración, se procedió a la ligación. La enzima empleada para la ligación fue la T4 DNA Ligasa, 5 U/ μ l (Thermo Scientific) y todas las ligaciones se realizaron en baño termostatizado a 16°C durante toda la noche. Para la ligasa de la que se disponía, la casa comercial recomienda una cantidad de vector de entre 20 y 100 ng por lo que los cálculos de los diferentes ratios de ligación se hicieron en función a una cantidad de plásmido-vector de 50ng. En el caso de la construcción de pJAC 321 se probaron tres ratios de ligación vector:inserto (1:3, 1:5 y 1:10) los cuales se calcularon con la herramienta bioinformática *Ligation Calculator* (Universidad de Düsseldorf). Para pJAC 322 y pJAC 323 se aplicó directamente el ratio de ligación 1:3 que es el típico de ligación de extremos cohesivos. En todas las ligaciones se pusieron además tres reacciones de control.

Tabla 5. Esquema de reacciones de ligación para la construcción del plásmido pJAC321, partiendo del vector digerido y purificado pJAC 295 (4414pb, 11,04 ng/ μ l) y del inserto aSyn(wt), producto de PCR degerido y purificado, (430pb, 318,9ng/ μ l).

	Controles			Ratios de ligación		
	C1	C2	C3	(1:3)	(1:5)	(1:10)
pJAC 295	4,53 μ l (50ng)	4,53 μ l (50ng)	-	4,53 μ l (50ng)	4,53 μ l (50ng)	4,53 μ l (50ng)
aSyn(wt)	-	-	0,78 μ l (14,6ng)	0,78 μ l (14,6ng)	1,3 μ l (24,3 ng)	2,67 μ l (48,7ng)
Buffer 10x	2 μ l	2 μ l	2 μ l	2 μ l	2 μ l	2 μ l
T4 Ligasa	1 μ l	-	-	1 μ l	1 μ l	1 μ l
MiliQ	12,47 μ l	13,47 μ l	17,22 μ l	11,69 μ l	11,17 μ l	9,9 μ l

Tabla 6. Esquema de reacciones de ligación para la construcción del plásmido pJAC322, partiendo del vector digerido y purificado pJAC295 (4414 pb, 11,04 ng/ μ l) y del inserto aSyn(N103), producto de PCR degerido y purificado, (319 pb, 13,1ng/ μ l).

	Controles			Ratios de ligación
	C1	C2	C3	(1:3)
pJAC 295	4,53 μ l (50ng)	4,53 μ l (50ng)	-	4,53 μ l (50ng)
aSyn(N103)	-	-	0,83 μ l (10,84ng)	0,83 μ l (10,84ng)
Buffer 10x	2 μ l	2 μ l	2 μ l	2 μ l
T4 Ligasa	1 μ l	-	-	1 μ l
MiliQ	12,47 μ l	13,47 μ l	17,17 μ l	11,64 μ l

Tabla 7. Esquema de reacciones de ligación para la construcción del plásmido pJAC323, partiendo del vector digerido y purificado pJAC 318 (45364 pb, 9,61 ng/μl) y del inserto tau(N368), producto de PCR degerido y purificado, (936 pb, 37,03 ng/μl).

	Controles			Ratios de ligación
	C1	C2	C3	(1:3)
pJAC 318	5,2 μl (50ng)	5,2 μl (50ng)	-	5,2 μl (50ng)
tau(N368)	-	-	0,71 μl (26,18ng)	0,71 μl (26,18ng)
Buffer 10x	2 μl	2 μl	2 μl	2 μl
T4 Ligasa	1 μl	-	-	1 μl
MiliQ	11,8 μl	12,8 μl	17,29 μl	11,09 μl

3.1.4 Transformación

El siguiente paso tras la ligación fue la transformación por choque térmico de bacterias competentes con los nuevos plásmidos. Se añadieron 5 μl de las reacciones de ligación (diferentes ratios y controles) a un microtubo de 1,5 ml con 100 μl de bacterias competentes (*E.coli* DH5α), se resuspendió con pipeta y se dejó reposar 30 minutos en hielo. Pasado ese tiempo se procedió al choque térmico (42°C, 45 segundos) y se volvieron a dejar las bacterias en hielo durante 2 minutos, tras los cuales se agregó a cada microtubo con bacterias 300 μl de medio SOB (0,5% extracto de levadura, 2% peptona, 10mM NaCl, 2,5mM KCl, 10mM MgSO₄, 10mM MgCl₂) y se incubó a 37°C durante 45 minutos. Tras los 45 minutos se sembró todo en placas de LB con ampicilina (100 μg/ml) ya que todos los plásmidos nuevos construidos tienen resistencia a ampicilina en procariotas. Las placas se incubaron a 37°C hasta el día siguiente y se seleccionaron colonias individuales para la obtención de los plásmidos.

3.1.5 Amplificación, purificación y control de los nuevos plásmidos.

A partir de las placas de LB/ampicilina se seleccionaron colonias individuales y se establecieron inóculos de 5 ml de LB/ampicilina (100 μg/ml) que se incubaron a 37°C y 220rpm toda la noche. Cuando el cultivo estuvo bien crecido se separó una alícuota y se guardó con 20% de glicerol a -80°C (stock de glicerol). Con el volumen restante se procedió a la extracción y purificación de los plásmidos mediante el método de lisis alcalina con el kit NZYMiniprep (Nzytech), siguiendo los pasos de la casa comercial y eluyendo finalmente el plásmido en 30 μl de agua MiliQ. Se midió la concentración y pureza de los plásmidos por espectrofotometría empleando el espectrofotómetro DS-11 (DeNovix) que permite medir la absorbancia a distintas longitudes de onda empleando tan solo 2 μl de muestra, y proporciona directamente el valor de la concentración en ng/μl así como la razón de pureza (A₂₆₀/A₂₈₀, la cual debe tener un valor entre 1,8 y 2,0)

Como control de verificación de los nuevos plásmidos se hizo un último control mediante enzimas de restricción, digiriendo 1 µg de cada plásmido con diferentes combinaciones de enzimas para, a continuación, realizar una electroforesis en gel de agarosa (1% agarosa, 90V) comparando los nuevos plásmidos con los plásmidos de los que provienen. Por cada digestión se cargaron dos pocillos, con 15 y 5 µl respectivamente, para obtener bandas finas tanto con fragmentos grandes (en 5 µl) como con los pequeños (en 15 µl).

Tabla 8. Control final por digestión de los nuevos plásmidos purificados. Se realizaron digestiones de 1 µg de DNA con 0,7 µl de enzima de restricción en un volumen reacción de 20µl.

Plásmido	Enzimas Restricción	Tamaños fragmentos resultantes (pb)
pJAC 321	PstI	2665, 1212, 994
pJAC 322	PstI	2665, 1212, 883
pJAC 323	PstI, NdeI	3972, 1941, 387
pJAC 295	PstI	2665, 1212, 688
pJAC 318	PstI, NdeI	3972, 1941, 606

Finalmente, los plásmidos se enviaron a secuenciar a la empresa Sistemas Genómicos (Parque tecnológico de Valencia). Para ello se prepararon microtubos con 250-500 ng de DNA en un volumen total de 15 µl de agua MiliQ y se seleccionaron los primers de la lista que ofrece la empresa; para pJAC 321 se emplearon pREVTRED y pCMVHAPR, para pJAC 322, pREVTRED y pCVMHAPR y para pJAC 323, SP6 y EGFPC. Las secuencias de los primers pueden consultarse en la Tabla A2 del Anexo A.

Una vez se verificó la construcción del plásmido se pusieron cultivos de 100 ml de LB/Amp (100 µg/ml) y se incubó a 37°C y 220 rpm toda la noche para, al día siguiente, realizar la purificación de los plásmidos a escala mediana (midiprep) con el kit FavorPrep™ Plasmid Extraction Midi Kit (Favorgen). Se siguieron los pasos establecidos en el protocolo facilitado por la empresa a excepción de las siguientes modificaciones; tras la adición del tampón PM3 se dejaron reposar las muestras 10 minutos en hielo, después de la adición del isopropanol y después de lavar el pellet con etanol 70% las centrifugaciones se realizaron a 30.000 g durante 40 minutos a 4°C en la centrífuga Optima™ L-100 XP Ultracentrifuge (Beckman Coulter) con un rotor 90-Ti.

3.1.6 Electroforesis de DNA.

La electroforesis de DNA fue empleada en el presente trabajo como método de verificación, ya bien de los productos de PCR como de los resultados de las digestiones. Se utilizaron geles de agarosa del 1-1,2% en tampón TB 0,5X (Tris Base 45 mM pH 8, H₃BO₃ 45 mM) con SYBR® Safe DNA Gel Stain (Invitrogen). Las electroforesis se realizaron a voltajes comprendidos entre 80-90V. El patrón de peso molecular utilizado fue GeneRuler 1kb DNA Plus ladder (Thermo Scientific) y el tampón de carga utilizado para las electroforesis de DNA fue el FastDigest Green Buffer 10x (Thermo Scientific) el cual además de reactivo de densidad, tiene dos colorantes de seguimiento, permitiendo la carga directa de las muestras tras las digestiones. Para la visualización de los ácidos nucleicos en los geles se utilizó un aparato ChemiDoc (Bio-Rad).

3.2 Cultivos celulares

Todo el trabajo con cultivos celulares se llevó a cabo en cabina de flujo laminar bajo condiciones de esterilidad. El material de vidrio, así como las puntas y microtubos se esterilizaron en autoclave y las soluciones que no se pueden autoclavar se filtraron con filtro de 0,22μm. Adicionalmente, todo el material empleado en la campana se esterilizó con etanol al 70% previo a su uso.

3.2.1 Líneas celulares

En el presente trabajo se utilizaron tres líneas celulares de mamífero.

- HEK 293: Línea celular embrionaria de riñón humano, empleadas en este trabajo por su alta eficiencia de transfección.
- HeLa: Línea derivada de cancer cervicouterino, empleadas por su eficiencia de transfección, facilidad de cultivo y mantenimiento de la morfología para experimentos de microscopía.
- SH-SY5Y: Línea derivada de las células SK-N-SH de neuroblastoma, empleadas por su capacidad de diferenciación a neuronas.

3.2.2 Descongelación de células eucariotas

La descongelación de las células almacenadas en crioviales en nitrógeno líquido (-196°C) se realizó colocando el criovial en un baño termostatizado a 37°C durante el tiempo estrictamente necesario para su descongelación y añadiendo posteriormente la suspensión celular (habitualmente 1 ml) a 5 ml de medio de cultivo completo (DMEM con suero, antibióticos y glutamina adicional) para diluir el agente criopreservante (DMSO) por debajo de sus niveles de toxicidad celular lo más rápido posible. El tubo (tipo Falcon de 15 ml) se centrifugó 5 minutos a 500 g. Se descartó el sobrenadante para eliminar el DMSO y el precipitado celular se resuspendió en 5ml de medio completo y se sembró directamente en un frasco de cultivo de 25 cm². Una vez adheridas las células se les cambió el medio para eliminar posibles restos de DMSO.

3.2.3 Mantenimiento de los cultivos

Todas las líneas celulares empleadas a lo largo de este trabajo son adherentes y se cultivaron en frascos T (T flasks) de 25 o 75 cm² en medio completo: DMEM (PAN-Biotech) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS), penicilina (100 U/ml) estreptomicina (100 µg/ml) y L-Glutamina (2 mM), e incubadas a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂. Los pases, realizados en función del crecimiento de cada tipo de célula, se hicieron lavando con DPBS 1X, añadiendo 2 o 5ml de Tripsina-EDTA según la superficie del frasco y dejándola actuar de 3 a 5 minutos. La tripsina se inactivaba con medio completo previo a la centrifugación (5 minutos, 400 g). Tras la centrifugación se descartaba el sobrenadante y el pellet era resuspendido en un volumen de medio adecuado para hacer la dilución correspondiente del pase. Una fracción del pellet resuspendido se sembraba de nuevo en 5 o 10 ml de medio según la superficie del flask fuera 25 o 75 cm² respectivamente.

3.2.4 Siembra en placa en distintas superficies

Según el tipo de experimento las células se sembraron sobre la placa de plástico directamente o sobre cubreobjetos de vidrio de 0,17 mm de espesor. En el caso de la siembra directa, tras el contaje, se añadió la cantidad requerida de células en un volumen adecuado al pocillo. En la siembra sobre cubreobjetos de vidrio, éstos se esterilizaron previamente con etanol al 70% y tras colocarse en los pocillos se lavaron tres veces con DPBS 1X.

Con el objetivo de lograr una mayor adherencia de las células al sustrato, particularmente trabajando con las células SH-SY5Y en proceso de diferenciación, se trataron los cubreobjetos con Poli-D-Lisina (PDL). La PDL es un polímero sintético que se utiliza para mejorar la fijación de las células a la superficie ya que, a un pH adecuado, tiene carga positiva lo cual mejora la adherencia de la membrana celular al plástico o al vidrio. Para preparar el revestimiento se partió de un stock de PDL de concentración 2 mg/ml el cual se diluyó en borato sódico 50 µM (pH 8,5) para obtener una concentración final de PDL de 0,1 mg/ml. Esta solución se añadió a los pocillos vacíos, con o sin cubreobjetos, (500 µl/pocillo en placa de 24, 1 ml/pocillo, en placa de 12 y 2 ml/pocillo en placa de 6 pocillos) y se dejó incubando durante 2 horas a 37°C. Pasado dicho tiempo se retiró el contenido de los pocillos mediante aspiración con vacío con pipeta pasteur estéril y se lavó dos veces con DPBS 1X. Una vez lavadas las placas están listas para ser sembradas o pueden guardarse en la incubadora con medio o DPBS 1X en los pocillos.

3.2.5 Diferenciación de células SH-SY5Y a neuronas

La diferenciación de SH-SY5Y se realizó en placas de 6 y 24 pocillos, con y sin cubreobjetos, con y sin PDL, tal y como se explica en el apartado anterior. Para las diferenciaciones se sembraron las células a una densidad de 1,25·10⁴ células/cm² en medio DMEM completo con 10% de FBS. Pasadas entre 24 y 48 h y sin que las células alcancen un porcentaje alto de confluencia, se cambió el medio a DMEM con 5% FBS, 30 µM ácido trans-retinoico (all-trans retinoic acid: ATRA) y se incubaron las células a 37°C en 5% CO₂ hasta el día 7, cuando se cambió el medio por medio fresco (DMEM con 5% FBS y 30 µM ATRA).

3.2.6 Fijación con paraformaldehído

Para la correcta preservación de las células hasta la posterior visualización en el microscopio, bien directamente sobre el plástico, a baja magnificación, o sobre los cubreobjetos, a mayor magnificación, se empleó la fijación con paraformaldehído (PFA). Para ello, en primer lugar, se retiró lentamente el medio con pipeta y se hizo un lavado con DPBS 1X, prestando especial atención a no arrastrar ni dañar las células. Se añadieron 500 µl de PFA al 4% en PBS (ChemCruz) por pocillo (placa 24) y se dejó actuar durante 15 minutos, tras los cuales se retiró el PFA, se lavó con DPBS 1X tres veces, y se guardaron las placas con DPBS 1X en la nevera a 4°C hasta su utilización.

3.3 Transfecciones

Para sobreexpresar las proteínas de interés en los diferentes tipos celulares se transfecaron distintas líneas celulares con los plásmidos descritos en el apartado 3.1. Todos los reactivos empleados se basan en lípidos o polímeros catiónicos a excepción del GeneJuice cuyo componente activo es proteico. Las transfecciones se llevaron a cabo en placas multipocillo. En el caso de las células HeLa se sembraron las células a una densidad de $0,3\text{--}0,4 \cdot 10^5$ células/cm² y se incubaron durante 24h antes de la transfección. Tanto las HEK293 como las SH-SY5Y se sembraron a una densidad de $0,5 \cdot 10^5$ células/cm² y, al igual que con las HeLa, se incubaron durante un día antes de ser transfecadas. Se emplearon reactivos comerciales para las transfecciones siguiendo los pasos del protocolo de cada casa comercial. ratios y cantidades de DNA empleados para los diferentes reactivos de transfección se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9. Resumen de los reactivos, ratios (DNA(µg):reactivo(µl)) y cantidades de DNA (µg) empleadas para las transfecciones simples.

Reactivo	Ratio (DNA:reactivo)	Cantidad DNA	Células transfectadas
Gene Juice ® (Novagen)	(1:3) (1:4) (1:6)	0,25 y 0,5 µg	HeLa, HEK293, SH-SY5Y
ViaFect™ (Promega)	(1:3) (1:4) (1:6)	0,5 µg	HeLa, HEK293, SH-SY5Y
PEI	(1:3) (1:4) (1:5)	1 µg	HeLa
TransIT-X2® (Mirus)	(1:3)	0,5 µg	SH-SY5Y
TransIT-X2020® (Mirus)	(1:3)	0,5 µg	SH-SY5Y
Lipofectamina 2000™ (Invitrogen)	(1:3)	0,8 µg	SH-SY5Y
Lipofectamina 3000™ (Invitrogen)	(1:1,5) (1:3)	0,5 µg	SH-SY5Y

Además de las transfecciones simples, se realizaron cotransfecciones con 4 combinaciones distintas de los plásmidos disponibles de aSyn y tau para estudiar las distintas formas de ambas proteínas, juntas y por separado, dentro de las células. Las combinaciones de plásmidos que se cotransfectaron se muestran a continuación:

- pJAC318 + pJAC321 → EGFP-Tau + mRPF-aSyn
- pJAC318 + pJAC322 → EGFP-Tau + mRPF-aSyn(N103)
- pJAC323 + pJAC321 → EGFP-Tau(N368) + mRPF-aSyn
- pJAC323 + pJAC322 → EGFP-Tau(N368) + mRPF-aSyn(N103)

En primer lugar se cotransfectaron las células HeLa usando Gene Juice® (Novagen) como reactivo de transfección con una cantidad total de DNA de 0,5 µg y empleando un ratio DNA(µg):reactivo(µl) 1:3, las cotransfecciones fueron observadas al microscopio a las 24 y 48h. En segundo lugar, se utilizaron las mismas combinaciones de plásmidos para cotransfectar SH-SY5Y. Para ello se usó Lipofectamina 3000™ (Invitrogen) empleando una cantidad total de 0,5 µg de DNA y un ratio (1:1,5). Las células SH-SY5Y se transfecaron y cotransfектaron además a tiempos distintos de diferenciación realizándose transfecciones a día cero, a día 3 y a día 7 de diferenciación. Las cotransfecciones se observaron al microscopio a las 24 y 48h.

3.4 Tratamientos

3.4.1 Tratamientos para la inducción de estrés oxidativo

Con el fin de promover la agregación de aSyn y la posible interacción de ésta con la proteína tau en condiciones de estrés, las células fueron tratadas con las moléculas que aparecen en la Tabla 10 para inducir el estrés oxidativo. Dado que las HeLa no expresan aSyn fueron transfectadas con pJAC321 y pJAC322 24h antes del tratamiento. Las soluciones con los compuestos fueron preparadas en medio completo DMEM a las concentraciones finales de trabajo que indica la Tabla 10. Una vez preparadas se retiró el medio de las células y se cambió por el medio recién preparado con el tratamiento correspondiente. Las células se incubaron a 37º en una atmósfera de 5% de CO₂ durante 24h y se estudiaron por microscopía. Las células SH-SY5Y fueron tratadas de la misma manera, pero se transfecaron con pJAC321, pJCAC318+pJAC321 y pJAC318+pJAC322.

Tabla 10. Compuestos empleados para inducir estrés oxidativo en las células.

Reactivos	Concentración trabajo	Disolvente
Citrato amónico férrico (Fe ³⁺)	10 mM	MiliQ
CuSo ₄	10 µM	MiliQ
AsNaO ₂	4 µM	MiliQ
Rotenona	5 µM, 2,5 µM	DMSO

3.4.2 Tratamiento de células con aSyn exógena.

Para el estudio de la captación de diferentes especies de aSyn y su comportamiento una vez internalizadas en la célula se utilizaron células SH-SY5Y diferenciadas y sin diferenciar y transfectadas con pJAC318, pJAC321 y pJAC323. Las células fueron expuestas a monómero, oligómero y a fibrillas de aSyn a una concentración final por pocillo de 0,25 μ M, 0,75 μ M y 1,5 μ M para cada uno. Una vez añadida la aSyn exógena se dejaron incubar durante un periodo de 3h. A continuación, se retiró el medio con la aSyn exógena restante que no había sido internalizada para eliminar la señal de fondo, se lavó una vez con DMEM y se volvió a añadir medio a los pocillos, con 10% FBS en las células sin diferenciar y con 5% FBS 30 μ M ATRA en las células diferenciadas. Una vez lavados los pocillos se programó un experimento de microscopía *in vivo* tomando fotos al microscopio cada 10 minutos, para observar el comportamiento de las células y los cambios las 12 horas posteriores a la captación de los monómeros, oligómeros o fibrillas.

La visualización de la aSyn exógena internalizada fue posible ya que estas especies están marcadas con sondas fluorescentes. En estos experimentos se usó aSyn marcada con AlexaFluor488 ($\lambda_{\text{absorción}} = 488\text{nm}$, $\lambda_{\text{emisión}} = 525\text{nm}$) o con Atto 647 ($\lambda_{\text{absorción}} = 647\text{nm}$, $\lambda_{\text{emisión}} = 665\text{nm}$).

3.5 Western blot

La técnica de Western blot se empleó para el estudio de las proteínas de fusión sobreexpresadas tras la transfección con los plásmidos correspondientes.

3.5.1 Extracción de proteínas

Para poder analizar por Western blot las proteínas sobreexpresadas en los cultivos celulares se despegaron las células del sustrato mediante tripsinización, se inactivó la tripsina con medio completo y se centrifugaron 1 minuto a 500 g. El pellet se lavó dos veces con DPBS 1X y tras el segundo lavado se resuspendió en 50 μ l de tampón de lisis RIPA (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH=8, 1% Tritón X-100, 0,5% deoxicícolato sódico, 0,1% SDS) junto con inhibidor de proteasas y se incubó 30 minutos en hielo. Despues se centrifugaron las muestras (18.000 g, 30 minutos, 4°C). Se recogió sobrenadante (50 μ l) y se añadieron 50 μ l de tampón de carga SDS-PAGE 2X (0,125 M Tris pH 6.8, 4% SDS, 20% glicerol, 0,04 mg/mL azul de bromofenol, 75 mg/mL DTT). Las muestras se hirvieron a 100°C durante 5 minutos tras lo cual se cargaron directamente en el gel de electroforesis o se almacenaron a -80°C.

3.5.2 Electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE)

Para la electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE) se emplearon geles de 10 y 12% de poliacrilamida, todos ellos con una parte superior de gel concentrador al 4% de poliacrilamida. La composición de los geles puede consultarse en la Tabla A3 del anexo.

Las electroforesis se realizaron en tampón de electroforesis desnaturalizante (0,38 M Glicina, 25 mM Tris-Base, 1 g/L SDS) a 120V durante 75-100 minutos y como marcador de peso molecular se empleó PageRuler™ Prestained Protein Ladder 10-180 kDa (Thermo Scientific).

3.5.3 Transferencia

Tras la electroforesis se procedió a la electrotransferencia húmeda de las proteínas a la membrana. Se utilizaron membranas de PVDF (Inmobilon-P, Merck) activadas previamente con metanol y lavadas con tampón de transferencia (0,38M glicina, 25mM Tris-Base, 20% metanol) antes de montar el *sandwich* en el transblot. Las transferencias se realizaron en cámara fría a 4°C, a amperaje constante (200 mA) durante 90 minutos. A continuación, las membranas se bloquearon durante 30 minutos en agitación con 10 mL de leche desnatada en polvo en 1% en TBST 1X (20 mM Tris-Base, 150 mM NaCl, 0,1% Tween-20, pH 7,6).

3.5.4 Incubación anticuerpos y revelado

Los anticuerpos primarios se dejaron incubando toda la noche a 4°C en agitación. Los anticuerpos empleados se recogen en la Tabla 11. Después de retirar el anticuerpo primario se hicieron tres lavados de 5 minutos cada uno con TBST 1X y se incubó el anticuerpo secundario una hora a temperatura ambiente con agitación. Tras la incubación del anticuerpo secundario se realizaron tres lavados de 5 minutos con TBST 1X. La membrana se reveló con el reactivo de quimioluminiscencia SuperSignal™ West Pico Plus (Thermo Scientific) y se visualizó en el ChemiDoc (Bio-Rad).

3.5.5 Electroforesis “nativa” en gel de poliacrilamida.

Además del Western blot en condiciones desnaturalizantes, se realizó una electroforesis nativa con muestras de células transfectadas y cotransfectadas y la posterior transferencia a membrana. El gel nativo permite estudiar las proteínas sin desnaturalizar y sus posibles interacciones. Para esto, se siguieron los pasos descritos en los apartados 3.5.1 - 3.5.4 pero tanto los geles como los tampones de lisis y de electroforesis (RIPA, tampón de carga y tampón de electroforesis) se hicieron sin SDS ni DTT y con un pH 8,8, por encima del punto isoeléctrico de la proteína para que ésta tuviera carga negativa y migrara hacia el ánodo. Tampoco se utilizó gel concentrador. Además, una vez realizada la electroforesis y antes de la transferencia, se visualizaron las proteínas mediante fluorescencia (Chemidoc, Bio-Rad) con los filtros Alexa 546 y Alexa 488. ya que nuestras proteínas van fusionadas a las proteínas EGFP y mRFP, que en este caso no se desnaturalizan.

Tabla 11. Listado de anticuerpos primarios empleados para la detección de proteínas en el Western blot.

Anticuerpos primarios	Compañía	Referencia	Hospedador	Dilución
aSynuclein 211	Santa Cruz	sc-12767	Ratón	1:1000
Tau	Abcam	ab76128	Conejo	1:5000
A/B synuclein	Synaptic Systems	128 003	Conejo	1:1000
aSyn 3H2897	Santa Cruz	sc-69977	Ratón	1:1000
Anti-Myc	Proteintech	16286-1-AP	Ratón	1:5000
Anti-GAPDH	Proteintech	60004-1-Ig	Ratón	1:50000

3.6 Microscopía

A excepción de para el control, conteo y mantenimiento rutinario de los cultivos celulares, para lo cual se usó el microscopio invertido AE20 (Motic), la visualización de las células después de las transfecciones y diferentes tratamientos se realizó con el microscopio Leica DMI6000. Este microscopio ofrece la posibilidad de tomar imágenes durante un periodo largo de tiempo ya que permite mantener las células en una cámara a la temperatura y atmósfera adecuadas, en este caso 37°C, 5% de CO₂. Para la adquisición de imágenes se emplearon tanto el campo claro como los filtros de fluorescencia y adicionalmente el Optigrid para mayor resolución. Los experimentos *in vivo* se realizaron por medio de la función de timelapse, que permite programar la adquisición de imágenes en determinados puntos temporales a diferentes longitudes de onda en distintas posiciones de la platina y en diferentes planos z. El software empleado para la toma y procesamiento de las imágenes fue el MetaMorph® Microscopy Automation and Image Analysis Software. Además, para la visualización y procesamiento fuera del microscopio se empleó también el software Fiji (Image J).

Tabla 12. Filtros empleados para la microscopía de fluorescencia.

Filtro	Excitación	Dicroico	Emisión
GFP	BP 470/40	500	BP 525/50
Tx2	BP 560/40	595	BP 645/75
Y5	BP 620/60	660	BP 700/75

4. RESULTADOS

4.1 Plásmidos y sobreexpresión de proteínas

4.1.1 Construcción de los plásmidos.

En el presente trabajo se emplearon 4 plásmidos para sobreexpresar aSyn y tau en las células. Estos plásmidos se construyeron de tal manera que tau se expresara como proteína de fusión a EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) y aSyn como proteína de fusión a mRFP (monomeric Red Fluorescent Protein). A excepción de pJAC318 (prK5-EGFP-Tau(4R/0N)) que fue adquirido de Addgene, los tres restantes fueron diseñados y construidos en el laboratorio de manera que se obtuvieron los constructos detallados a continuación. Una vez generados se comprobó la eficiencia de transfección de las células con los mismos y la correcta expresión de las proteínas que codifican para poder llevar a cabo posteriores experimentos.

El plásmido pJAC318 (prK5-EGFP-Tau(4R/0N)) es un plásmido que expresa la proteína tau, como proteína de fusión con EGFP, y la proteína β -lactamasa, que confiere a las bacterias resistencia frente a ampicilina lo cual sirve para amplificar el plásmido pudiendo seleccionar las bacterias que lo han incorporado ya que son resistentes a dicho antibiótico. La isoforma de tau que codifica este plásmido es la 4R/0N (383 aminoácidos), es decir, aquella que consta de las 4 repeticiones R1-R4 de unión a microtúbulos y carece de los exones E2 y E3, que pueden ser eliminados por *splicing* alternativo (68).

El plásmido pJAC321 (pCMV-Myc-mRFP-aSyn) permite expresar en eucariotas una proteína de fusión Myc-mRFP-aSyn. De esta forma es posible sobreexpresar simultáneamente aSyn y tau cotransfectando con ambos vectores y pudiendo visualizarlas a longitudes de onda distintas en el microscopio. Además, el epítopo Myc permite detectar la proteína con anticuerpos anti-Myc. Este plásmido tiene también el gen de la β -lactamasa confiriendo resistencia a ampicilina.

En el caso de pJAC322 (pCMV-Myc-mRFP-aSyn(N103)), el objetivo fue expresar la aSyn delecionada a partir de la asparagina 103 (N103). La razón de dicho objetivo era simular las condiciones fisiológicas de la PD ya que se ha demostrado que la asparagina endopeptidasa (AEP) corta la aSyn en esta posición escindiendo el extremo C terminal, provocando su agregación y aumentando la neurotoxicidad (65). Al igual que pJAC321 codifica el epítopo Myc y resistencia a ampicilina.

Finalmente, pJAC323 es similar a pJAC318 (pRK5-EGFP-Tau(4R/0N)), pero la proteína de fusión acaba en la asparagina 310 (N310), es decir, carece de parte del extremo carboxilo-terminal. Al igual que sucede con la aSyn se ha observado que la AEP corta tau en condiciones fisiológicas, concretamente por la asparagina 368 (N368) en la isoforma 4R/2N (441 aminoácidos) (66). La isoforma de tau usada en este trabajo termina en la posición N310, al carecer de los exones 2 y 3 (isoforma 4R/0N), siendo esta la posición correspondiente a la N368 en la isoforma 4R/2N. No obstante, se mantiene la terminología N368 tomada como referencia (66,67).

Los mapas completos de los plásmidos resultantes pueden consultarse en el Anexo 2.

Algunos de los controles realizados tras la amplificación de los fragmentos por PCR así como tras las digestiones se muestran a continuación. En la Figura 3 se muestra el control de digestión de pJAC295 (vector construido anteriormente en el laboratorio que expresa la proteína de fusión Myc-mRFP-TM BclXL - dominio transmembrana de Bcl-XL-) y el control de amplificación de aSyn (wt), que se clonó en pJAC295 una vez digeridos ambos. La digestión de pJAC295 con HindIII y NotI proporciona dos bandas en el carril 3, una de 128 pb equivalente al fragmento de TM-BclXL, y una de 4441pb, que corresponde a pJAC295 digerido, el cual se extrajo del gel (Figura 1B) para, tras ser purificado, emplearse en la clonación tanto de pJAC321 como de pJAC322. En el carril 5 se observa la banda de la muestra del fragmento de aSyn (430pb) amplificado por PCR y digerido con las mismas ER. En la Figura 4 se expone el mismo control para pJAC318 digerido con Sall y BamHI, proporcionando una banda de 1155 pb equivalente a tau(4R/0N) escindido del plásmido, y una banda de 5364 pb que corresponde al pJAC318 sin tau (carril 7). Además, se muestran los controles, sin digerir, de los

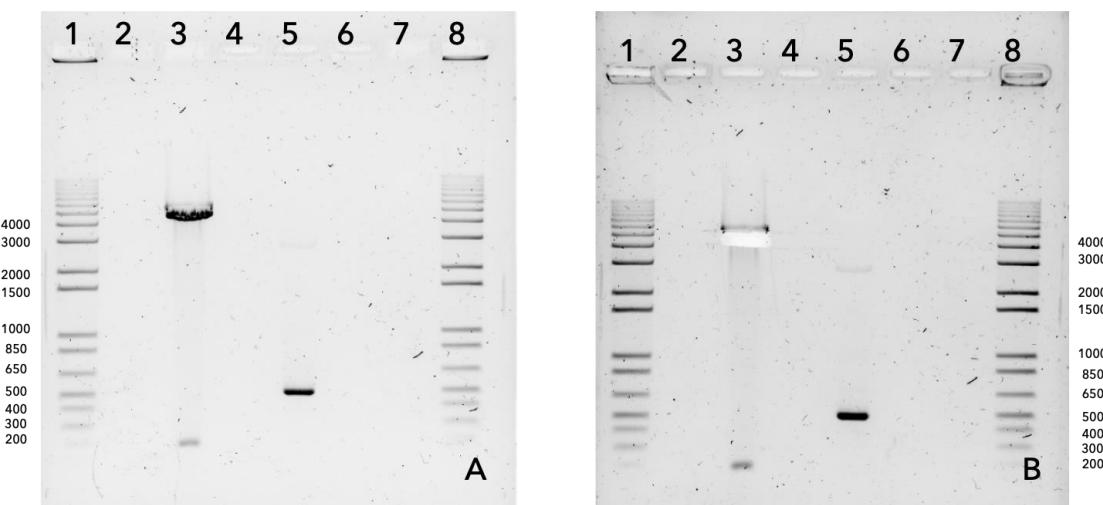


Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa (1,2%). El gel A muestra la digestión de pJAC295 con HindIII y NotI (carril 3) y el producto de amplificación por PCR de aSyn (carril 5). El gel B es el resultado del A tras cortar la banda correspondiente a pJAC295 digerido.

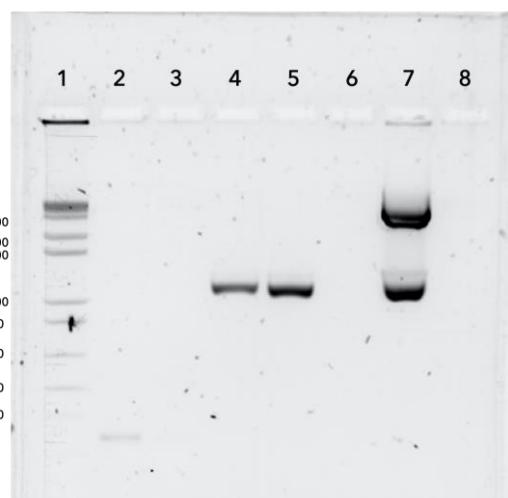
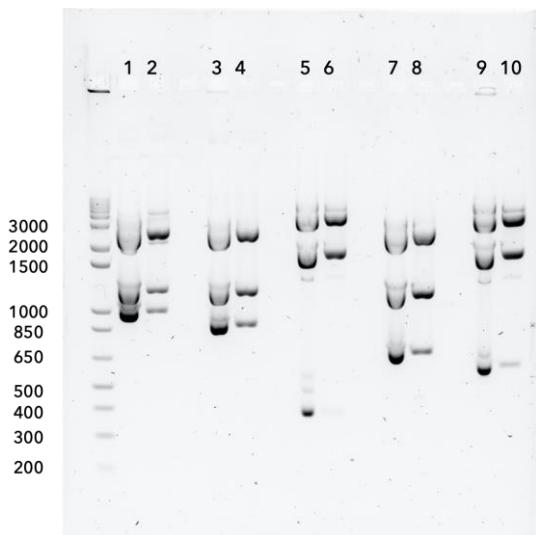


Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa (1,2%). 10 y 15 μ l de aSyn(N103) producto de PCR (carriles 2 y 3). 10 y 15 μ l de tau(N368) producto de PCR (carriles 4 y 5). pJAC318 digerido con BamHI y Sall.

productos de PCR aSyn(N103) y tau(N368). Los carriles 2 y 3 corresponden a aSyn(N103) -342 pb-, 10 y 15 µl respectivamente, mientras que los carriles 4 y 5 corresponden a 10 y 15 µl de producto de PCR de tau(N368) -1152 pb-. Una vez construidos, amplificados y purificados los plásmidos se realizó un control final por enzimas de restricción. pJAC321, pJAC322 y pJAC295 se digirieron con PstI y pJAC323 y pJAC318 con PstI y NdeI. Tras la digestión se cargaron 5 y 15 µl para poder visualizar tanto las bandas de fragmentos grandes como las de los más pequeños. El gel de dicha comprobación, así como los fragmentos resultantes de la digestión se muestra en la Figura 5.



- pJAC321 digerido con PstI: 994, 1212, 2665 pb.
 - pJAC322 digerido con PstI: 883, 1212, 2665 pb.
 - pJAC323 digerido con PstI + NdeI: 387, 1942, 3972 pb.
- Controles:
- pJAC295 digerido con PstI: 668, 1212, 2665 pb.
 - pRK5-EGFP-Tau digerido con PstI + NdeI: 606, 1942, 3972 pb.

Figura 5. Comprobación de los plásmidos mediante digestión con enzimas de restricción. 1-pJAC321 (15 µl), 2-pJAC321 (5 µl), 3-pJAC322 (15 µl), 4-pJAC322 (5 µl), 5-pJAC323 (15 µl), 6-pJAC323 (5 µl), 7-pJAC295 (15 µl), 8-pJAC295 (5 µl), 9-pRK5-EGFP-Tau (15 µl), 10-pRK5-EGFP-Tau (5 µl).

4.1.2 Comprobación de la eficiencia de transfección de células con los vectores.

Para comprobar la funcionalidad de los plásmidos se transfecionaron primero las líneas celulares HeLa y HEK293, dada la mayor eficiencia de transfección frente a las SH-SY5Y. Una vez transfecionadas las células se observaron al microscopio para detectar las proteínas fluorescentes, así como para estudiar su localización y se realizaron fotografías, tras lo cual se tomaron muestras para realizar un Western blot que permitiera confirmar la presencia de la proteína sobreexpresada.

Para comprobar que los vectores construidos expresaban las proteínas correctas se transfecionaron en primer lugar células HeLa y HEK293 con pJAC318 y pJAC321 y determinar así la eficiencia de transfección con los reactivos Gene Juice (GJ) y ViaFect (VF) a distintos ratios DNA:reactivo. Para ello se tomaron imágenes tanto de fluorescencia como de campo claro de cada pocillo y se analizaron posteriormente con el programa Fiji (Image J). La Figura 6 muestra algunas de estas imágenes representativas donde utilizando la superposición del campo claro (BF) y la imagen de fluorescencia se pueden apreciar las diferencias en la eficiencia de transfección según el tipo celular, el plásmido, y el reactivo de transfección empleado.

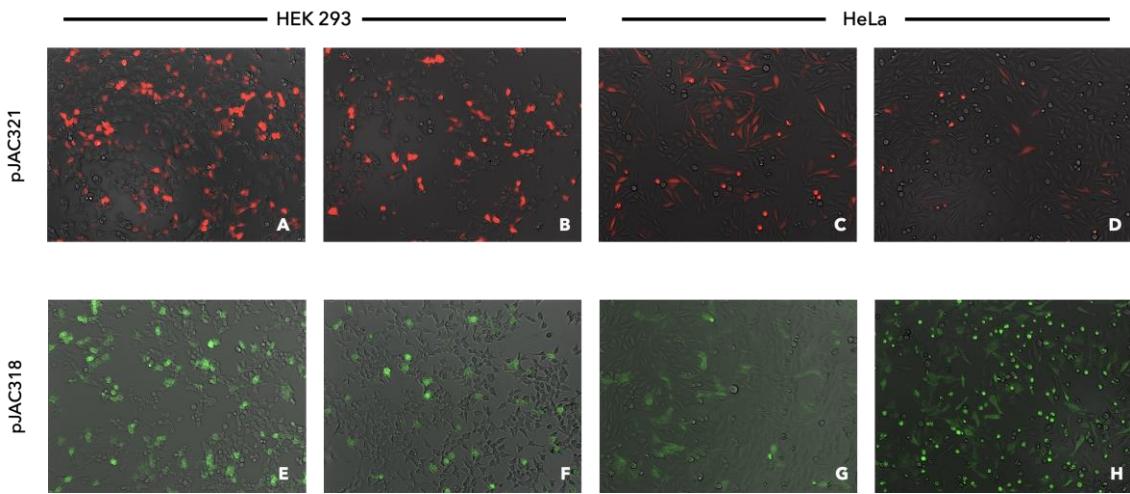


Figura 6. Superposición de imágenes adquiridas mediante microscopía de fluorescencia junto con campo claro Células transfectadas con GeneJuice (GJ) o ViaFect (VF). HEK293 GJ 0,25 µg pJAC321 ratio 1:4. (A), HEK293 GJ 0,25 µg pJAC321 ratio 1:3(B), HeLa GJ 0,25 µg pJAC321 ratio 1:3(C), HeLa GJ 0,8 µg pJAC321 ratio 1:3(D), HEK293 GJ 0,5 µg pJAC318 ratio 1:4(E), HEK293 VF 0,5 µg pJAC318 ratio 1:3(F), HeLa GJ 0,5 µg pJAC318 ratio 1:3 (G), HeLa VF 0,5 µg pJAC318 ratio 1:6 (H).

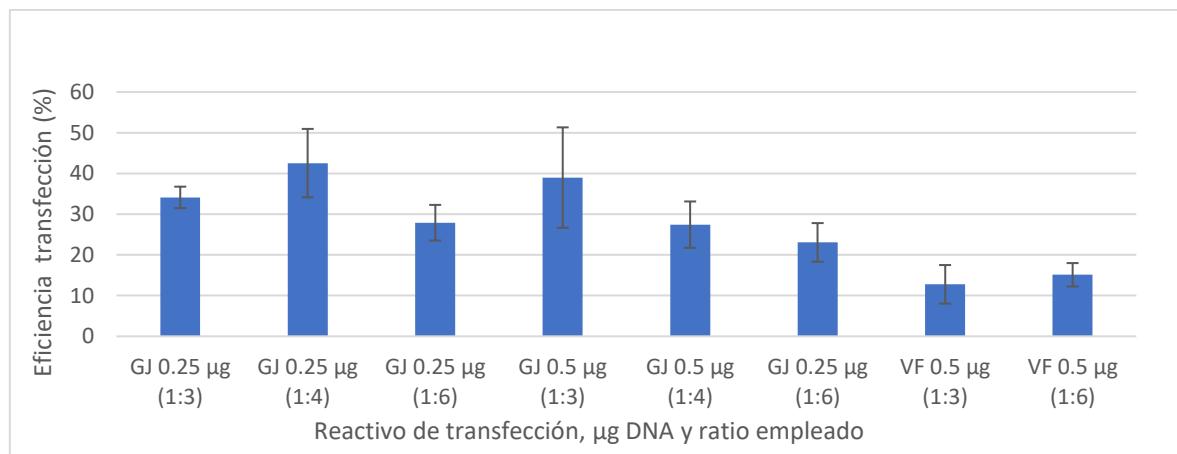


Figura 7. Eficiencia de transfección de pJAC318 con diferentes reactivos de células HEK293

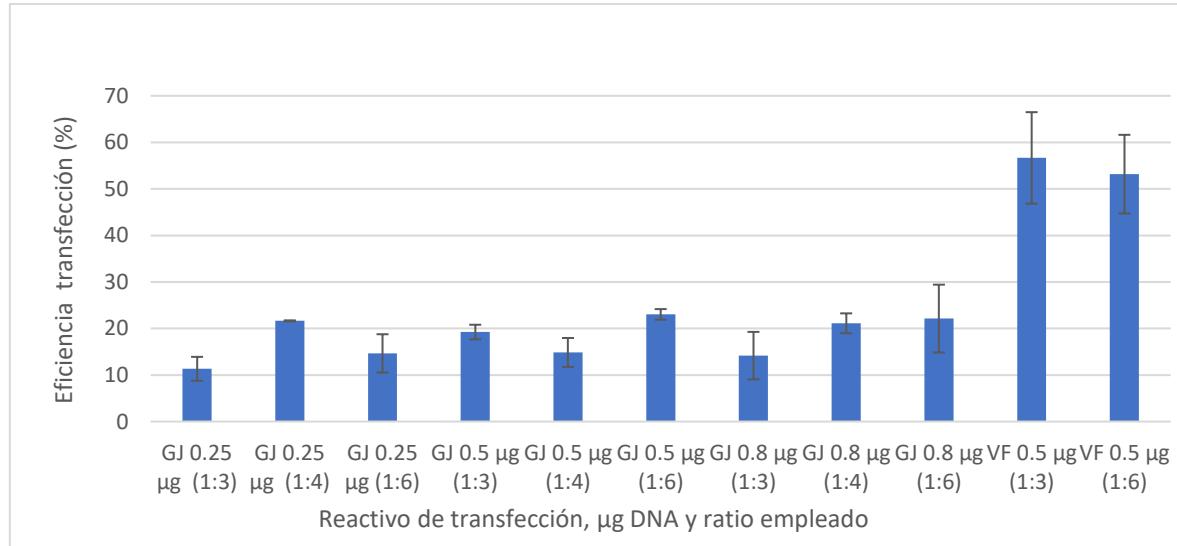


Figura 8. Eficiencia de transfección de pJAC318 con diferentes reactivos de células HeLa.

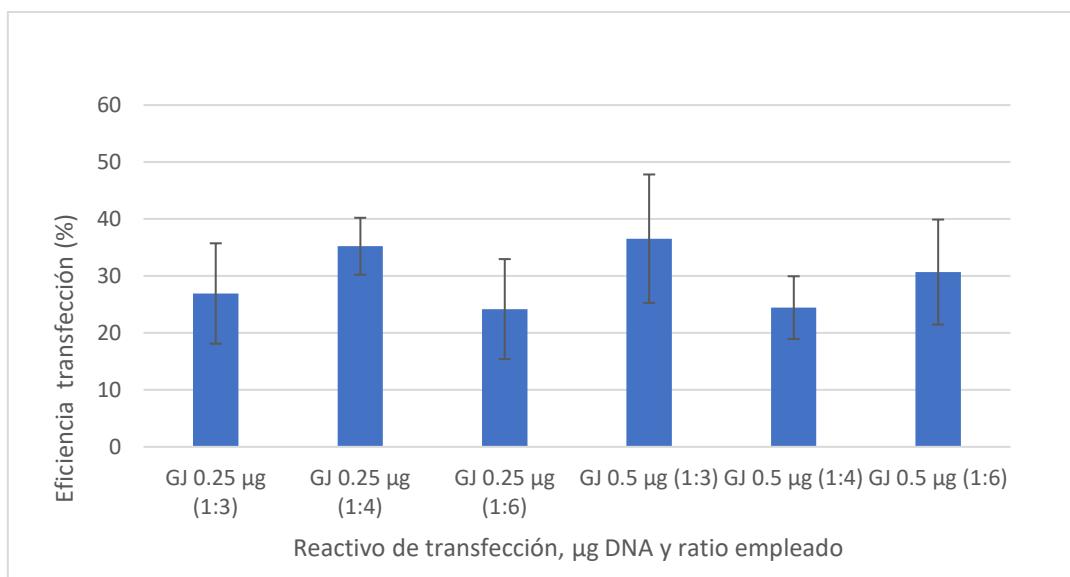


Figura 9. Eficiencia de transfección de pJAC321 con diferentes reactivos en células HEK293.

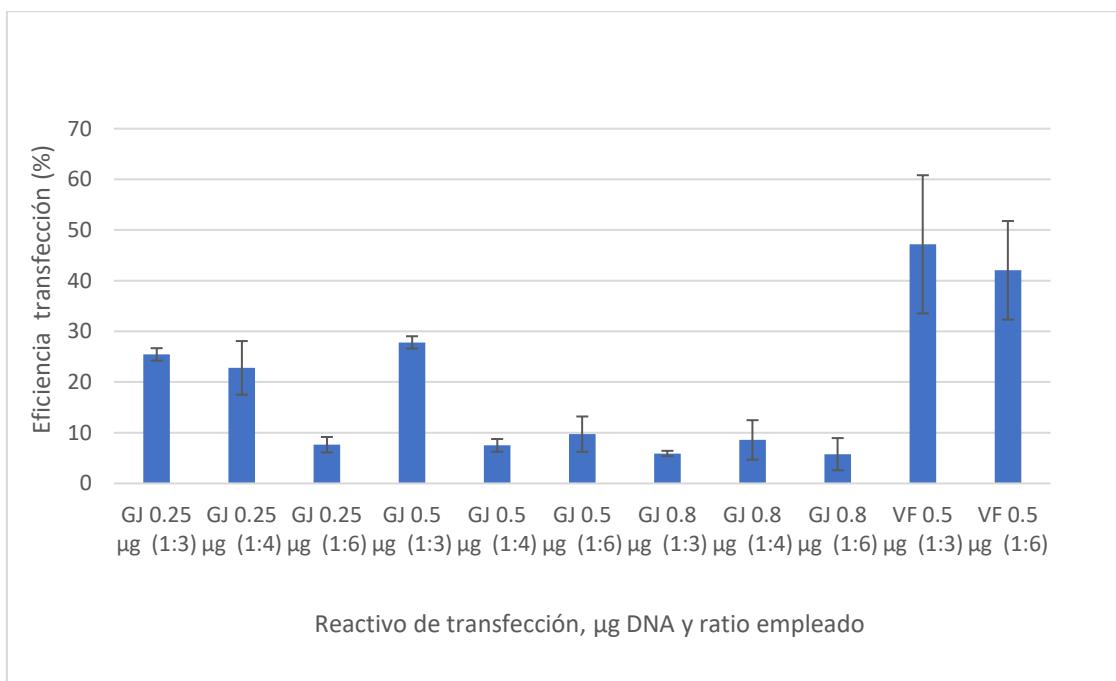


Figura 10. Eficiencia de transfección de pJAC321 con diferentes reactivos en células HeLa.

4.1.3 Análisis mediante microscopía del efecto de la sobreexpresión de las proteínas en células.

Para el estudio de las proteínas sobreexpresadas en las células se emplearon las células HeLa, dada su buena capacidad de mantener la morfología durante el procesamiento para microscopía, resultando más adecuadas para esto que las células HEK293. No obstante, las transfecciones en células HEK293 también se comprobaron mediante microscopía de fluorescencia. Los resultados del estudio por microscopía se muestran en la Figura 11, en la que se expone una imagen representativa para cada

plásmido a dos magnificaciones. A nivel de célula no se observan cambios entre los dos plásmidos de aSyn pJAC321 y pJAC322 (aSyn(wt) y aSyn(N103) respectivamente) ni en la expresión ni en la localización dentro de las células HeLa. En cambio, sí se aprecian diferencias entre pJAC318 (tau 4R/0N) y pJAC323 (tau 4R/0N N368) observándose que tau 4R/0N N368 pierde la capacidad de unión a microtúbulos y se distribuye por el citoplasma en lugar de observarse en forma de filamentos al unirse a los microtúbulos.

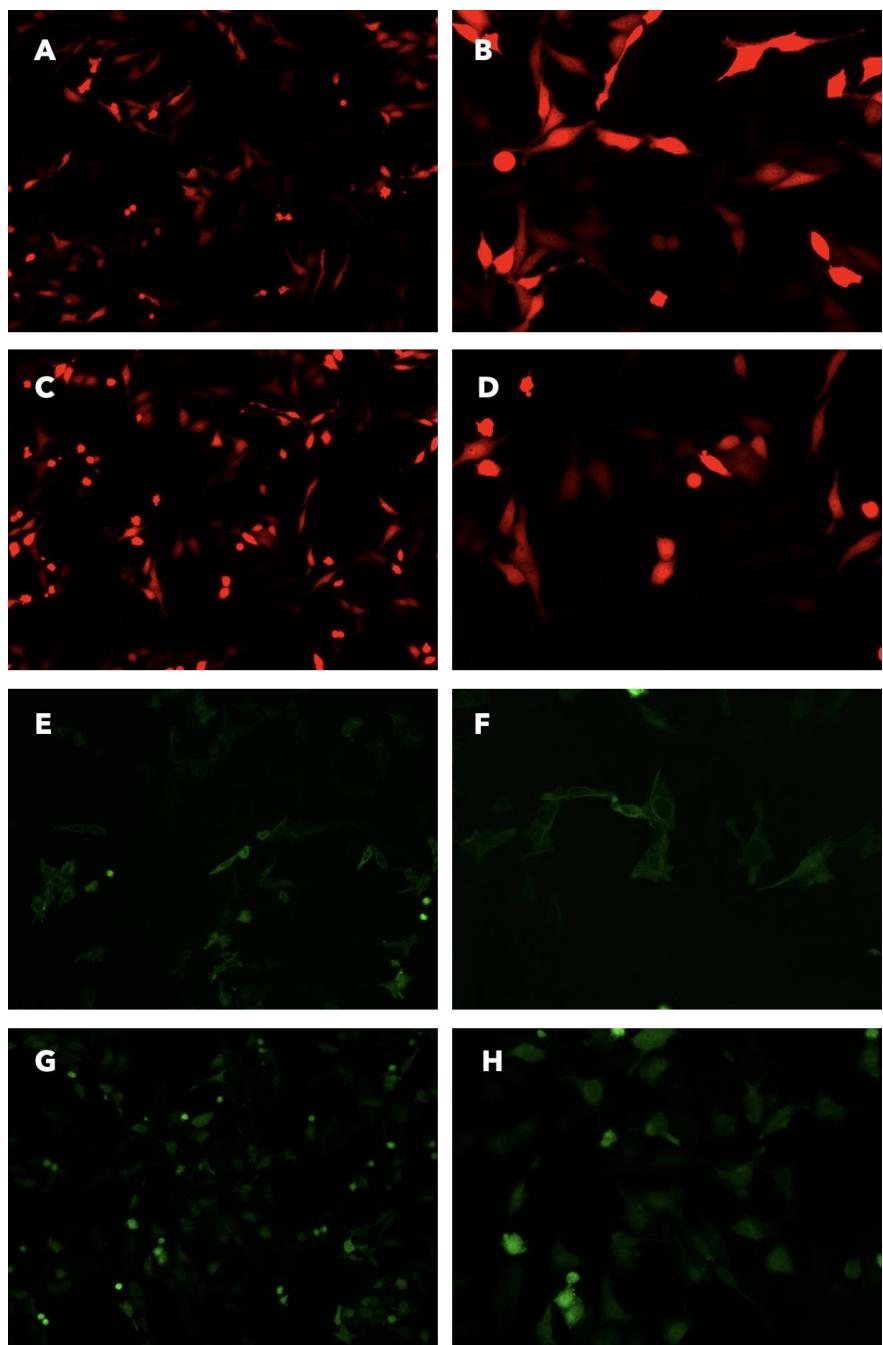


Figura 11. Sobreexpresión de los plásmidos de aSyn y Tau en células HeLa 24 h tras la transfección con el reactivo GeneJuice observadas al microscopio de fluorescencia a 10x (columna izquierda) y a 20x (columna derecha). pJAC321 (A y B), pJAC322 (C y D), pJAC318 (E y F), pJAC 323 (G y H).

En la Figura 12 puede apreciarse con más detalle la diferencia en la localización celular de EGFP-tau(4R/0N) y EGFP-tau (4R/0N)N368 en HeLa y en SH-SY5Y, individualmente y en sobreexpresión con aSyn.

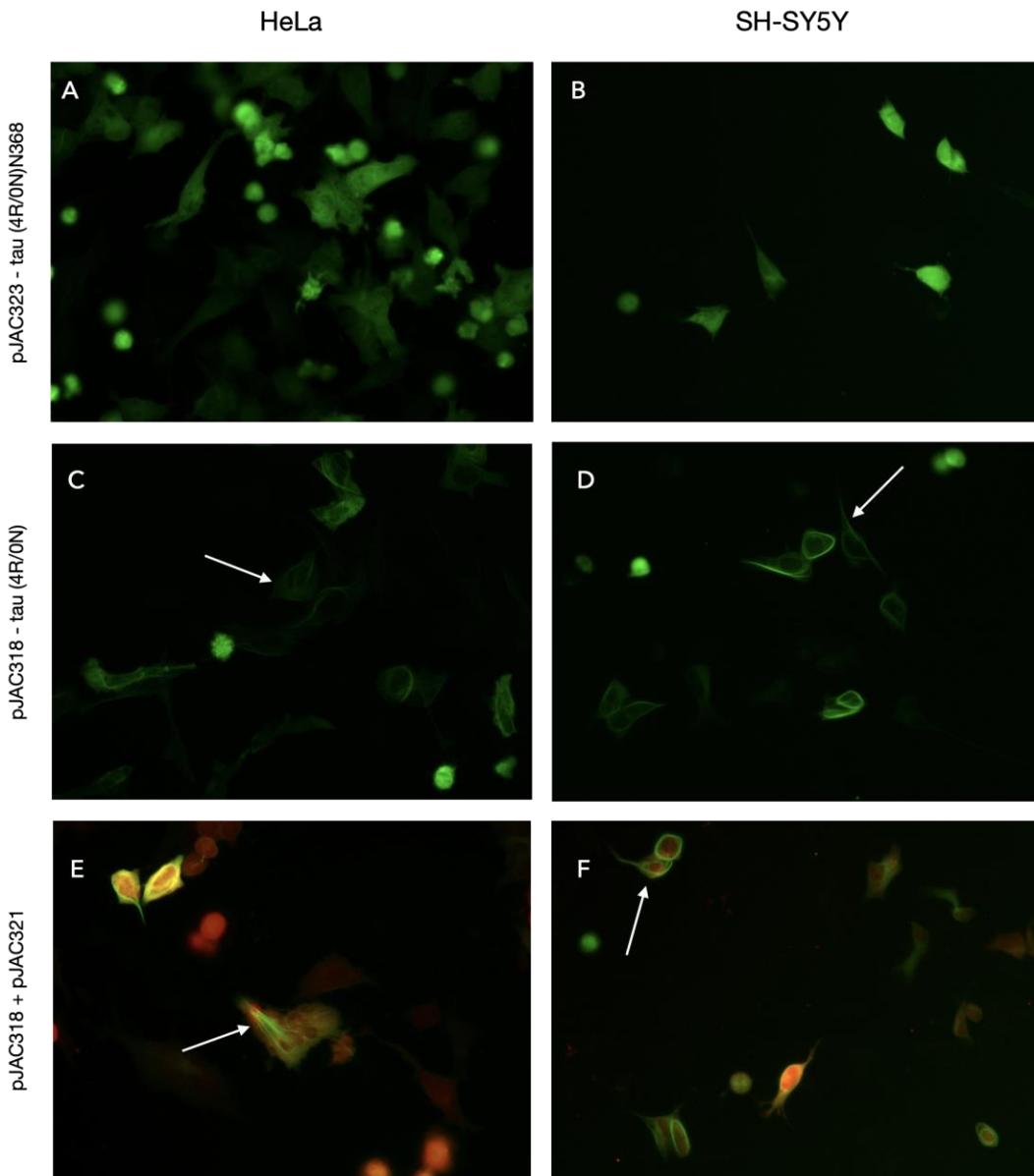


Figura 12. Comparativa de la localización celular de tau (4R/0N) y tau (4R/0N)N368 en HeLa y SH-SY5Y individualmente y en cotransfección con aSyn. Las flechas indican los microtúbulos de las células.

4.1.4 Análisis mediante Western blot de la sobreexpresión de las proteínas en células.

Tras el estudio por microscopía se llevó a cabo la extracción de proteínas de las células transfectadas para proceder al análisis por Western blot (WB). El objetivo de este experimento no fue cuantificar la expresión proteica sino emplearlo para comprobar que se expresan las proteínas correctas, en base a su tamaño y detección con anticuerpos específicos.

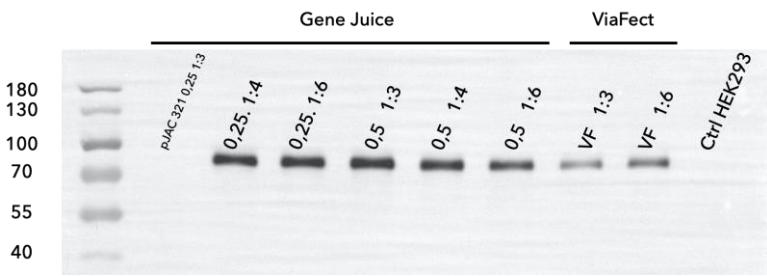


Figura 13. HEK293 transfectadas con pJAC318 -Membrana incubada con Anti-tau (1:5000)

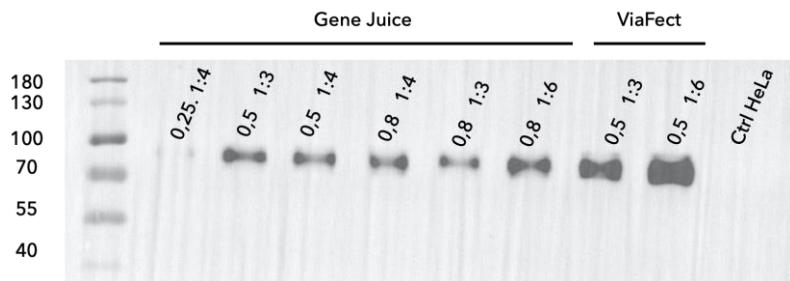


Figura 14. HeLa transfectadas con pJAC318 -Membrana incubada con Anti- tau (1:5000)

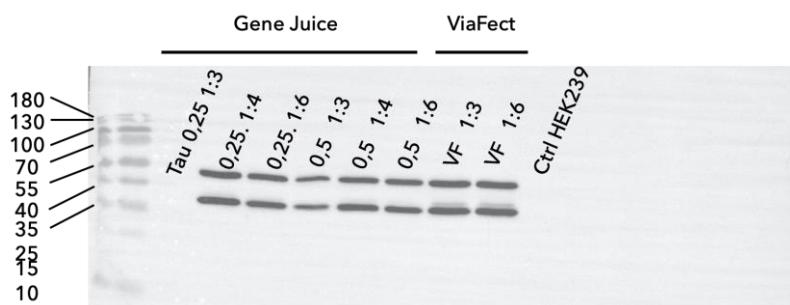


Figura 15. HEK293 transfectadas con pJAC321 – Membrana incubada con Anti-aSyn 211 (1:1000)

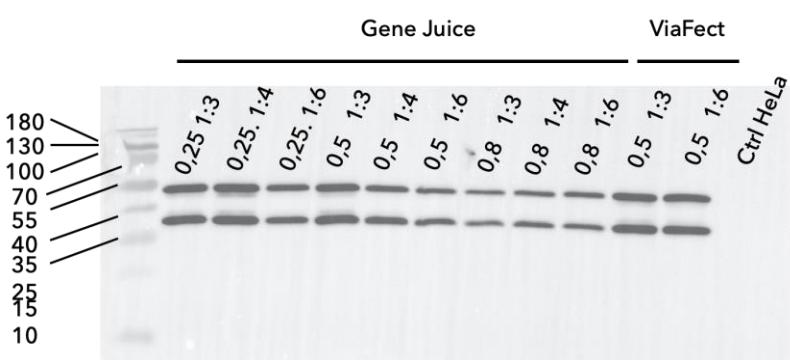


Figura 16. HeLa293 transfectadas con pJAC321 - Membrana incubada con Anti-aSyn 211 (1:1000)

Las Figuras 13 y 14 (HEK293 y HeLa transfectadas con pJAC318) muestran la detección de tau tras la incubación de la membrana con el anticuerpo Anti-tau (Abcam). La proteína de fusión EGFP-tau tiene una masa de 67,4 kDa que coincide con la migración de la proteína detectada mediante WB. En las figuras 15 y 16 se observa que el anticuerpo anti-aS 211 detecta dos bandas de la misma intensidad, una por encima de 40 kDa coincidiendo con los 42,7 kDa de la proteína de fusión mRFP-aSyn y otra entre 35 kDa y 40 kDa. Estas dos bandas se explicarían por una iniciación de la traducción en

un codón de iniciación interno o por proteólisis, como se comentará posteriormente en la discusión. Para analizar estas dos bandas se realizó un nuevo Western blot con 3 muestras de colonias distintas de HEK293 y 3 de HeLa transfectadas con pJAC321, y se incubaron las membranas con los anticuerpos anti-aS211 y con anti-Myc, los resultados se muestran en la Figura 17.

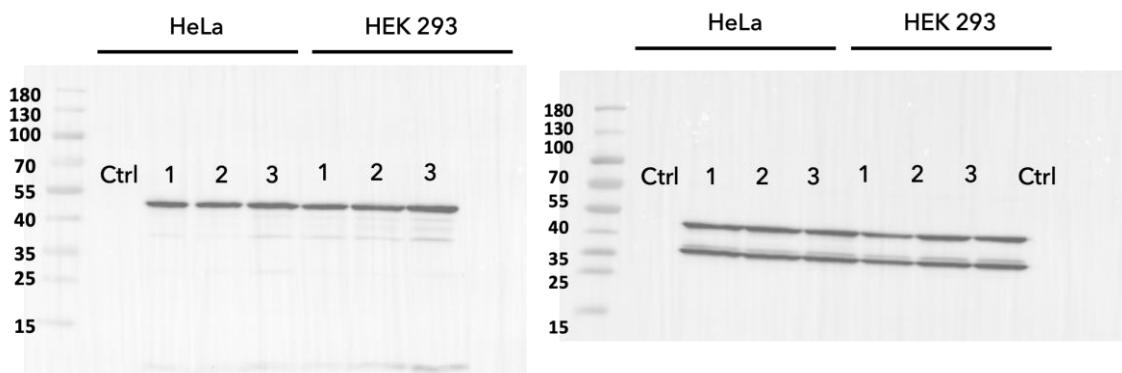


Figura 17. HeLa y HEK293 transfectadas con pJAC321- Membrana incubada con anti-myc (1:5000) (izquierda), membrana incubada con anti-aSyn 211 (1:1000).

4.2 Cotransfecciones y estudio de colocalización

Una vez verificados los plásmidos y con el fin de estudiar a la vez el comportamiento y localización de las diferentes proteínas en la célula se llevaron a cabo cotransfecciones. Éstas se pusieron a punto primero en células HeLa, y se escogió el reactivo GeneJuice dado que el ViaFect proporcionaba muy baja viabilidad. A continuación se hizo en SH-SY5Y. Para el caso de las HeLa se transfecaron con GeneJuice los cuatro plásmidos por separado y con las cuatro combinaciones que permiten expresar cada tipo de aSyn con cada tipo de tau. Para las células SH-SY5Y se hizo primero una prueba de transfección con diferentes reactivos. Una vez determinada la Lipofectamina 3000 como el reactivo más adecuado, se realizaron las cotransfecciones en SH-SY5H. Se escogió este reactivo ya que la Lipofectamina 2000 a pesar de mostrar mayor eficiencia mostraba muy baja viabilidad. Además, en las SH-SY5Y se hicieron cotransfecciones a diferentes tiempos de diferenciación para comprobar la capacidad de este tipo de células de ser transfecadas conforme avanzan su estado de diferenciación y estudiar los posibles cambios en el comportamiento de las proteínas.

4.2.1 Cotransfecciones y estudio de colocalización de aSyn y tau en HeLa

Se realizaron en primer lugar pruebas de cotransfección en células HeLa, para ello se transfecaron con GJ (0,25 µg DNA ratio 1:3) cada uno de los cuatro plásmidos por separado como control y se cotransfijaron también con GJ (0,5 µg DNA_{total} ratio 1:3) las siguientes combinaciones:

- pJAC318 + pJAC321 → EGFP-Tau + mRPF-aSyn
- pJAC318 + pJAC322 → EGFP-Tau + mRPF-aSyn(N103)
- pJAC323 + pJAC321 → EGFP-Tau(N368) + mRPF-aSyn
- pJAC323 + pJAC322 → EGFP-Tau(N368) + mRPF-aSyn(N103)

El resultado de las cotransfecciones se evaluó por microscopía a las 24 y 48h y a continuación, las muestras se analizaron por Western blot. La Figura 18 recoge algunas imágenes representativas a diferentes magnificaciones de cada una de las cotransfecciones en células HeLa a las 48h. Puede observarse que en las células cotransfectadas las proteínas se comportan de la misma manera que por separado (ver Figura 11) en cuanto a localización y agregación (en este caso no hay agregación). Del mismo modo, en las cotransfecciones puede apreciarse la diferencia entre la localización de tau(4R/0N) en los microtúbulos y tau(4R/0N)N368 dispersa por el citoplasma.

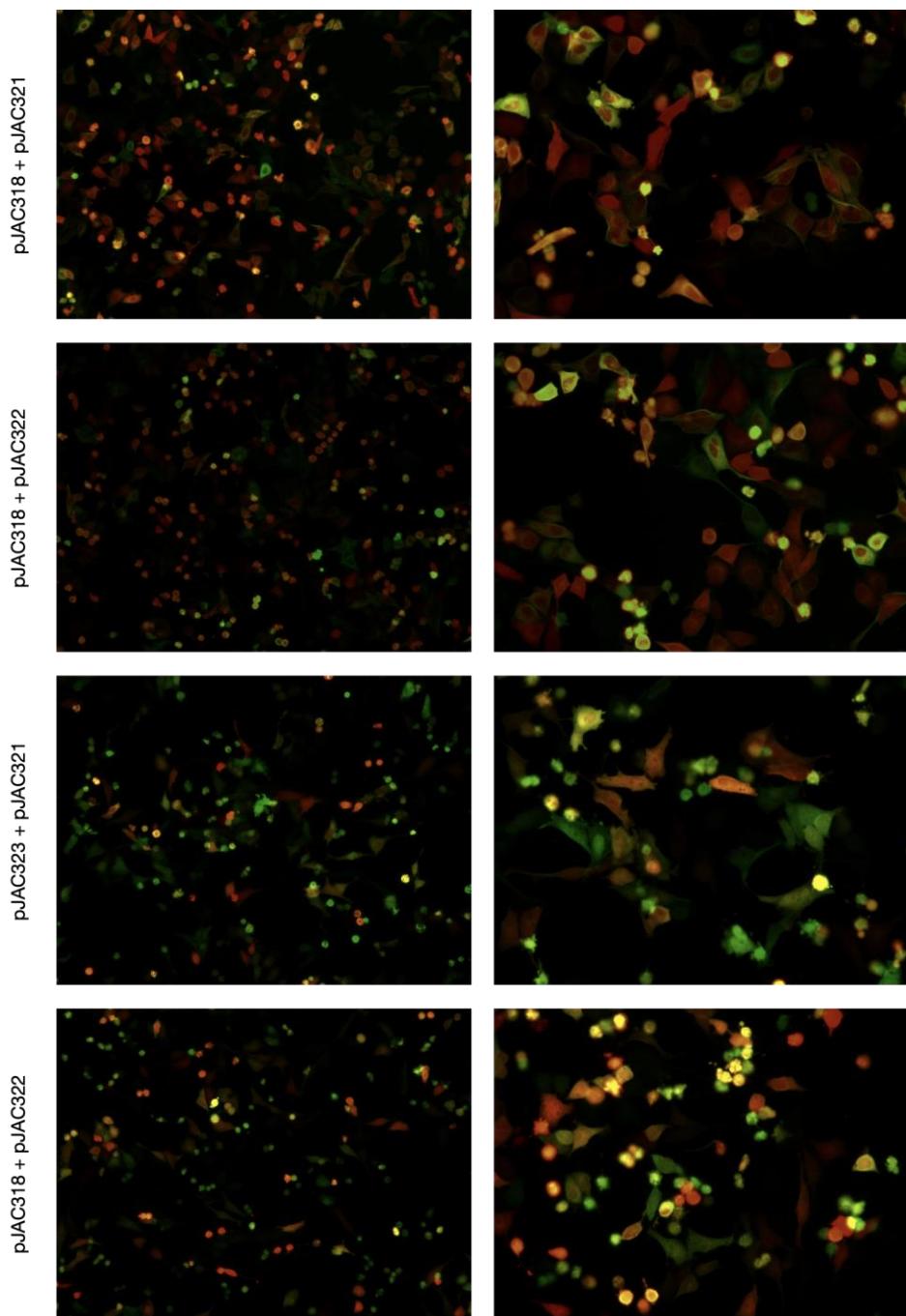


Figura 18. Resultados de cotransfecciones de las 4 combinaciones posibles de pJACs en células HeLa a 100 aumentos (izquierda) y a 200 aumentos (derecha).

Posteriormente se procedió al análisis por Western blot de las muestras de HeLa cotransfectadas para comprobar que se expresan las proteínas correctas, en base a su tamaño y detección con anticuerpos específicos. En la Figura 19 se aprecia la diferencia de movilidad entre tau(4R/0N) y tau(4R/0N)N368 migrando esta última más dado que su tamaño es menor. En el caso de la detección de las diferentes especies de aSyn, ni el anticuerpo anti-aSyn 211 (Figura 20) ni el anticuerpo anti-aSyn 3H289 (Figura 21) detectan la proteína codificada por pJAC322, que carece del extremo carboxilo-terminal (en el cual se localizan los epítopos que reconocen esos anticuerpos), por lo que se empleó un anticuerpo específico (anti- α / β -synuclein 128003, Synaptic Systems) para la región amino-terminal de aSyn, concretamente dirigido frente a los aminoácidos 1-25 de la proteína. Tanto en cotransfección como por separado las proteínas codificadas por pJAC321 y pJAC322 muestran dos bandas tras la inmunodetección. Para estudiar la naturaleza de dichas bandas se realizó un *stripping* de la membrana de la Figura 20 y se incubó posteriormente con anti-Myc, los resultados se muestran en la Figura 21.

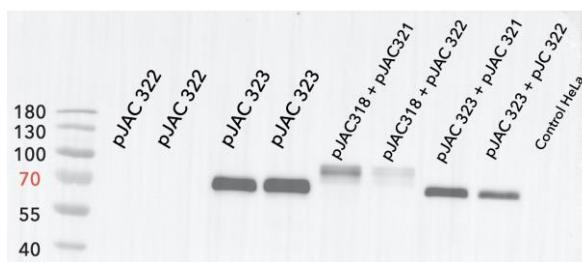


Figura 19. HeLa transfectadas con pJAC322 y pJAC323 por separado y cotransfectadas con las cuatro combinaciones de plásmidos (indicados en la parte superior de cada carril) - Membrana incubada con Anti-tau (1:5000). En el carril izquierdo se muestran los marcadores corridos en paralelo, indicando su masa en kDa..

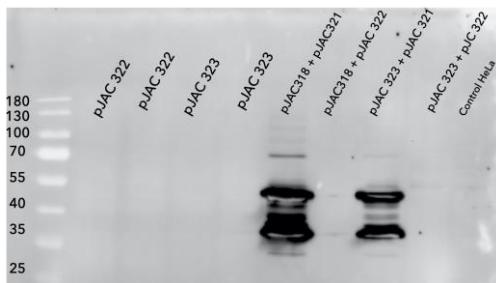


Figura 20. HeLa transfectadas con pJAC322 y pJAC323 por separado y cotransfectadas con las cuatro combinaciones de plásmidos (indicados en la parte superior de cada carril) - Membrana incubada con Anti-aSyn 211 (1:1000) En el carril izquierdo se muestran los marcadores corridos en paralelo, indicando su masa en kDa..

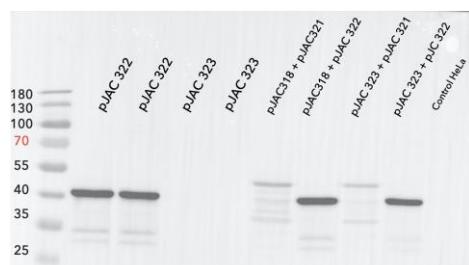


Figura 21. HeLa transfectadas con pJAC322 y pJAC323 por separado y cotransfectadas con las cuatro combinaciones de plásmidos (indicados en la parte superior de cada carril) - Membrana incubada con Anti-Myc (1:5000) posterior al stripping. En el carril izquierdo se muestran los marcadores corridos en paralelo, indicando su masa en kDa..

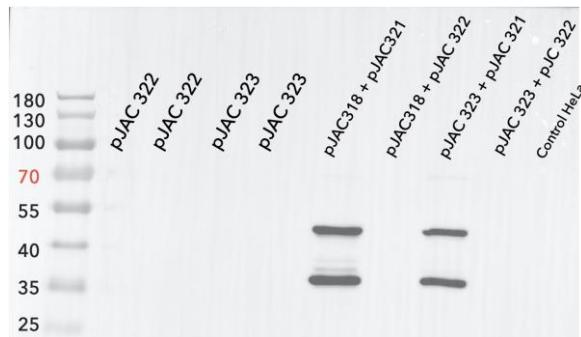


Figura 22. HeLa transfectadas con pJAC322 y pJAC323 por separado y cotransfектadas con las cuatro combinaciones de plásmidos (indicados en la parte superior de cada carril) - Membrana incubada con Anti-aSyn 3H289 (1:1000) En el carril izquierdo se muestran los marcadores corridos en paralelo, indicando su masa en kDa..

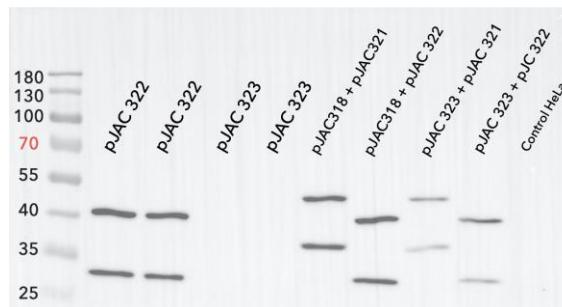


Figura 23. HeLa transfectadas con pJAC322 y pJAC323 por separado y cotransfектadas con las cuatro combinaciones de plásmidos (indicados en la parte superior de cada carril) - Membrana incubada con Anti- α/β synuclein 128003 (1:1000) En el carril izquierdo se muestran los marcadores corridos en paralelo, indicando su masa en kDa..

Ya que tanto pJAC321 como pJAC322 mostraron doble banda y de la misma intensidad en los geles desnaturalizantes, se llevó a cabo una electroforesis no desnaturalizante, en gel nativo, con el objetivo de obtener información sobre la naturaleza de dichas dos bandas. Dado que era no desnaturalizante y las proteínas se expresan como proteínas de fusión a EGFP y mRFP, previo a la transferencia, se visualizó el gel por fluorescencia. Tal y como muestra la Figura 25 en este caso las muestras transfectadas con pJAC321 y pJAC322, aSyn y aSyn(N103) respectivamente, mostraron ahora una única banda fluorescente. Tras la transferencia se realizó la inmunodetección con anti-tau y anti- α/β synuclein, los resultados se muestran en la Figura 25.

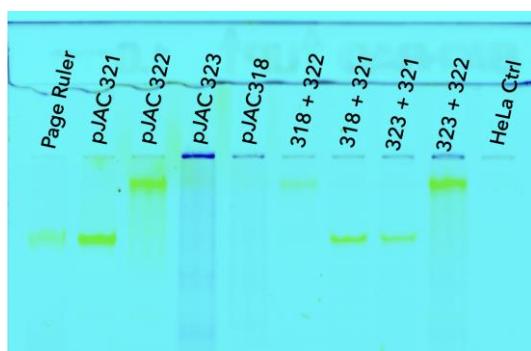


Figura 24. HeLa transfectadas con los cuatro plásmidos por separado y cotransfектadas con las cuatro combinaciones de plásmidos (indicados en la parte superior de cada carril) – Visualización por fluorescencia (Chemidoc) del gel nativo en verde se muestra la emisión de la mRFP excitada con el filtro AF546 y en azul la emisión de la EGFP excitada con AF488.

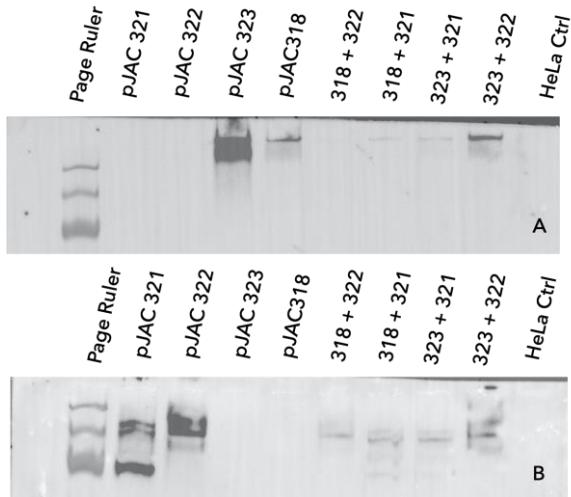


Figura 25. HeLa transfectadas con los cuatro plásmidos por separado y cotransfектadas con las cuatro combinaciones de plásmidos –Incubación de membrana tras gel no desnaturizante con los anticuerpos Anti-tau (1:5000) (A) y Anti- α/β synuclein 128003 (1:1000) (B).

4.2.2 Puesta a punto de la transfección de las SH-SY5Y

Previo a las cotransfecciones en las células SH-SY5Y se realizaron transfecciones de pJAC321 con los reactivos GeneJuice, ViaFect, TransIT-x2020, TransIT-x2, Lipofectamina 2000, y Lipofectamina 3000 a dos ratios. La eficiencia de transfección se analizó por Western blot. En este caso se extrajeron las proteínas de las células de las diferentes pruebas de transfección y se midió, tras la inmunodetección (Figura 26), la intensidad relativa de la aSyn de las diferentes muestras frente a la de Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), empleada como control de expresión proteica ya que se trata de un gen constitutivo. Los resultados del análisis posterior para el cálculo de la eficiencia de transfección que se recogen en la Figura XX24 están normalizados respecto a la expresión de GAPDH en cada muestra.

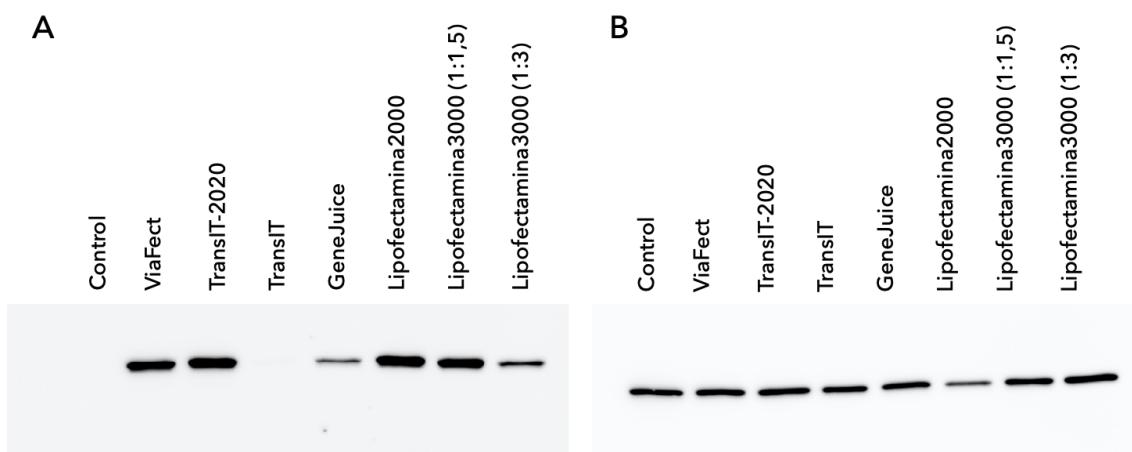


Figura 26. Muestras de transfecciones de SH-SY5Y – Membrana tras inmunodetección con Anti-aSyn 211 (1:1000) (A) y con Anti-GAPDH (1:5000) (B).

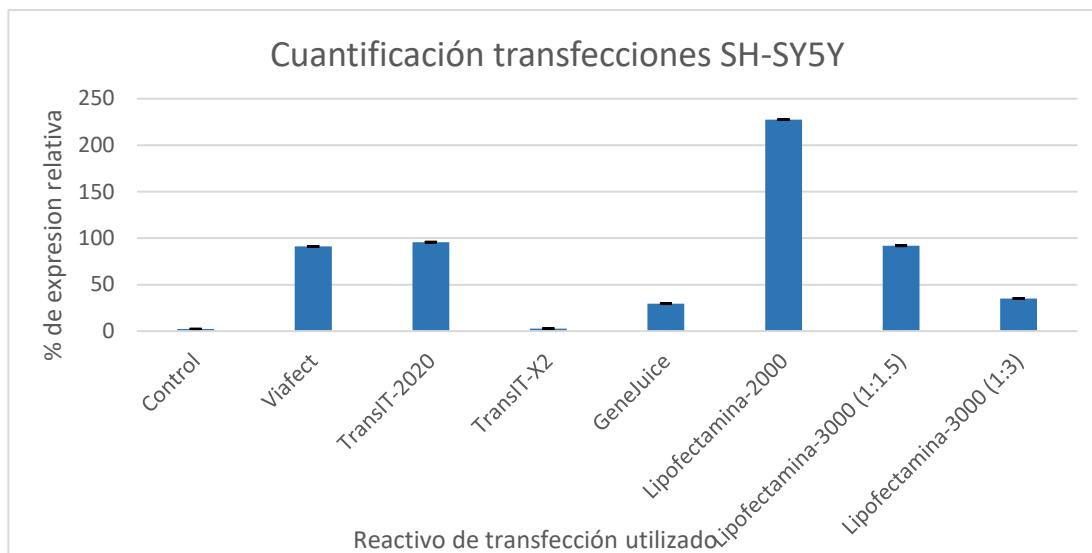


Figura 27. Resultados de cuantificación de la eficiencia de transfección de células SH-SY5Y. Se muestra, en porcentaje de expresión relativa a la expresión de GAPDH, la expresión del plásmido transfectado para cada uno de los reactivos utilizados.

Mediante este método se obtuvo una mayor eficiencia de transfección en SH-SY5Y con el reactivo Lipofectamina 2000. No obstante, también se analizaron las transfecciones por microscopía y, como se muestra en la Figura 28, este reactivo disminuye considerablemente la viabilidad celular. Es por esto que se eligió la Lipofectamina 3000 como método de transfección para las posteriores cotransfecciones de SH-SY5Y.

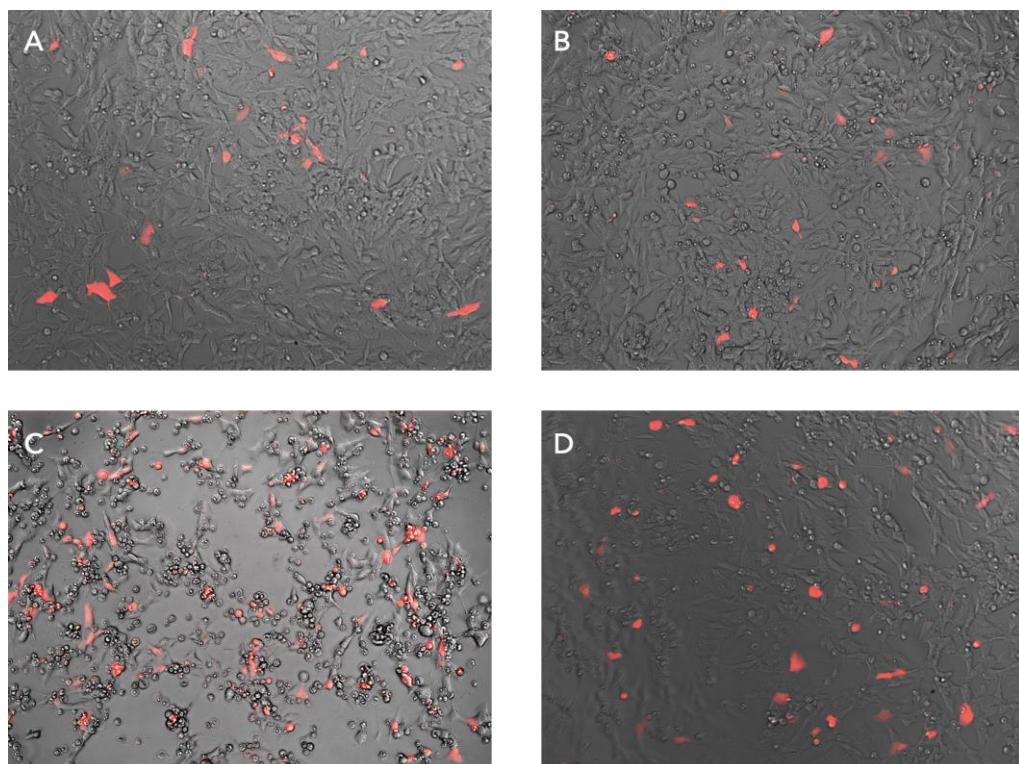


Figura 28. Overlays de microscopía de campo claro y fluorescencia con magnificación 20X.SH-SY5Y transfectadas con diferentes reactivos. ViaFect (A), TransIT-2020 (B), Lipofectamina2000 (C) y Lipofectamina3000 ratio 1:1,5 (D).

4.2.3 Cotransfecciones y estudio de colocalización de aSyn y tau en SH-SY5Y

Para el estudio de colocalización de aSyn y Tau en SH-SY5Y realizaron cotransfecciones con Lipofectamina3000 con un ratio 1:1,5 y se emplearon las mismas combinaciones de plásmidos que para las cotransfecciones de las células HeLa. Las transfecciones se realizaron a distintos tiempos de diferenciación, siendo estos el día 0 de diferenciación, el día 3 y el día 7. Se observó una bajada considerable en la eficiencia de la transfección a mayor día de diferenciación de las células y no varió la localización de las proteínas sobreexpresadas respecto a las cotransfecciones de las células HeLa. La Figura 29 muestra algunas imágenes de las cotransfecciones de las SH-SY5Y a día cero de diferenciación.

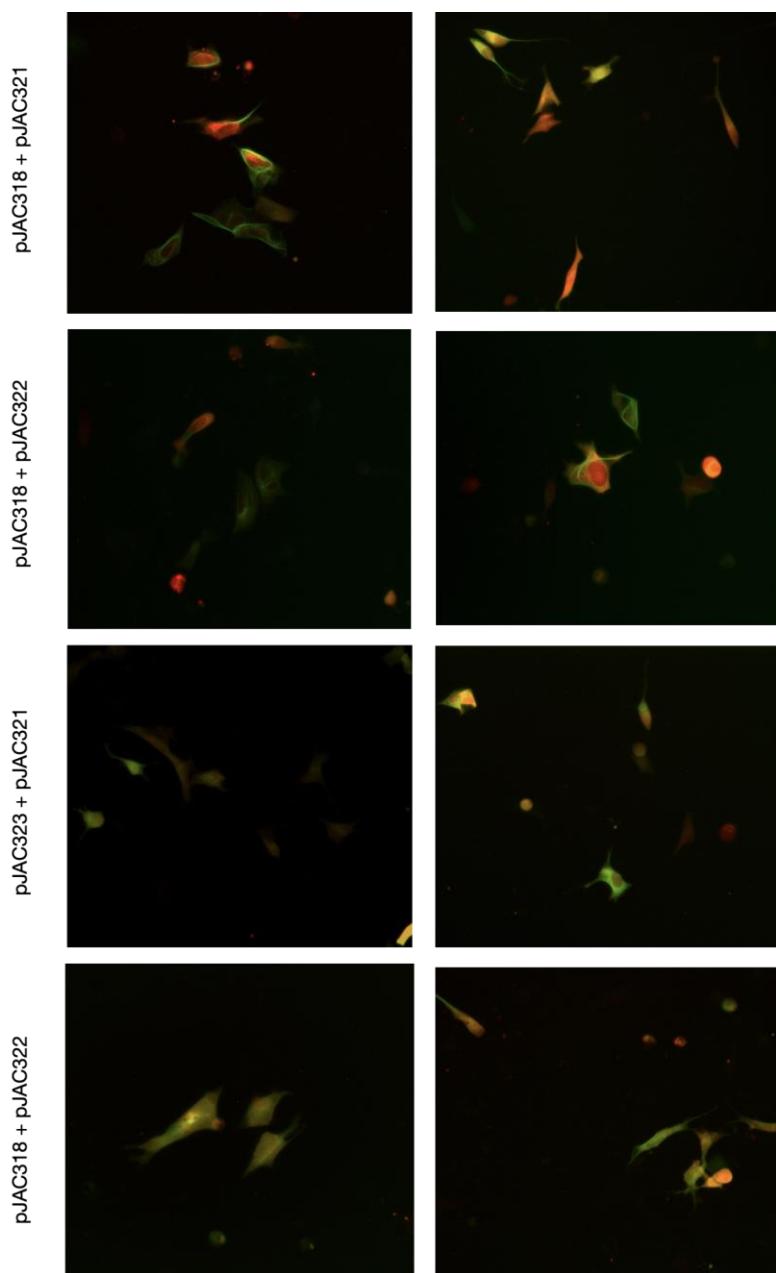


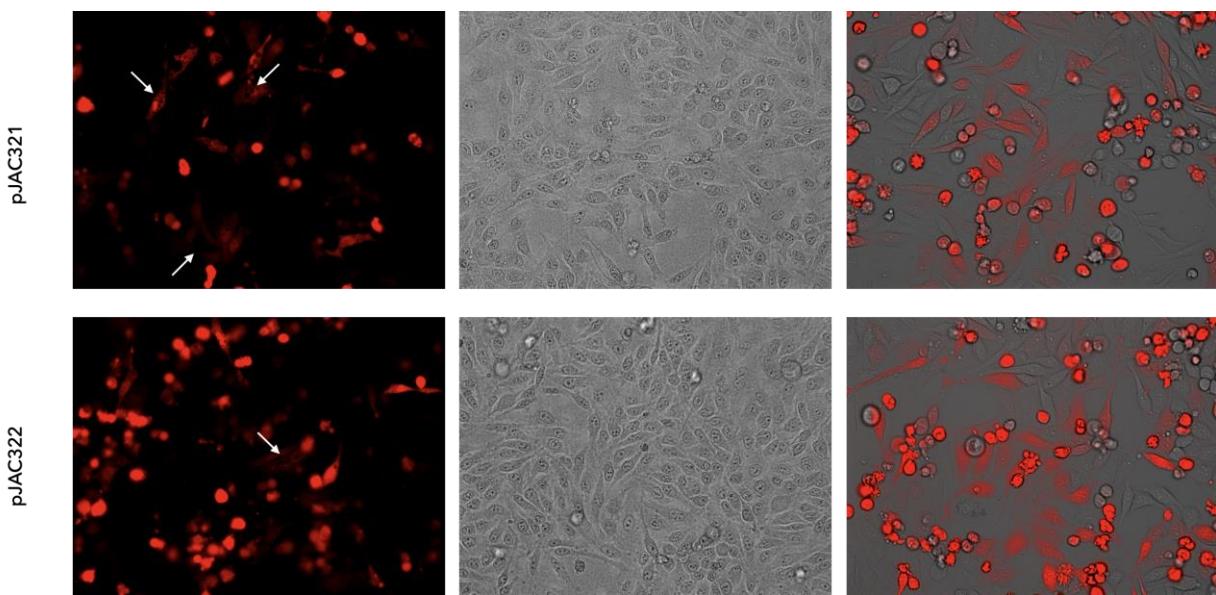
Figura 29. Visualización de las cotransfecciones a 200 aumentos de SH-SY5Y con las 4 combinaciones posibles de plásmidos (indicados en el margen izquierdo).

4.3 Tratamientos

4.3.1 Inducción de estrés oxidativo en HeLa y SH-SY5Y

Se ha demostrado que el estrés celular, principalmente de tipo oxidativo, por alteración, por ejemplo, de la función mitocondrial está relacionado con los procesos iniciales de agregación de aSyn (23,69,70). Con la intención de estudiar el principio de agregación se indujo estrés celular usando los reactivos descritos en la Tabla 10 tanto en células HeLa sobreexpresando aSyn como en SH-SY5Y.

Dado que las células HeLa no expresan aSyn de manera normal, fueron transfectadas para sobreexpresar aSyn y aSyn(N103) con el objetivo de estudiar las posibles diferencias en el comportamiento de la proteína dentro de la célula. Los tratamientos se realizaron 24h después de la transfección y los resultados se visualizaron al microscopio 24h después del inicio del tratamiento. Las células HeLa tratadas con citrato amónico férrico mostraron una morfología anormal en la que se pueden observar en el citoplasma numerosas vesículas de las que queda excluida la aSyn, este efecto en las células fue más pronunciado para las células sobreexpresando aSyn que aSyn(N103). El tratamiento con rotenona ($5 \mu\text{M}$) mostró una gran mortalidad por lo que se bajó la concentración para las SH-SY5Y cambiándola a $2,5 \mu\text{M}$ no obstante en las células vivas no se observa diferencia frente al control de transfección sin tratar. Las células tratadas con arsenito sódico tampoco mostraron cambios importantes en su morfología ni en la localización de aSyn dentro de la célula. Por último, el tratamiento con sulfato de cobre no pudo analizarse por microscopía de fluorescencia correctamente debido al cobre, las imágenes de campo claro muestran un aspecto diferente al control de transfección mostrando un aspecto granulado en el interior de las células. La Figura 30 destaca los cambios relevantes en las células tras los tratamientos.



En el caso de las SH-SY5Y, como se ha mencionado anteriormente, los tratamientos fueron los mismos que para las HeLa a excepción de la rotenona cuya concentración de trabajo fue 2,5 μ M. En este caso, precediendo a los tratamientos se transfecaron las células con pJAC321 y también se cotransfectoron con pJAC321+pJAC318 y pJAC321+pJAC323 para comprobar si la sobreexpresión de las distintas formas de tau influía en el resultado del tratamiento. El tratamiento con citrato amónico férrico parece inducir el principio de agregación de aSyn, siendo este efecto más evidente en las células tratadas solo con pJAC321. El tratamiento con arsenito sódico tiene un efecto similar al citrato amónico férrico, aunque menos pronunciado. Se observó punteado de aSyn tanto en células que solo sobreexpresaban aSyn como en aquellas que la sobreexpresaban junto a tau. Para el tratamiento con sulfato de cobre, de nuevo no pudieron analizarse las imágenes correctamente por microscopía de fluorescencia, pero si por microscopía óptica de campo claro que mostró un comportamiento particular de las células como se observa en la figura XX29. El tratamiento con rotenona sugiere la aparición de punteado similar a la de los dos compuestos anteriores, no obstante, la viabilidad es muy baja y complica el estudio. La Figura 31 muestra algunas imágenes representativas de los resultados de los tratamientos.

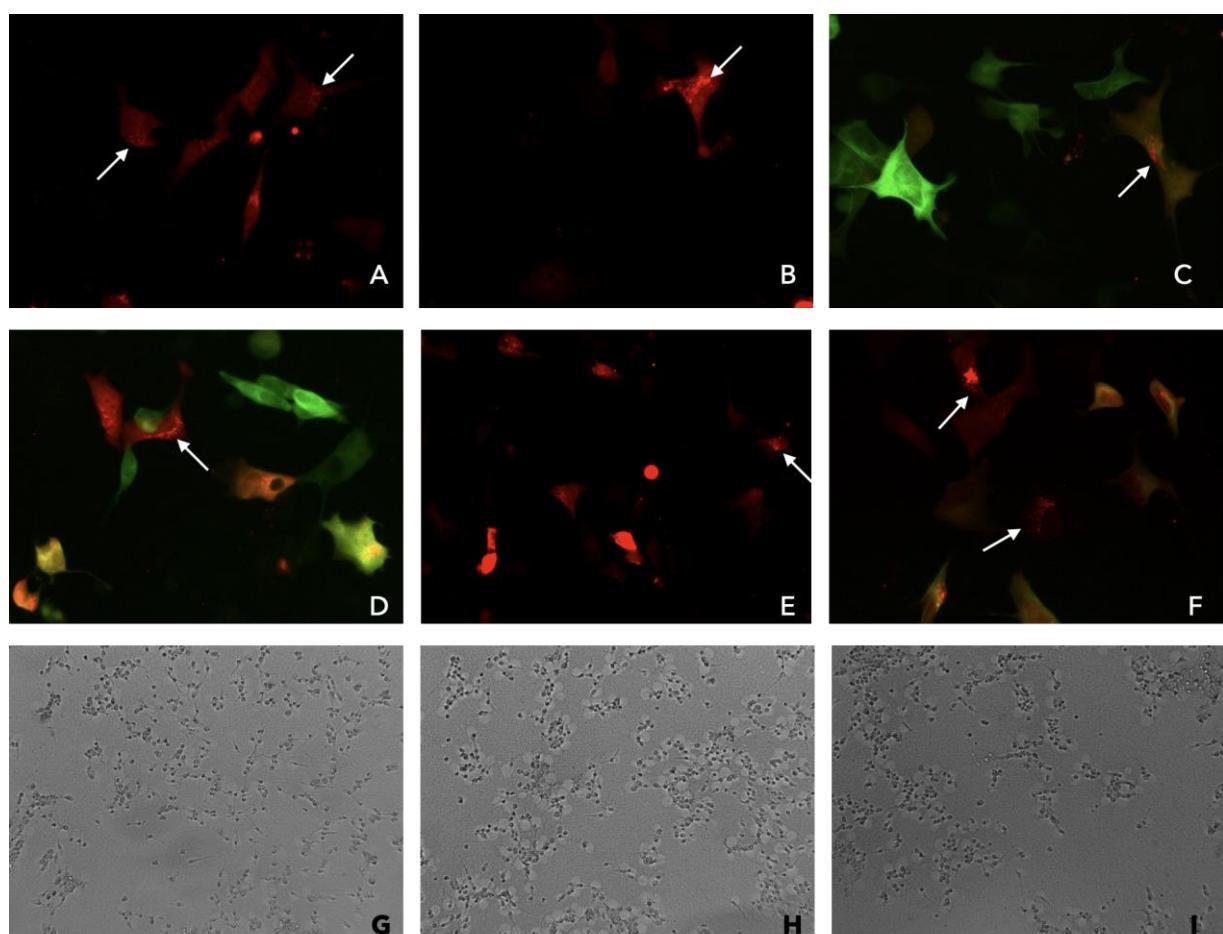


Figura 31. Tratamientos de SHSY-5Y transfectadas. Transfectadas con pJAC321 y tratadas con citrato amónico férrico (A y B). Cotransfectadas con pJAC321+pJAC323 y tratadas con citrato amónico férrico (C y D). Transfectadas con pJAC321 y tratadas con arsenito sódico (E). Cotransfectadas con pJAC321+pJAC318 y tratadas con arsenito (F). Transfectadas con pJAC321 y tratadas con Sulfato de Cobre (G). Transfectadas con pJAC321+pJAC318 y tratadas con sulfato de cobre (H). Cotransfectadas con pJAC321+pJAC323 y tratadas con sulfato de cobre (I).

4.3.2 Tratamiento de células SH-SY5Y con α -Sinucleína exógena.

Dado que la aSyn se transmite de célula a célula, se estudió la captación de diferentes especies de aSyn exógena con células diferenciadas y sin diferenciar y posteriormente la captación de aSyn fibrilar por células transfectadas con las diferentes especies de tau y con pJAC321, para comprobar la influencia sobre las especies aSyn. Se realizó el experimento *in vivo*, por medio time-lapse, de las células, para observar como evolucionaban con el tiempo una vez incorporada la aSyn, y los cambios en la localización y/o transporte de ésta. De los resultados del time-lapse se puede resaltar que las SH-SY5Y diferenciadas resisten mejor el tratamiento con aSyn exógena que las células sin diferenciar, pero cabe la posibilidad de que esto se deba a que internalizan una menor cantidad de aSyn. La internalización se aprecia con aSyn fibrilar y con oligómero fácilmente al microscopio en la primera media hora de tratamiento, no obstante, la internalización del monómero no se puede estudiar por este método ya que no se observan cambios a simple vista con 200 aumentos. En la Figura 32 se puede apreciar la captación de aSyn fibrilar (marcada con Atto647) a diferentes concentraciones por parte de SH-SY5Y diferenciadas. En la Figura 33 se observa la captación de fibrillas de aSyn exógena por parte de células SH-SY5Y transfectadas con distintos vectores.

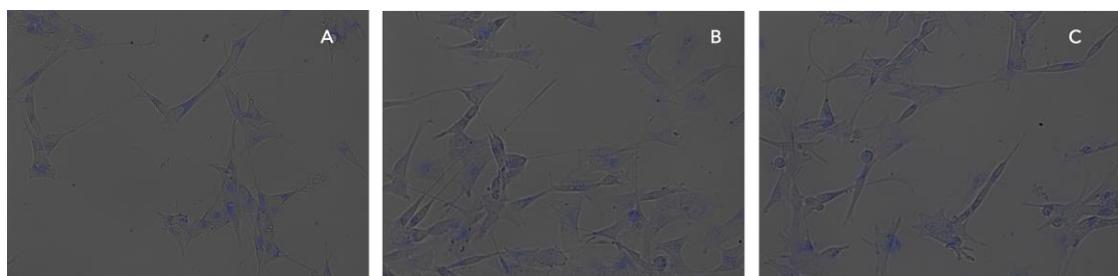


Figura 32. SH-SY5Y diferenciadas (día 7 de transfección) tratadas con fibrillas de aSyn exógena marcada con Atto647 a concentraciones de 0,25 μ M (A), 0,75 μ M (B) y 1,5 μ M (C) 200 aumentos.

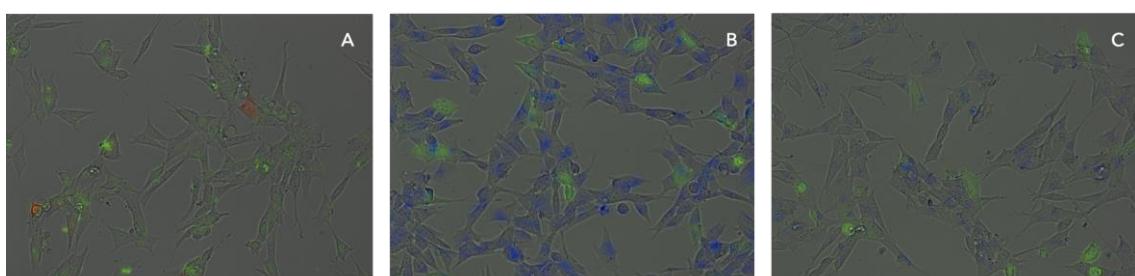


Figura 33. SH-SY5Y sin diferenciar transfectadas tratadas durante 2h con fibrillas de aSyn exógena a 0,25 μ M. pJAC321 + aSyn AF488(A), pJAC318 + aSyn Atto647(B) y pJAC323 + aSyn Atto647(C) 200 aumentos.

5. DISCUSIÓN

El objetivo del presente trabajo era generar modelos celulares de la enfermedad de Párkinson basáandonos, entre otros, en las relaciones ya descritas entre aSyn y tau. Esta propuesta de modelo celular de la PD se basa en las proteínas aSyn, aSyn(N103), tau y tau(N368). Partiendo de que estudios anteriores han confirmado la interacción de aSyn(N103) y Tau(N368) (67), se propuso estudiar si existe dicha interacción pero con la isoforma de tau(4R/0N) en lugar de 4R/2N.

En primer lugar, se diseñaron y construyeron los vectores necesarios para sobreexpresar las cuatro proteínas en las células, las especies de aSyn fusionadas a mRFP y las de tau a EGFP, de manera que se pudieran estudiar por microscopía de fluorescencia. Una vez construidos los plásmidos se pusieron a punto las transfecciones. El análisis de eficiencia de transfección mostró una mejor eficiencia con GeneJuice para células HEK293 y con ViaFect para HeLa, pero en este último caso se escogió también el reactivo GeneJuice dado que la viabilidad celular con el reactivo de transfección ViaFect fue considerablemente menor. En el caso de las transfecciones con las células SH-SY5Y sucede de manera similar, obteniéndose en la puesta a punto una mayor eficiencia de transfección con el reactivo Lipofectamina 2000 pero dado que la viabilidad resultaba muy baja, se escogió la Lipofectamina 3000 ratio 1:1,5 para futuras transfecciones.

Lo primero que se debe recalcar de los resultados de sobreexpresión en cuanto a la naturaleza de las proteínas es que, al analizar las proteínas sobreexpresadas por Western blot, tanto tau(4R/0N) como tau(4R/0N)N368 salen según lo esperado, pero para ambas especies de aSyn se observan dos bandas en el Western blot. En primer lugar, cabe decir que esto sucede en todas las muestras empleadas, con diferentes colonias de los diferentes plásmidos, y que las bandas son de la misma intensidad en todos los casos. Además, cuando se incuba la membrana de transferencia con un anticuerpo anti-Myc solo se obtiene una banda.

Cuando se observa el mapa de pJAC321, se ve que hay dos secuencias codificantes en esta región, pero no están en el mismo marco de lectura por lo que no podría ser reconocidos ambos por los anticuerpos anti-aS. Hay por tanto dos hipótesis que pueden explicar esta doble banda para las proteínas de fusión con aSyn y aSyn(N103). Una posibilidad es que haya un segundo sitio de inicio de la traducción dentro de la región codificante de la EGFP de manera que se exprese la proteína excluyendo el Myc-tag pero incluyendo aSyn. La otra posibilidad es que la proteína se trunque por degradación proteolítica, de hecho, se han reportado datos en los que se muestra que aSyn tiene actividad autoproteolítica (71). Sin embargo, esta segunda hipótesis es menos factible ya que en caso de suceder así, sería poco probable que todas las bandas tengan la misma intensidad, indicando que se degradaría el 50% de la proteína y, además, de manera muy específica dado que no se aprecian otras bandas de posibles subproductos de degradación de menor tamaño. Con el fin de esclarecer la naturaleza de esas bandas se realizó un gel nativo. Si se debe a un sitio interno de inicio

de la traducción la mRFP estará truncada de manera que no emitirá fluorescencia. Al hacer el gel nativo la proteína de fusión mRFP con la especie de aSyn correspondiente sí que debería emitir fluorescencia ya que no se han desnaturizado las proteínas. En el gel nativo observado con fluorescencia, se aprecia una única banda para las dos especies de aSyn, lo que sugiere que la doble banda del gel desnaturizante podría deberse a un sitio interno de inicio de la traducción.

Siguiendo con el estudio de la sobreexpresión de las cuatro proteínas en las células, se examinó por microscopía su localización tanto en Hela como en SH-SY5Y. Se aprecia un cambio considerable en la localización de tau. En la sobreexpresión de tau(4R/ON) se observa por microscopía de fluorescencia la proteína uniéndose a los microtúbulos, mientras que en la sobreexpresión de tau(4R/0N)N368 la proteína se encuentra repartida por el citoplasma. Esto deja en evidencia que para esta isoforma de tau el corte por la N368 altera la unión a microtúbulos. Por otra parte, no se aprecian cambios en la localización de aSyn ni de aSyn(N103), observándose en ambos casos dispersa por el citoplasma.

Aunque entre una especie y otra no ha habido cambios en la localización localización cabe mencionar que, aunque la aSyn es una proteína citoplasmática, en neuronas se localiza principalmente en terminales presinápticos o en interacción con otras membranas como la mitocondrial. Esto no se ha observado para ninguna de las dos especies de aSyn ni en HeLa ni en SH-SY5Y. No obstante, debería tenerse en cuenta que la aSyn interacciona con las membranas por su extremo N-terminal (23) y que, tanto para la sobreexpresión de aSyn como para la de aSyn(N103), las proteínas están expresadas como proteínas de fusión a mRFP por su extremo N-terminal. Teniendo en cuenta que el tamaño de la aSyn es pequeño en comparación con la mRFP, podría suceder que la expresión junto con mRFP por el extremo N-terminal influya en sus posibles interacciones.

Por último, se examinó, también por microscopía de fluorescencia, la posible interacción de las especies de aSyn y tau tanto en HeLa como en SH-SY5Y. Los resultados del estudio mediante microscopía no mostraron una colocalización destacable entre las distintas especies, así como tampoco se observó agregación en ninguna de las cotransfecciones realizadas con las diferentes combinaciones de las especies de aSyn y tau ni en HeLa ni en SH-SY5Y. Esto contradice, en parte, los resultados obtenidos por Ehn *et al* (67) en los que se demuestra la interacción de aSyn(N103) y tau y aSyn(N103) y tau(N368) siendo la más fuerte de las interacciones la de aSyn(N103) con tau(N368). No obstante, se puede discutir dicha discrepancia por varias razones. En primer lugar, en el presente trabajo las proteínas son expresadas siempre como proteínas de fusión a proteínas fluorescentes las cuales podrían dificultar la interacción, por ejemplo, por impedimentos estéricos. Por otra parte, la interacción demostrada es entre aSyn y tau (4R/2N)N368 mientras que en este trabajo todos los ensayos se han realizado con la isoforma 4R/0N de tau. Dado que, por parte de tau, a excepción de la EGFP, la principal diferencia es la ausencia de los exones E2 y E3 podría plantearse la implicación de esta región de la proteína en sus interacciones con otras proteínas como la aSyn. Sin embargo, esto no ha sido estudiado en este proyecto. Adicionalmente, en trabajos anteriores se ha descrito que las repeticiones de tau que se

unen a los microtúbulos son lo que interacciona con la región C-terminal de la aSyn (aa. 87-140) (72) y que, al truncar el extremo C-terminal de tau se dejan expuestas estas repeticiones de manera que se facilita la interacción con el motivo que queda expuesto cuando la aSyn se trunca por N103 (67) de ahí que la interacción más fuerte sea la dada entre estas dos isoformas. Dado que para nuestra isoforma de tau (4R/0N) al sobreexpresar la proteína truncada se observa que se pierde la capacidad de unión a microtúbulos, es probable que esto implique también la pérdida total o parcial la capacidad de interacción con aSyn o aSyn(N103).

Adicionalmente se llevó a cabo el estudio de inicio de agregación de aSyn mediante la inducción de estrés oxidativo. Puesto que una de las características de las sinucleopatías es la actividad deficiente mitocondrial una de las maneras de generar modelos celulares de PD es mediante el uso de compuestos tóxicos que producen disfunción mitocondrial y estrés oxidativo. Además se ha descrito con anterioridad que la exposición a inhibidores mitocondriales como por ejemplo la rotenona inducen la agregación tanto de aSyn como de tau (23,53,66). La inducción de estrés oxidativo se llevó a cabo por medio del tratamiento con citrato amónico férrico, arsenito de sodio, sulfato de cobre y rotenona tanto en células HeLa como con SH-SY5Y. Aunque en HeLa se observaron cambios morfológicos en las células con alguno de los tratamientos como con el citrato amónico férrico, en ningún caso se observó agregación de aSyn o tau. En cambio, en las SH-SY5Y se observó por microscopía el inicio de agregación de aSyn con los tratamientos de citrato amónico férrico, arsenito de sodio y rotenona, aunque esta última provocaba una gran mortalidad en las células. No obstante los tratamientos de inducción de estrés oxidativo no provocaron ningún cambio aparente sobre tau ni sobre la interacción de aSyn y tau.

Finalmente, en el experimento de incorporación de aSyn exógena se observó que tanto las SH-SY5Y diferenciadas como las no diferenciadas captan la aSyn rápido, en menos de 20 minutos. Tanto para las fibrillas como para los oligómeros es fácil ver la internalización a diferentes concentraciones ya que se agrupan en el interior celular. Sin embargo, fue imposible determinar por microscopía de fluorescencia la internalización de la aSyn monomérica por lo que habría que probar otros métodos de visualización. Cabe destacar que en las SH-SY5Y transfectadas con las dos especies de tau no se observaron cambios ni en la incorporación ni en el comportamiento de la aSyn dentro de la célula durante las siguientes horas en comparación a las otras muestras.

En conclusión, a pesar de que las evidencias presentes en la literatura exponen la presencia de interacción de la aSyn con tau(4R/2N)N368, los resultados de los experimentos llevados a cabo en este trabajo parecen indicar, en conjunto, que la isoforma (4R/0N)N368 no interacciona con aSyn ni con aSyn(N103). No obstante, de haber estado disponible, habría resultado de interés la realización de dichos experimentos con un control positivo de interacción para poder valorar mejor los resultados obtenidos, así como si los métodos empleados son adecuados para estos estudios.

6. CONCLUSIONES / CONCLUSIONS

- Se logró la sobreexpresión de aSyn, aSyn(N103), tau(4R/0N) y tau(4R/0N)N368 junto con mRFP y EGFP mediante el diseño, construcción y posterior transfección de nuevos vectores.
 - Se evidenció la ausencia de cambios en la localización celular entre aSyn y aSyn(N103) y se detectaron cambios en la localización celular de tau(4R/0N) y tau(4R/0N)N368 perdiendo esta última la capacidad de unión a microtúbulos.
 - No se detectó por medio de microscopía de fluorescencia colocalización ni interacción de las proteínas aSyn, aSyn(N103), tau(4R/0N) y tau(4R/0N)N368.
 - Se logró iniciar la agregación de aSyn en células SH-SY5Y por medio de la inducción de estrés oxidativo, generando así un modelo celular de PD.
 - No se observaron cambios en la captación de aSyn ni en su posterior comportamiento en el interior de las células SH-SY5Y cuando se realizó la captación en sobreexpresión de tau(4R/0N) ni de tau(4R/0N)N368.
-
- Overexpression of aSyn, aSyn(N103), tau and tau(4R/0N) together with mRFP and EGFP respectively, was achieved through the design, assembly, and transfection of new vectors.
 - No changes were detected between aSyn and aSyn(N103) cellular localization but modifications between tau(4R/0N) cellular localization and tau(4R/0N)N368 were evidenced due to the loss of tau(4R/0N)N368 of the capability to bind the microtubules.
 - Neither colocalization nor interaction of aSyn, aSyn(N103), tau(4R/0N) and tau(4R/0N)N368 was detected by fluorescence microscopy.
 - aSyn aggregation was achieved in SH-SY5Y cells by treatment with oxidative stress induction drugs.
 - No difference was found during the aSyn uptake experiments in SH-SY5Y in presence of tau(4R/0N) or tau(4R/0N)N368 compared with SH-SY5Y.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Obeso JA, Stamelou M, Goetz CG, Poewe W, Lang AE, Weintraub D, et al. Past, present, and future of Parkinson's disease: A special essay on the 200th Anniversary of the Shaking Palsy. *Mov Disord.* 2017;32(9):1264–310.
2. Goetz CG. The History of Parkinson's Disease: Early Clinical Descriptions and Neurological Therapies. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2011 Sep 1;1(1):a008862–a008862.
3. Tysnes OB, Storstein A. Epidemiology of Parkinson's disease. *J Neural Transm.* 2017;124(8):901–5.
4. Hirsch L, Jette N, Frolkis A, Steeves T, Pringsheim T. The Incidence of Parkinson's Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Neuroepidemiology.* 2016;46(4):292–300.
5. Poewe W, Seppi K, Tanner CM, Halliday GM, Brundin P, Volkmann J, et al. Parkinson disease. *Nat Rev Dis Prim.* 2017;3:1–21.
6. Ray Dorsey E, Elbaz A, Nichols E, Abd-Allah F, Abdelalim A, Adsuar JC, et al. Global, regional, and national burden of Parkinson's disease, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Neurol.* 2018;17(11):939–53.
7. Neary D, Crossman A. R. *Neuroanatomía texto y atlas en color.* 3rd ed. Elsevier; 2007. 145–154 p.
8. Kalia L V., Lang AE. Parkinson's disease. *Lancet.* 2015;386(9996):896–912.
9. Dickson DW, Braak H, Duda JE, Duyckaerts C, Gasser T, Halliday GM, et al. Neuropathological assessment of Parkinson's disease: refining the diagnostic criteria. *Lancet Neurol.* 2009;8(12):1150–7.
10. Halliday GM, Holton JL, Revesz T, Dickson DW. Neuropathology underlying clinical variability in patients with synucleinopathies. *Acta Neuropathol.* 2011;122(2):187–204.
11. Dickson DW. Parkinson ' s disease and parkinsonism in. *Cold Spring,Med, Harb Perspect.* 2012;2(8):1–15.
12. Olanow CW, Perl DP, DeMartino GN, McNaught KSP. Lewy-body formation is an aggresome-related process: A hypothesis. *Lancet Neurol.* 2004;3(8):496–503.
13. Wakabayashi K, Tanji K, Odagiri S, Miki Y, Mori F, Takahashi H. The Lewy body in Parkinson's disease and related neurodegenerative disorders. *Mol Neurobiol.* 2013;47(2):495–508.
14. Heiko Braak and Kelly Del Tredici. *Neuroanatomy and Pathology of Sporadic Parkinson's Disease. Advances in Anatomy Embryology and Cell Biology.* Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2008. 1–73 p. (*Advances in Anatomy, Embryology and Cell Biology;* vol. 201).
15. Spillantini GM, Schmidt ML, Lee VM-Y, Trojanowski JQ, Jakes R, Goedert M. Alpha-Synuclein in Lewy bodies. *Nature.* 1997;839–40.
16. Milber JM, Noorigian J V., Morley JF, Petrovitch H, White L, Ross GW, et al. Lewy pathology is not the first sign of degeneration in vulnerable neurons in parkinson disease. *Neurology.* 2012;79(24):2307–14.

17. Mahul-Mellier AL, Burtscher J, Maharjan N, Weerens L, Croisier M, Kuttler F, et al. The process of Lewy body formation, rather than simply α -synuclein fibrillization, is one of the major drivers of neurodegeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2020;117(9):4971–82.
18. Clayton DF, George JM. The synucleins: A family of proteins involved in synaptic function, plasticity, neurodegeneration and disease. *Trends Neurosci.* 1998;21(6):249–54.
19. Stefanis L. alpha-Synuclein in Parkinson's Disease. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012 Feb 1;2(2):a009399–a009399.
20. Norris EH, Giasson BI, Lee VM-Y. α -Synuclein: Normal Function and Role in Neurodegenerative Diseases. In 2004. p. 17–54.
21. Butler B, Sambo D, Khoshbouei H. Alpha-synuclein modulates dopamine neurotransmission. *J Chem Neuroanat.* 2017 Oct;83–84(1):41–9.
22. Murray IVJ, Giasson BI, Quinn SM, Koppaka V, Axelsen PH, Ischiropoulos H, et al. Role of α -synuclein carboxy-terminus on fibril formation in vitro. *Biochemistry.* 2003;42(28):8530–40.
23. Villar-Piqué A, Lopes da Fonseca T, Outeiro TF. Structure, function and toxicity of alpha-synuclein: the Bermuda triangle in synucleinopathies. *J Neurochem.* 2016;139:240–55.
24. Buell AK, Galvagnion C, Gaspar R, Sparr E, Vendruscolo M, Knowles TPJ, et al. Solution conditions determine the relative importance of nucleation and growth processes in α -synuclein aggregation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(21):7671–6.
25. Greenbaum EA, Graves CL, Mishizen-Eberz AJ, Lupoli MA, Lynch DR, Englander SW, et al. The E46K mutation in α -synuclein increases amyloid fibril formation. *J Biol Chem.* 2005;280(9):7800–7.
26. Rutherford NJ, Moore BD, Golde TE, Giasson BI. Divergent effects of the H50Q and G51D SNCA mutations on the aggregation of α -synuclein. *J Neurochem.* 2014;131(6):859–67.
27. Burré J, Sharma M, Südhof TC. Systematic mutagenesis of α -synuclein reveals distinct sequence requirements for physiological and pathological activities. *J Neurosci.* 2012;32(43):15227–42.
28. Conway KA, Harper JD, Lansbury PT. Accelerated in vitro fibril formation by a mutant α -synuclein linked to early-onset Parkinson disease. *Nat Med.* 1998;4(11):1318–20.
29. Ghosh D, Sahay S, Ranjan P, Salot S, Mohite GM, Singh PK, et al. The newly discovered Parkinsons disease associated finnish mutation (A53E) attenuates α -synuclein aggregation and membrane binding. *Biochemistry.* 2014;53(41):6419–21.
30. Conway KA, Lee SJ, Rochet JC, Ding TT, Williamson RE, Lansbury PT. Acceleration of oligomerization, not fibrillization, is a shared property of both α -synuclein mutations linked to early-onset Parkinson's disease: Implications for pathogenesis and therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(2):571–6.
31. Recchia A, Debotto P, Negro A, Guidolin D, Skaper SD, Giusti P. α -Synuclein and Parkinson's disease. *FASEB J.* 2004 Apr;18(6):617–26.
32. Maroteaux L, Campanelli JT, Scheller RH. Synuclein: A neuron-specific protein localized to the nucleus and presynaptic nerve terminal. *J Neurosci.* 1988;8(8):2804–15.

33. Bendor JT, Logan TP, Edwards RH. The function of α -synuclein. *Neuron*. 2013;79(6):1044–66.
34. Gonçalves S, Outeiro TF. Assessing the subcellular dynamics of alpha-synuclein using photoactivation microscopy. *Mol Neurobiol*. 2013;47(3):1081–92.
35. Jenco JM, Rawlingson A, Daniels B, Morris AJ. Regulation of phospholipase D2: Selective inhibition of mammalian phospholipase D isoenzymes by α - and β -synucleins. *Biochemistry*. 1998;37(14):4901–9.
36. Burré J, Sharma M, Tsetsenis T, Buchman V, Etherton MR, Südhof TC. α -Synuclein promotes SNARE-complex assembly in vivo and in vitro. *Science* (80-). 2010;329(5999):1663–7.
37. Adamczyk A, Strosznajder JB. Alpha-synuclein potentiates Ca²⁺ influx through voltage-dependent Ca²⁺ channels. *Neuroreport*. 2006 Dec;17(18):1883–6.
38. Ronzitti G, Bucci G, Emanuele M, Leo D, Sotnikova TD, Mus L V., et al. Exogenous α -synuclein decreases raft partitioning of Cav2.2 channels inducing dopamine release. *J Neurosci*. 2014;34(32):10603–15.
39. Peng XM, Tehranian R, Dietrich P, Stefanis L, Perez RG. α -Synuclein activation of protein phosphatase 2A reduces tyrosine hydroxylase phosphorylation in dopaminergic cells. *J Cell Sci*. 2005;118(15):3523–30.
40. Chen M-K, Kuwabara H, Zhou Y, Adams RJ, Brašić JR, McGlothan JL, et al. VMAT2 and dopamine neuron loss in a primate model of Parkinson's disease. *J Neurochem*. 2008 Apr;105(1):78–90.
41. Guo JT, Chen AQ, Kong Q, Zhu H, Ma CM, Qin C. Inhibition of vesicular monoamine transporter-2 activity in α -synuclein stably transfected SH-SY5Y cells. *Cell Mol Neurobiol*. 2008;28(1):35–47.
42. Swant J, Goodwin JS, North A, Ali AA, Gamble-George J, Chirwa S, et al. α -Synuclein Stimulates a Dopamine Transporter-Dependent Chloride Current and Modulates the Activity of the Transporter. *J Biol Chem*. 2011;286(51):43933–43.
43. Pelkonen A, Kallunki P, Yavich L. Effects of exogenous alpha-synuclein on stimulated dopamine overflow in dorsal striatum. *Neurosci Lett*. 2013;554:141–5.
44. Lam HA, Wu N, Cely I, Kelly RL, Hean S, Richter F, et al. Elevated tonic extracellular dopamine concentration and altered dopamine modulation of synaptic activity precede dopamine loss in the striatum of mice overexpressing human α -synuclein. *J Neurosci Res*. 2011 Jul;89(7):1091–102.
45. Li WW, Yang R, Guo JC, Ren HM, Zha XL, Cheng JS, et al. Localization of α -synuclein to mitochondria within midbrain of mice. *Neuroreport*. 2007;18(15):1543–6.
46. Hsu LJ, Sagara Y, Arroyo A, Rockenstein E, Sisk A, Mallory M, et al. A-Synuclein Promotes Mitochondrial Deficit and Oxidative Stress. *Am J Pathol*. 2000;157(2):401–10.
47. Devi L, Raghavendran V, Prabhu BM, Avadhani NG, Anandatheerthavarada HK. Mitochondrial import and accumulation of α -synuclein impair complex I in human dopaminergic neuronal cultures and Parkinson disease brain. *J Biol Chem*. 2008;283(14):9089–100.
48. Liu G, Zhang C, Yin J, Li X, Cheng F, Li Y, et al. α -Synuclein is differentially expressed in mitochondria from different rat brain regions and dose-dependently down-regulates complex I activity. *Neurosci Lett*. 2009;454(3):187–92.
49. Loeb V, Yakunin E, Saada A, Sharon R. The transgenic overexpression of α -

- synuclein and not its related pathology associates with complex I inhibition. *J Biol Chem.* 2010;285(10):7334–43.
50. Kamp F, Exner N, Lutz AK, Wender N, Hegermann J, Brunner B, et al. Inhibition of mitochondrial fusion by α -synuclein is rescued by PINK1, Parkin and DJ-1. *EMBO J.* 2010;29(20):3571–89.
 51. Nakamura K, Nemanic VM, Azarbal F, Skibinski G, Levy JM, Egami K, et al. Direct membrane association drives mitochondrial fission by the Parkinson disease-associated protein α -synuclein. *J Biol Chem.* 2011;286(23):20710–26.
 52. Xie W, Chung KKK. Alpha-synuclein impairs normal dynamics of mitochondria in cell and animal models of Parkinson's disease. *J Neurochem.* 2012;122(2):404–14.
 53. Banerjee K, Sinha M, Pham CLL, Jana S, Chanda D, Cappai R, et al. α -Synuclein induced membrane depolarization and loss of phosphorylation capacity of isolated rat brain mitochondria: Implications in Parkinson's disease. *FEBS Lett [Internet].* 2010;584(8):1571–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2010.03.012>
 54. Sarafian TA, Ryan CM, Souda P, Masliah E, Kar UK, Vinters H V., et al. Impairment of Mitochondria in Adult Mouse Brain Overexpressing Predominantly Full-Length, N-Terminally Acetylated Human α -Synuclein. *PLoS One.* 2013;8(5).
 55. Shen J, Du T, Wang X, Duan C, Gao G, Zhang J, et al. A-Synuclein Amino Terminus Regulates Mitochondrial Membrane Permeability. *Brain Res.* 2014;1591(1):14–26.
 56. Chen L, Xie Z, Turkson S, Zhuang X. A53T human α -synuclein overexpression in transgenic mice induces pervasive mitochondria macroautophagy defects preceding dopamine neuron degeneration. *J Neurosci.* 2015;35(3):890–905.
 57. Alim MA, Hossain MS, Arima K, Takeda K, Izumiya Y, Nakamura M, et al. Tubulin seeds α -synuclein fibril formation. *J Biol Chem.* 2002;277(3):2112–7.
 58. Giasson BI, Forman MS, Higuchi M, Golbe LI, Graves CL, Kotzbauer PT, et al. Initiation and synergistic fibrillization of tau and alpha-synuclein. *Science (80-).* 2003;300(5619):636–40.
 59. Qureshi HY, Paudel HK. Parkinsonian neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) and α -synuclein mutations promote tau protein phosphorylation at Ser262 and destabilize microtubule cytoskeleton in Vitro. *J Biol Chem.* 2011;286(7):5055–68.
 60. Morris M, Maeda S, Vossel K, Mucke L. The Many Faces of Tau. *Neuron [Internet].* 2011 May;70(3):410–26. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624763/pdf/nihms412728.pdf>
 61. Goedert M, Jakes R. Expression of separate isoforms of human tau protein: Correlation with the tau pattern in brain and effects on tubulin polymerization. *EMBO J.* 1990;9(13):4225–30.
 62. Brandt R, Trushina NI, Bakota L. Much More Than a Cytoskeletal Protein: Physiological and Pathological Functions of the Non-microtubule Binding Region of Tau. *Front Neurol.* 2020;11(October):1–14.
 63. Braak H, Del Tredici K, Rüb U, De Vos RAJ, Jansen Steur ENH, Braak E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging.* 2003;24(2):197–211.
 64. Hawkes CH, Del Tredici K, Braak H. Parkinson's disease: A dual-hit hypothesis. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2007;33(6):599–614.

65. Zhang Z, Kang SS, Liu X, Ahn EH, Zhang Z, He L, et al. Asparagine endopeptidase cleaves α -synuclein and mediates pathologic activities in Parkinson's disease. *Nat Struct Mol Biol.* 2017;24(8):632–42.
66. Zhang Z, Song M, Liu X, Kang SS, Kwon IS, Duong DM, et al. Cleavage of tau by asparagine endopeptidase mediates the neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease. *Nat Med.* 2014;20(11):1254–62.
67. Ahn EH, Kang SS, Liu X, Chen G, Zhang Z, Chandrasekharan B, et al. Initiation of Parkinson's disease from gut to brain by δ -secretase. *Cell Res.* 2020 Jan 24;30(1):70–87.
68. Lee VMY, Goedert M, Trojanowski JQ. Neurodegenerative tauopathies. *Annu Rev Neurosci.* 2001;24:1121–59.
69. Chaves RS, Melo TQ, Martins SA, Ferrari MFR. Protein aggregation containing beta-amyloid, alpha-synuclein and hyperphosphorylated tau in cultured cells of hippocampus, substantia nigra and locus coeruleus after rotenone exposure. *BMC Neurosci.* 2010;11.
70. Sherer TB, Betarbet R, Stout AK, Lund S, Baptista M, Panov A V., et al. An in vitro model of Parkinson's disease: Linking mitochondrial impairment to altered α -synuclein metabolism and oxidative damage. *J Neurosci.* 2002;22(16):7006–15.
71. Vlad C, Lindner K, Karreman C, Schildknecht S, Leist M, Tomczyk N, et al. Autoproteolytic Fragments Are Intermediates in the Oligomerization/Aggregation of the Parkinson's Disease Protein Alpha-Synuclein as Revealed by Ion Mobility Mass Spectrometry. *ChemBioChem [Internet].* 2011 Dec 16;12(18):2740–4. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624763/pdf/nihms412728.pdf>
72. Jensen PH, Hager H, Nielsen MS, Højrup P, Gliemann J, Jakes R. α -synuclein binds to tau and stimulates the protein kinase A-catalyzed tau phosphorylation of serine residues 262 and 356. *J Biol Chem.* 1999;274(36):25481–9.
73. Escobar-Khondiker M, Höllerhage M, Muriel MP, Champy P, Bach A, Depienne C, et al. Annonacin, a natural mitochondrial complex I inhibitor, causes tau pathology in cultured neurons. *J Neurosci.* 2007;27(29):7827–37.

ANEXO A

Tabla A 1. Listado completo de plásmidos empleados en las clonaciones y transfecciones.

Nombre	Inserto	Backbone	Resistencia	Expresión
pJAC295	TM BclXL	pCMV-Myc-mRFP	Amp	Eurocariota
pJAC300	Human alpha Synuclein WT	PT7-7	Amp	Procariota
pJAC318	pRK5-EGFP-Tau (4R/0N)	pRK5	Amp	Eurocariota
pJAC321	C-myc-mRFP-Human alpha synuclien WT	pCMV-C-myc-mRFP	Amp	Eurcariota
pJAC322	C-myc-mRFP-Human alpha synuclienN103	pCMV-C-myc-mRFP	Amp	Eurcariota
pJAC323	EGFP-Tau (4R/0N)N36 δ	pRK5-EGFP-Tau (4R/0N)	Amp	Eurcariota
pJAC324	aS (WT)-IRES-mCherry62	pcDNA 3.1(-) aS (WT)	Amp	Eurcariota
pJAC325	aS (E46K)-IRES-mCherry62	pcDNA 3.1(-) aS (WT)	Amp	Eurcariota

Tabla A 2. Listado de cebadores empleados en la secuenciación de los plásmidos PJAC 321, PJAC 322 y PJAC 323 por la empresa Sistemas genómicos.

Cebadores	Secuencia 5'→3'
pREVTRED	GCTTGCCAAACCTACAGG
pCMVHAPR	CACTGCATTCTAGTTGTGG
SP6	ATTTAGGTGACACTATAG
EGFPC	CATGGTCCTGCTGGAGTTCGTG

Tabla A 3 Composición geles usados en la electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE).

	4%	10%	12%
H ₂ O	1,6 ml	2,42 ml	2,17 ml
Acrilamida 40%	250 µL	1,25 ml	1,5 ml
Tris 1,5M pH 8.8	-	1,25 ml	1,25 ml
Tris 1M pH 6.8	321,5 µL	-	-
SDS 20%	12,5 µL	25 µL	25 µL
APS 10%	25 µL	50 µL	50 µL
TEMED	2,5 µL	5 µL	5 µL

ANEXO B: MAPAS DE LOS PLÁSMIDOS EMPLEADOS EN EL TRABAJO

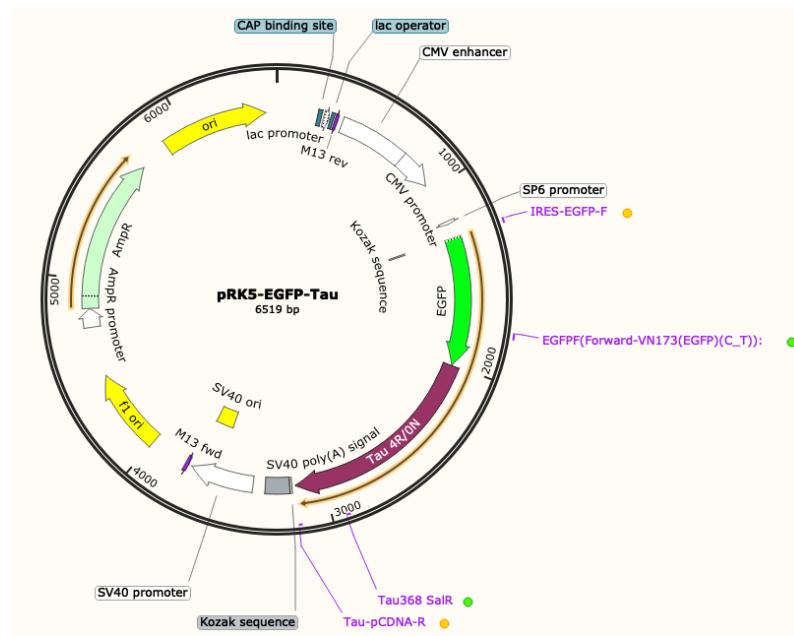


Figura B 1. Mapa del plásmido pJAC318.

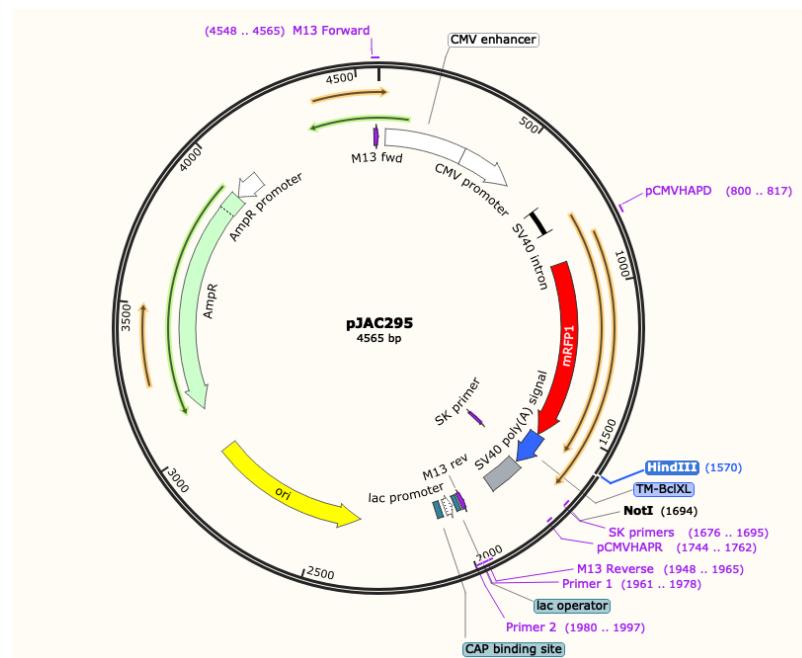


Figura B 2. Mapa del plásmido pJA295.

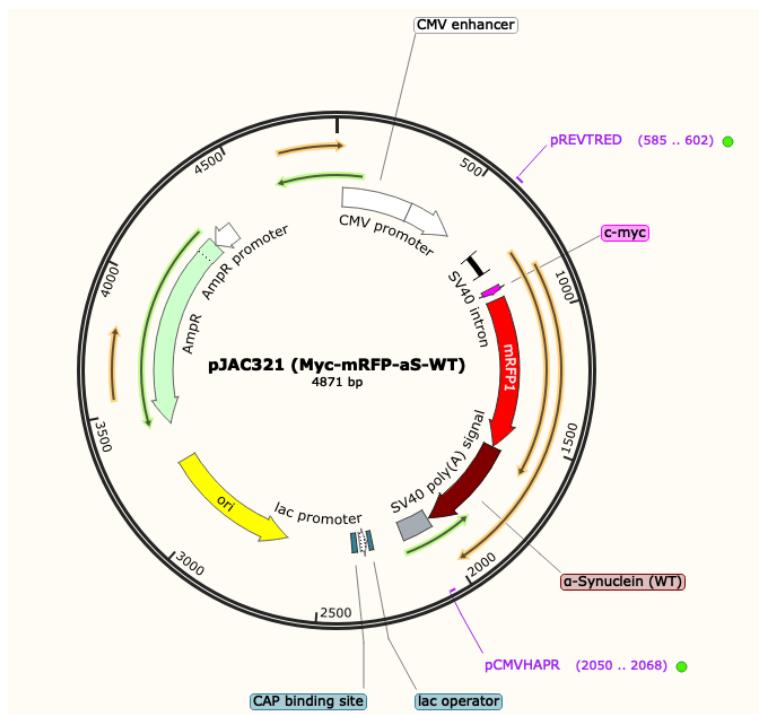


Figura B 3. Mapa del plásmido pJAC321.

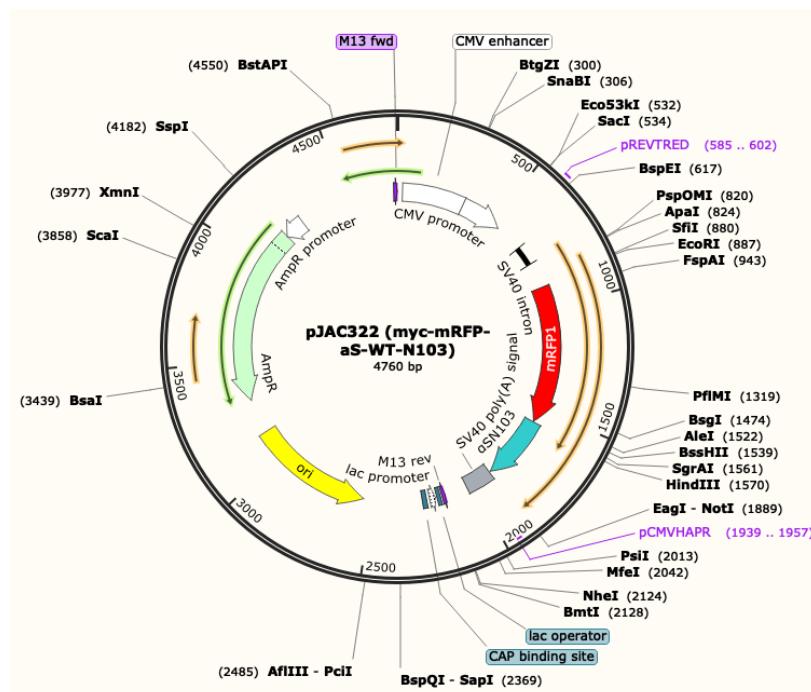


Figura B 4. Mapa del plásmido pJAC322.

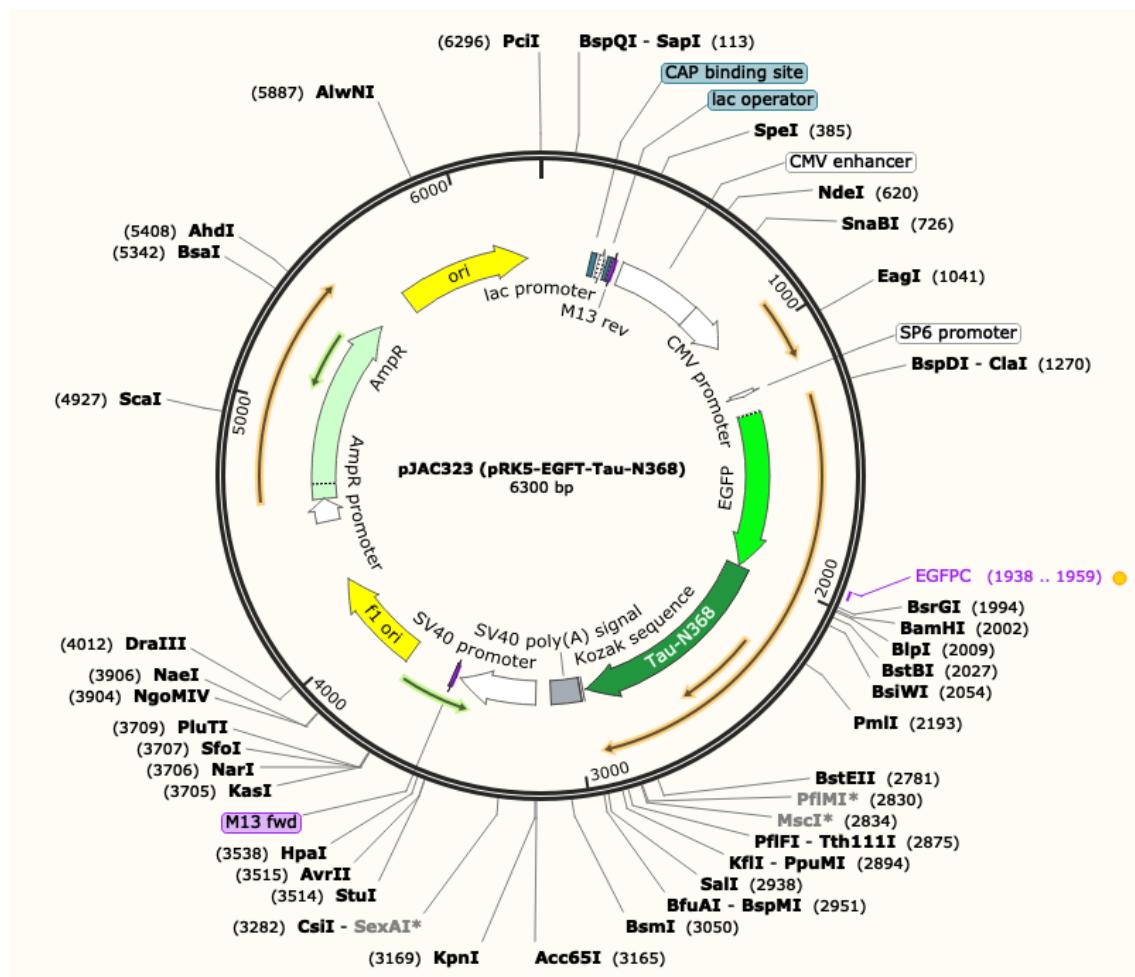


Figura B 5. Mapa del plásmido pJAC323