



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

**Efecto de la disminución de la expresión de Pink1 y
Parkin sobre vías de supervivencia y metabolismo en un modelo
de neuronas dopaminérgicas**

Andrea Carolina Niño Ojeda

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:
Magíster en Neurociencias

Grupo de Investigación en Muerte Celular
Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina
Bogotá D.C., Colombia
2013

**Efecto de la disminución de la expresión de Pink1 y
Parkin sobre vías de supervivencia y metabolismo en un modelo
de neuronas dopaminérgicas**

Andrea Carolina Niño Ojeda

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:
Magister en Neurociencias

Director:

Gonzalo Humberto Arboleda Bustos, MD MSc PhD

Grupo de Investigación en Muerte Celular
Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina
Bogotá D.C., Colombia
2013

*“The future belongs to those
who believe in the
Beauty of their dreams”.*

Eleanor Roosevelt

Agradecimientos

Este trabajo está dedicado a mis padres que con su trabajo, esfuerzo, ejemplo y apoyo me han dado fuerza para continuar mi formación profesional. A mi hermana que con sus palabras de admiración ha contribuido para esforzarme cada día por ser el mejor ejemplo. A mis tíos y mi prima porque con sus cuidados y dedicación contribuyeron a la energía y concentración que este proyecto demandaba.

A toda la familia Ojeda Angarita que se han gozado conmigo cada logro alcanzado, por ser la prueba viva de que el apoyo y colaboración son indispensables (aun en la investigación), especialmente a mi abuela que me reconforta cada vez que tengo el privilegio de ver su hermosa sonrisa. A Jose por sus consejos y apoyo incondicional.

A Colciencias gracias por financiar este proyecto.

A mi querida Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia donde decidí dar los primeros pasos hacia el maravilloso mundo de la Neurociencia, especialmente a la profesora Maribel Forero que ha sido un gran ejemplo y motivación en mi desarrollo profesional.

A la Universidad Nacional de Colombia por abrirme las puertas a un mundo lleno de oportunidades porque gracias a su apoyo logre disfrutar de dos viajes maravillosos que impactaron mi desarrollo profesional y personal.

A mis profesores Gonzalo, Humberto y Juan por transmitir sus conocimientos y experiencias académicas, especialmente al profe Gonzalo que ha tenido que aguantar mi intensidad por 4 años y por motivarme en cada seminario a afianzar mis conocimientos y desarrollar una actitud crítica con sus constantes preguntas.

A mis compañeros de Neurociencias y Muerte Celular que me han acompañado en festejos y tristezas y han tenido que aguantar mis regañones en el laboratorio, pero juntos hemos logrado con acuerdos y desacuerdos triunfos colectivos. Un agradecimiento especial para Liliana Rojas, mi amiga y compañera de trabajo. A Magda López por su paciencia y ayuda.

Al Instituto de Genética por ser la locación de este centro de ideas, a los compañeros del lab 7 y 8 por su colaboración, apoyo y complicidad.

A mis compañeros biólogos Sebastian, Pao y Tatiana gracias por aparecer en mi vida, a Belkis y Andrés mis amigos de aventuras y sueños gracias por sus buenos deseos.

A la Familia Cardozo en Missoula por su aprecio y enseñanzas.

Resumen

La enfermedad de Parkinson (EP) es el segundo desorden neurodegenerativo más común, caracterizado por la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la sustancia nigra y la formación de cuerpos de Lewy. Parkin (PARK2) y Pink1 (PARK6) han sido identificados como genes asociados a EP juvenil de herencia autosómica recesiva, los cuales codifican proteínas asociadas a procesos de homeóstasis mitocondrial (fisión, fusión, mitofagia). Sin embargo, su función exacta sigue siendo desconocida. Con el fin de contribuir al esclarecimiento de la función de estos genes se crearon tres líneas celulares: shControl (línea control), shPink1 (disminución de la expresión de Pink1), shParkin (disminución de la expresión de Parkin) y se evaluó el efecto sobre vías de supervivencia y metabolismo neuronal en un modelo de neuronas dopaminérgicas (células CAD). Adicionalmente, se evaluó la respuesta de estas células frente a la exposición a C2-Ceramida, IGF-1 e insulina. Los resultados evidencian que la disminución de la expresión de Pink1 y Parkin causa pérdida de la viabilidad celular asociado a deficiencia en la fosforilación de AKT (Ser 473) y ERK1/2 (Tyr 202/204) y sus sustratos como GSK3 β y hexoquinasa (HK). Adicionalmente, la expresión de HK se encontró disminuida en las células shPink1 e incrementada en las células shParkin. Sin embargo, las dos líneas celulares presentaron una deficiencia en la actividad y localización mitocondrial de HK. Se evidenció además que el silenciamiento de los genes crea una distribución perinuclear de las mitocondrias y una pérdida del potencial de membrana mitocondrial. Este fenotipo puede ser explicado en parte por cambios en receptores tirosina quinasa (RTKs). Se determinó que la disminución de Pink1 afecta la fosforilación del receptor del factor de crecimiento similar a la insulina Tipo 1 (IGF-1R) mientras que la disminución de Parkin se encuentra asociado con disminución en la fosforilación y activación del receptor de insulina (IR). Si bien la sobreexpresión de HK en las células shPink1 logra recuperar la viabilidad celular, los defectos en la activación de los receptores tirosina quinasa abren un nuevo panorama frente a la función de Pink1 y Parkin en la regulación de la supervivencia neuronal.

Palabras clave: PINK1, PARKIN, IGF-1R, IR, Hexoquinasa, enfermedad de Parkinson.

Abstract

Parkinson's disease (PD) is the second most common neurodegenerative disorder PD is characterized by loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta (SN) and the formation of Lewy bodies (LB). Mutations in Parkin (PARK2) and Pink1 (PARK6) genes have been identified in early-onset familial forms of the disease as well as in autosomal recessive juvenile PD. Pink1 and Parkin encode proteins associated with mechanisms of mitochondrial homeostasis such as fission, fusion and mitophagy, but their exact function remains unknown. To help clarify the role of Pink1 and Parkin we created three cell lines: shControl (control line), shPink1 (with reduced Pink1) and shParkin (with decreased Parkin) to evaluate the effect of reduced Pink1 and Parkin expression on survival pathways and neuronal metabolism in a model of dopaminergic neurons (cells CAD). Additionally, we also analyzed the response of these cells to C2- ceramide, IGF-1 and insulin exposure. Our results show that decreased expression of Parkin and Pink1 caused loss of cell viability due to a deficiency in the phosphorylation of AKT (serine 473) and ERK1/2 (tyrosines 202/204) and its downstream targets such as GSK3 and hexokinase (HK). HK expression was decreased in cells shPink1 and increased in cells shParkin. However, both cell lines showed deficiency in the activity of hexokinase and mitochondrial localization. We also found changes in mitochondrial distribution in shPink1 and Parkin cells which was mainly of perinuclear localization as well as a loss of mitochondrial membrane potential. This phenotype can be explained by changes found in tyrosine kinase receptors. Decreasing Pink1 affects phosphorylation of IGF-1 receptor (IGF-1R) while decreasing Parkin is associated with defects on the phosphorylation and activation of insulin receptor (IR). Although HK overexpression in cells led to a recovery in cell viability in shPink1 cells, defects in the activation of tyrosine kinase receptors opens a new alternative pathways in which Pink1 and Parkin may regulate neuronal viability.

Keywords: PINK1, PARKIN, IGF-1R, IR, Hexokinase, Parkinson's disease.

Contenido

1. Capítulo 1	2
1.1 Introducción.....	2
1.2 Problema.....	3
1.3 Justificación.....	4
2. Capítulo 2	6
2.1 Enfermedad de Parkinson	6
2.1.1 2.1.1. Genética de la EP	7
2.2 Receptores tirosina quinasa	8
2.3 Vías de supervivencia celular	11
2.3.1 PI3K/AKT.....	11
2.3.2 MAPK	14
2.4 PARKIN (PARK2).....	16
2.4.1 Neuroprotección mediada por PARKIN.....	20
2.5 PINK1 (PARK6).....	21
2.5.1 Neuroprotección mediada por PINK1.....	23
2.6 Hexoquinasa	25
2.6.1 Neuroprotección mediada por Hexoquinasa	27
2.7. Ceramida	28
2.8. Células CAD	30
3. Capítulo 3	32
3.1. Objetivo General	32
3.2. Objetivos específicos	32
4. Capítulo 4	33
4.1. Cultivos Celulares	33
4.2. Transducción y establecimiento de las líneas celulares con disminución permanente de la expresión de Pink1 y Parkin	33
4.3. Conteo celular	35
4.4. Viabilidad celular.....	36
4.5. Transformación de <i>E.coli</i> JM109 con el plásmido para la sobreexpresión de hexoquinasa	37
4.6. Purificación de los plásmidos para la sobreexpresión de hexoquinasa.....	37
4.7. Extracción y cuantificación de proteínas.....	38
4.8. Electroforesis en SDS-PAGE	38
4.9. Detección de proteínas por Western blot.....	39
4.10. Actividad hexoquinasa, IGF1R e IR	40

4.11.	Inmunofluorescencia.....	41
4.12.	Distribución mitocondrial y potencial de membrana mitocondrial con JC-1. ...	42
4.13.	Análisis estadístico	43
5.	Capítulo 5.....	45
5.1.	Resultados	45
5.1.1.	La disminución de la expresión de Pink1 y Parkin reduce la viabilidad celular y aumenta la vulnerabilidad al daño inducido por C2-ceramida.....	45
5.1.2.	La disminución de la expresión de Pink1 y Parkin altera la activación de los receptores tirosina quinasa (RTKs).	48
5.1.3.	La disminución de la expresión de Pink1 y Parkin reduce la activación de vías de supervivencia celular	50
5.1.4.	La disminución de la expresión de Pink1 y Parkin induce cambios en la distribución y función mitocondrial.....	52
5.1.5.	La disminución en la expresión de Pink1 y Parkin altera los niveles, localización y actividad de la HKI	54
5.1.6.	La Sobreexpresión de HK recupera la viabilidad en células CAD-shPink1.....	56
5.2.	Discusión	58
6.	Capítulo 6.....	64
6.1.	Conclusiones.....	64
6.2.	Perspectivas.....	64
7.	Bibliografía	66

Lista de figuras

Pág.

Figura 1. Homología de Receptor de Insulina - Receptor de IGF-1 y unión de sus ligandos.....	10
Figura 2. Proteínas asociadas a la EP y la vía PI3K/AKT.....	13
Figura 3. La vía de señalización MAPK.....	15
Figura 4. Función de la vía MAPK en EP.....	16
Figura 5. Mecanismo bioquímico, mutaciones y estructura de Parkin.....	19
Figura 6. Modelo estructural de Pink1.....	22
Figura 7. Modelo estructural de Hexoquinasa I.....	26
Figura 8. Funciones antiapoptóticas de la hexoquinasa mitocondrial.....	28
Figura 9. Morfología de las Células CAD.....	31
Figura 10. Establecimiento de las 3 líneas celulares.....	46
Figura 11. Efecto de la disminución de Pink1 en shParkin y Parkin en shPink1.....	47
Figura 12. La disminución de la expresión de Pink1 y Parkin disminuye la supervivencia celular.....	48
Figura 13. La disminución de la expresión de Pink1 y Parkin altera los niveles y activación de IGF-1R.....	49
Figura 14. La disminución de la expresión de Pink1 y Parkin altera los niveles y activación del Receptor de Insulina.....	50
Figura 15. Efecto de la disminución de la expresión de Pink1 sobre la fosforilación de AKT, ERK y GSK3 β	51
Figura 16. Efecto de la disminución de la expresión de Parkin sobre la fosforilación de AKT, ERK y GSK3 β	52
Figura 17. La disminución de la expresión de Pink1 y Parkin cambia la distribución mitocondrial.....	53
Figura 18. La disminución de la expresión de Pink1 y Parkin altera el $\Delta\psi_m$	54
Figura 19. La disminución de la expresión de Pink1 y Parkin altera los niveles de HKI...55	55
Figura 20. La disminución de la expresión de Pink1 y Parkin altera la localización y actividad de la HKI.....	56
Figura 21. La sobreexpresión de hexoquinasa rescata la viabilidad celular en shPink1..57	57
Figura 22. La sobreexpresión de hexoquinasa no rescata la viabilidad celular en shParkin.....	58
Figura 23. Modelo propuesto de la participación de Pink1 y Parkin en la supervivencia celular.....	63

Lista de tablas

	<u>Pág.</u>
Tabla 1. Loci genéticos y genes asociados con formas monogénicas de la EP.....	8
Tabla 2. Sustratos de Parkin.	18
Tabla 3. Genes de hexoquinasa en el genoma humano.....	25
Tabla 4. Secuencias de los constructos de shRNA para Pink1.....	34
Tabla 5. Dosis de los antibióticos de selección en células CAD	34
Tabla 6. Anticuerpos empleados para los ensayos de Western Blot.....	40

Lista de abreviaturas

°C: Grados centígrados

Arg: Arginina

ATP: Adenosina Tri-fosfato

ADP: Adenosina Di-fosfato

CAD: Células CATH.a diferenciadas

CCCP: Carbonyl cyanide 3-chlorophenyl hydrazone

Cer: C2-Ceramida (N-Acetyl-D-sphingosine)

CL: Cuerpos de Lewy

Cys: Cisteína

Cytc: Citocromo C

DE: Desviación estándar

D-MEM/F12: Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12

DIL: Disquinesia inducida por L-DOPA

DMSO: Dimetil sulfóxido

EA: Enfermedad de Alzheimer

EP: Enfermedad de Parkinson

ERO: Especies reactivas de oxígeno

FK: Forskolina

GBA: Glucocerebrosidasa

Glc: Glucosa

Glc-6-P: Glucosa 6 fosfato

GSK3 β : Glycogen synthase kinase 3 β

HK: Hexoquinasa

IGF-1: Factor de crecimiento similar a la insulina recombinante

IGF-1R: Receptor del factor de crecimiento semejante a la Insulina Tipo 1

IR: Receptor de insulina

KDa: Kilodaltons

LDH: Lactato deshidrogenasa

L-DOPA: L-dihidroxifenilalanina, levodopa

Lys: Lisina

MAPK: Quinasas activadas por mitógenos (del inglés *Mitogen activated protein kinase*).

MFN: Mitofusina

NT-3: Neurotrofina-3

Nurr1: Receptor nuclear asociado 1

PBS: Tampón fosfato salino

PD: Parkinson's Disease

PI3K: Fosfatidil Inositol 3 quinasa

Pi: fosfato inorgánico

PLD: Poli-D-Lisina

PTEN: Fosfatasa y homóloga de tensina (del inglés *Phosphatase and tensin homolog*)

RTKs: Receptores tirosina quinasa

SFB: Suero fetal bovino

ShControl: Células CAD transducidas con la secuencia control.

ShParkin: Células CAD con disminución permanente de la expresión de Parkin

ShPink1: Células CAD con disminución permanente de la expresión de Pink1

SNC: Sistema nervioso central

SN: Sustancia nigra

SUP: Sistema ubiquitina proteasoma

TH: Tirosina hidroxilasa

Thr: Treonina

TM: Dominio transmembrana

Tyr: Tirosina

WB: Western blot

UBL: Dominio UBL (del inglés *ubiquitin-like*)

$\Delta\psi_m$: Potencial de membrana mitocondrial.

1. Capítulo 1

1.1 Introducción

La enfermedad de Parkinson (EP) es un desorden neurodegenerativo, caracterizado por la pérdida progresiva de neuronas dopaminérgicas en la sustancia nigra (SN). La EP presenta una alta heterogeneidad clínica, etiológica y genética. La EP es considerada como el segundo trastorno neurodegenerativo más común después de la enfermedad de Alzheimer (EA).

En Colombia la padecen unos 230.000 individuos y su tendencia es al aumento debido al envejecimiento de la población. Aunque la EP parece ser esporádica en la mayoría de los casos, los estudios genéticos han identificado ciertos genes asociados a formas mendelianas autosómica recesiva o dominante. Parkin ha sido descrito como el primer gen asociado a EP juvenil autosómico recesivo (PARK2) el cuál codifica para una E3 ubiquitina ligasa y una de sus funciones es la de marcar las mitocondrias disfuncionales para su degradación a través de VDAC (canal aniónico dependiente de voltaje); Pink1 fue descrito como el tercer gen (PARK6) asociado a EP juvenil de herencia autosómica recesiva, cuyo transcrito codifica para una proteína asociada a procesos de homeóstasis mitocondrial (fisión, fusión, mitofagia) y vías de supervivencia neuronal como PI3K/AKT. Adicionalmente se ha evidenciado la participación de PINK1 y PARKIN en el metabolismo glucolítico a través de la hexoquinasa (HK), sin embargo los mecanismos moleculares y el papel de dicha interacción se desconoce.

Con el objetivo de continuar aportando al conocimiento de la función que desempeñan los genes Pink1 y Parkin y su relación con el metabolismo de la glucosa y la activación de vías de supervivencia neuronal, en el presente proyecto se crearon 3 líneas celulares: una línea con la disminución permanentemente de la expresión de los genes Pink1, otra de Parkin y una línea control, a las cuales se les

evaluó: 1) la viabilidad celular mediante ensayos de WST y LDH; 2) activación de vías de supervivencia (PI3K/AKT, MAPK y HK) midiendo la fosforilación de AKT (Ser 473), Erk1/2 (Tyr 202/204) y los niveles de expresión de HKI mediante western blot (WB); 3) la regulación de un sustrato de estas vías mediante WB como es GSK3 β fosforilado en su serina 9; 4) expresión y fosforilación de los receptores tirosina quinasa (RTKs): IGF-1R e IR por medio de WB; 5) la actividad HK usando ensayos bioquímicos; 6) localización de los RTKs y HK mediante microscopia confocal y 7) función y distribución mitocondrial mediante ensayos de fluorimetría con JC-1 (indicador del estado de potencial de membrana mitocondrial) y mitotracker red por microscopia confocal.

1.2 Problema

La EP es un trastorno degenerativo del sistema nervioso central (SNC) que se caracteriza por la degeneración progresiva de neuronas dopaminérgicas de la SN, presencia de CL y disfunción motora. Esta patología afecta al 1% de la población general mayor de 65 años y al 4% de los mayores de 85 años. La fundación para la EP de los Estados Unidos señaló que afecta más de 10 millones de personas en todo el mundo y según la Liga Colombiana de Parkinson cerca de 230.000 personas la padecen en Colombia.

Aunque son muchos los estudios desarrollados para tratar de explicar la muerte selectiva de las neuronas dopaminérgicas en la EP, no es claro y existe controversia sobre el mecanismo fisiopatológico que conduce a la pérdida de esta población neuronal. Sin embargo, estudios de los genes asociados a la EP, entre estos Parkin y Pink1, han identificado a la mitocondria y su dinámica como un organelo clave para el esclarecimiento de esta patología.

Por otro lado varios estudios metabólicos en enfermedades neurodegenerativas como EP han resaltado la importancia de la HK mitocondrial y sus efectos anti-apoptóticos. Aunque no se conoce la relación entre Pink1, Parkin y HK, algunos estudios señalan que Parkin y Pink1 tiene un papel potencial en el metabolismo de la glucosa. Por lo tanto este proyecto evaluó el efecto de la

disminución de la expresión de Pink1 y Parkin sobre vías de supervivencia y su relación con HK en un modelo de neuronas dopaminérgicas.

1.3 Justificación

La EP se caracteriza por su heterogeneidad clínica, etiológica y genética (1). Aunque en la mayoría de los casos parece ser esporádica, estudios genéticos han identificado ciertos genes que causan formas familiares de la enfermedad que presentan herencia autosómica dominante o autosómica recesiva. Aproximadamente 5-10% de los pacientes con el cuadro clínico de la EP portan una mutación en uno de los genes conocidos que causan formas monogénicas (4-6). Dentro de las formas monogénicas de herencia autosómica recesiva de inicio temprano en la EP han sido asociadas mutaciones en los genes Pink1 y Parkin (14,29).

El gen PINK1 codifica una proteína importante en la regulación de la dinámica mitocondrial asociada con vías de supervivencia como PI3K/AKT, por lo cual se le ha atribuido una función neuroprotectora (72). Así mismo otros estudios la señalan como una proteína importante en el metabolismo de glucosa y parece tener una función clave en diabetes (138). De igual forma Parkin parece tener una relación con la actividad glucolítica a través de la regulación de p53 y se ha señalado como neuroprotectora por su capacidad para ubiquitinar neurotóxicos intrínsecos, disminuir la carbonilación y nitrosilación de proteínas, incrementar la actividad proteosomal y regular positivamente la vía PI3K/AKT (96, 123-125).

Varios estudios en pacientes con EP han identificado alteraciones en el receptor de insulina y algunos transportadores de glucosa, lo cual sugiere que estas anomalías pueden preceder a la muerte de las neuronas dopaminérgicas. Por otro lado se ha identificado que la proteína HK, una enzima clave en el metabolismo glucolítico, es capaz de unirse a la mitocondria y puede producir efectos anti-apoptóticos (57-60). También se ha visto una relación entre el incremento de la expresión de HK y la supervivencia celular en diferentes tipos celulares (173). En este sentido es clave desarrollar estudios que permitan establecer una relación

entre el metabolismo de la glucosa, la activación de los receptores tirosina quinasa y su relación con Pink1 y Parkin.

El poder conocer la función que desempeñan estas proteínas y su relación con el metabolismo glucolítico en neuronas dopaminérgicas, representa un nuevo reto para la investigación en EP. Así mismo los hallazgos relacionados con la disminución de Pink1 y Parkin sobre los RTKs abren paso al desarrollo de nuevos blancos terapéuticos que favorezcan la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas.

2. Capítulo 2

Estado de Arte

2.1 Enfermedad de Parkinson

La EP es el segundo trastorno neurodegenerativo más común después de la EA (1). Fue descrito por primera vez en 1817 por James Parkinson, y se caracteriza por seis síntomas particulares: temblor, rigidez o agarrotamiento de las extremidades y el tronco, bradicinesia o lentitud en los movimientos, pérdida de reflejos posturales, postura flexible y el fenómeno de congelación (cuando los pies están transitoriamente "pegados" al suelo); sin embargo, estos síntomas sólo se manifiestan cuando se ha perdido el 70-90% de las neuronas dopaminérgicas en la SN (2, 3).

Los criterios diagnósticos de la EP se fundamentan en la presencia de los síntomas cardinales motores tales como: Acinesia, Rigidez, temblor, Inestabilidad postural y trastornos de la marcha, adicionalmente se han identificado síntomas no motores, los cuales preceden a la clínica motora y son considerados una parte integral de la enfermedad además de estar relacionados con la toma de medicación dopaminérgica. (2). Dentro de los síntomas no motores se encuentra: a) la prevalencia acumulada de demencia a lo largo del curso de la EP entre el 60 y el 83%, con una prevalencia puntual de hasta el 30%, b) depresión, ansiedad, psicosis, apatía y fatiga, c) trastorno del control de los impulsos y conductas compulsivas y d) varios síntomas disautonómicos (estreñimiento, disfunción urogenital, hipotensión postural, hipersudoración, hipersialorrea y náuseas) (3).

La EP puede aparecer a cualquier edad, pero es más común en adultos mayores. La edad promedio de aparición de la enfermedad es entre los 60 y 80 años; afecta al 1% de la población general mayor de 65 años y al 4% de los mayores de 85 años (4-6). La Fundación para la Enfermedad de Parkinson (Estados Unidos) señala que la EP afecta más de 10 millones de personas en todo el mundo. En Europa cerca de 1,2 millones de personas padecen EP (Fundación Europea para la Enfermedad de Parkinson) mientras en Colombia la Liga Colombiana de Parkinson asegura que cerca de 230.000 personas padecen EP.

El sello neuropatológico de la EP es la pérdida selectiva de neuronas dopaminérgicas en la SN y la formación de inclusiones intracelulares denominadas CL en las células restantes (7, 8). La EP presenta una heterogeneidad clínica, etiológica y genética. En la actualidad se cree que la enfermedad es consecuencia de una combinación de susceptibilidad genética, algunas características innatas de la vía nigroestriatal, exposición a factores de riesgo medio ambientales, la combinación de los cuales es importantes en la etiología de esta compleja enfermedad (9, 10).

2.1.1. Genética de la EP

Estudios genéticos han reportan alrededor de 19 genes asociados a EP, los cuales han sido designados en secuencia cronológica (PARK1 – PARK19). Estos estudios revelan que cerca del 10% de los pacientes con EP son de origen familiar y presentan herencia autosómica dominante o autosómica recesiva; sin embargo, la mayoría de casos son de tipo esporádico (11) (Tabla 1). Las mutaciones en estos genes asociados a EP generalmente conducen a una pérdida de la función de las proteínas que codifican y están asociadas a varias vías patogénicas, entre las más importantes se encuentran el estrés oxidativo, la disfunción mitocondrial, alteración en el sistema ubiquitina proteosoma, alteración de la actividad quinasa, desregulación de vías de supervivencia celular, cambios en el metabolismo energético (12, 13) entre otros.

Locus/Genes	Herencia	Referencias
PARK1/ SNCA (4q21)	AD	(14, 15)
PARK2/ PARKIN (6q25.2–27)	AR	(16-23)
PARK3/Desconocido (2p13)	AD	(24)
PARK4/ Desconocido (4p15)	AD	(25)
PARK5/ UCHL1 (4p14)	AD	(26-28)
PARK6/ PINK1 (1p35–36)	AR	(29-31)
PARK7/ DJ-1 (1p36)	AR	(32, 33)
PARK8/LRRK2 (12q12)	AD	(34, 35)
PARK9/ ATP13A2 (1p36)	AR	(36, 37)
PARK10/Desconocido (1p32)	ND	(38)
PARK11/ GIGYF2 (2q36–37)	AD	(39)
PARK12/Desconocido (Xq21)	Ligada X	(40)
PARK13/ Omi/HTRA2 (2p12)	ND	(41)
PARK14/ PLA2G6 (22q13.1)	AR	(42)
PARK15/FBXO7 (22q12-q13)	AR	(43)
PARK16/Desconocido(1q32)	ND	(42)
PARK17/MAPT	ND	(44)
PARK18/Desconocido	ND	(44)
PARK19/GBA (1q21–22)	ND	(45)

Tabla 1. Loci genéticos y genes asociados con formas monogénicas de la EP.

AR: Autosómica Recesiva, AD: Autosómica Dominante, ND: No determinada

2.2 Receptores tirosina quinasa

Los receptores tirosina quinasa (RTKs) se componen de una porción extracelular que se une a ligandos polipépticos (factores de crecimiento tipo insulina (IGF-1, IGF-II) e insulina), una hélice transmembrana y una porción citoplasmática que tiene actividad catalítica tirosina quinasa. Gran parte de los RTKs se encuentran como cadenas polipeptídicas sencillas y son monoméricos en ausencia del ligando. Por su parte el receptor de insulina (IR) se caracteriza por tener dos subunidades α (130 kDa) unidas entre sí por puentes disulfuro para formar el holoreceptor heterodímero $\alpha_2\beta_2$ y dos subunidades β (95 kDa) que atraviesan la membrana y contienen la actividad tirosina quinasa. Varios estudios han evidenciado un alto grado de homología entre IR e IGF-1R (46, 47) (Figura 1).

La activación de las RTK requiere de dos procesos importantes: la potenciación de la actividad catalítica tirosina quinasa y la creación de sitios de unión para reclutar proteínas de señalización. Una vez el ligando se une a IR o IGF-1R, se produce un cambio conformacional del receptor, el cual se dimeriza y

autofosforila en los residuos de tirosina de la parte citoplasmática en la subunidad β . La unión de insulina e IGF-1 a su receptor conduce a la fosforilación de varios sitios en el dominio citoplasmático del receptor. En total siete residuos tirosina de IR se han identificado fosforilados en respuesta a insulina: dos tirosinas (Tyr965 y Tyr972) que se encuentran en la porción yuxtamembrana, tres tirosinas (Tyr1158, Tyr1162 y Tyr1163) que se localizan en la región de activación del dominio quinasa (DK) y las dos restantes (Tyr1328 y Tyr1334) están ubicadas cerca del extremo C-terminal (48). En la unión de IGF-1 a su receptor se han identificado seis residuos tirosina : una tirosina (Tyr980) en la porción yuxtamembrana, cuatro tirosinas (Tyr1131, Tyr1135, Tyr1136 y Tyr1161) que se localizan en la región de activación del DK y una (Tyr1316) en el extremo C-terminal (49) (la numeración corresponde a la secuencia aminoacídica de la subunidad β de IR e IGF-1).

Posterior a la autofosforilación de los receptores se fosforilan las tirosinas de sus principales sustratos, como IRS (del inglés *Insulin Receptor Substrate*), lo cual permite la interacción con proteínas que contienen el dominio 2 de homología a SRC (SH2). Estas proteínas incluyen a la p85, subunidad reguladora de la PI3K, la GRB2 (del inglés *guanin-nucleotide exchange protein*) o GAP (del inglés *Ras-binding protein*)(50), aunque varios estudios reportan que SHC pueden ser fosforiladas directamente por el IGF-1R. La activación de IRS-1 y SH2 inician varias cascadas de señalización intracelular que se agrupan en dos vías principales: PI3K/AKT y MAPK (51).

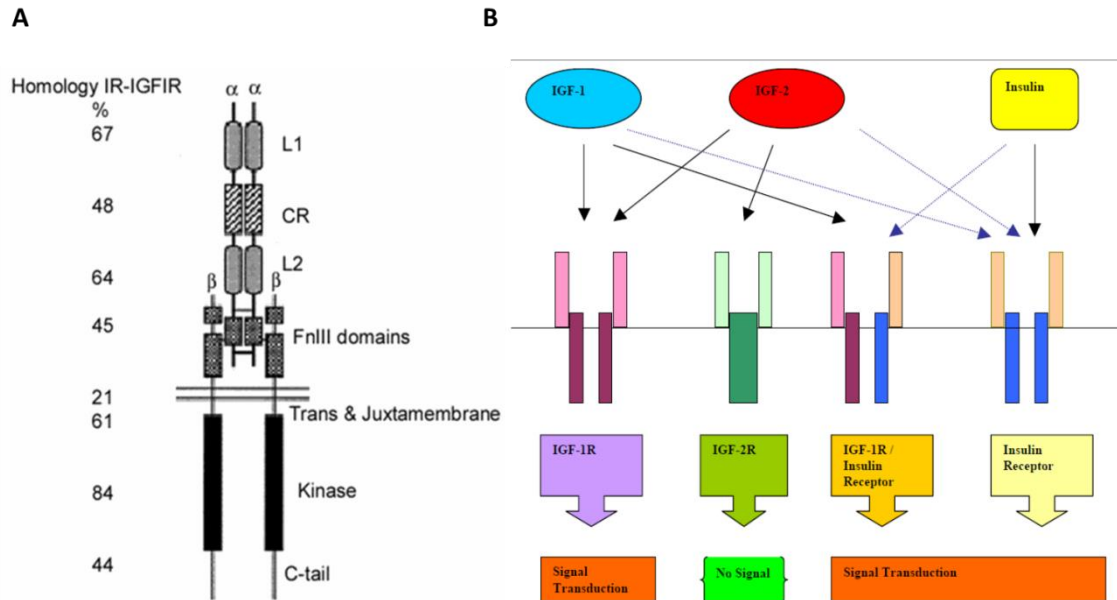


Figura 1. Homología de Receptor de Insulina - Receptor de IGF-1 y unión de sus ligandos.

A) Porcentaje de homología entre los dominios del IR e IGF-1. Porción intracelular: dominios ricos en leucinas L1 (67%) y L2 (64%), dominio rico en cisteínas (48%), tres dominios de tipo fibronectina III (45%). Porción intracelular: dominio transmembrana (21%), dominio yuxtmembrana (61%), dominio tirosina quinasa (84%) y el extremo C-terminal (44%). **B)** IGF-2R funciona como un sitio de aclaramiento de IGF-2, mientras que IR e IGF-1R son homólogos y forman hemi-receptores (IGF-1R/IR). IGF-1 se une a IGF-1R e IGF-1R/IR y solo en altas concentraciones a IR. IGF-2 se une a IGF-1R, IGF-2R y a IR durante el desarrollo fetal temprano. La insulina se une a IR y a altas concentraciones a IGF-1R/IR. La activación de IR, IGF-1R/IR y IGF-1R activa varias vías corriente abajo (PI3K/AKT y MAPK); sin embargo, la activación de IGF-2R no activa ninguna señal. Tomado de Nakaey Wu 2011 (46).

Los RTKs como IGF-1R e IR controlan la activación de varias vías de señalización vitales en la función cerebral tales como proliferación, diferenciación, crecimiento, metabolismo energético, neuroprotección y neurogéneración (52-54). Estudios post-mortem en pacientes con EA han reportado alteraciones en los niveles y distribución de IGF-1R e IR, disminución de la IGFBP-2 (del inglés *insulin-like growth factor binding protein 2*) y reducción en los niveles de IRS-1 e IRS-2. Estas evidencias contribuyen a entender las alteraciones en la activación de vías de supervivencia PI3K/AKT y MAPK y apoyan la hipótesis de la EA como una “diabetes tipo 3” específica del cerebro (55, 56).

Por su parte los estudios en EP han mostrado una reducción en la expresión de insulina e IGF-II en la sustancia blanca y la amígdala y un incremento de IGF-1 en la corteza frontal. Además señalan una reducción de los niveles de IR en la sustancia gris, una disminución de IGF-IR e IGF-IIR en la corteza frontal y la amígdala. La disminución de NGF (del inglés *Nerve growth factor*), BDNF (del inglés *Brain-derived neurotrophic factor*) y sus receptores tirosina quinasa A (TrkA) y receptor de neurotrofina p75 (p75) son otros factores que se han sumado a esta patología. Adicionalmente los pacientes con EP han mostrado alteraciones del metabolismo de la glucosa (57-60) aunque estos estudios no han permitido esclarecer los mecanismos moleculares alterados EP.

2.3 Vías de supervivencia celular

Varios estudios en EP han reportado la alteración de las vías como PI3K/AKT y MAPK y su relación directa con diversos procesos como la respiración y transporte mitocondrial, eventos de fisión-fusión mitocondrial, regulación de los niveles de calcio, producción de especies reactivas de oxígeno (ERO), autofagia y apoptosis (61, 62).

PI3K/AKT

En neuronas la activación de la vía PI3K/AKT es muy importante en el mantenimiento de la supervivencia celular, inhibiendo vías apoptóticas y regulando vías adicionales de señalización celular (63). Esta vía puede ser activada por factores de crecimiento como NGF, BDNF, GDNF (del inglés *Glial cell line-derived neurotrophic factor*), neurotrofina 3 (NT-3), IGF-1 e insulina. Una vez estos factores se unen a los RTKs y se produce la fosforilación de IRS-1 en su tirosina 608, IRS-1 puede interactuar con las subunidades reguladoras (p85 α y p85 β) de la fosfatidil inositol-3-quinasa (PI3K) y posteriormente activar su subunidad catalítica (p110). La activación de PI3K inicia la fosforilación de lípidos de inositol para generar 3-fosfoinosítoles: PI-3-fosfato (PIP3P), PI-3,4-bifosfato y PI-3, 4,5- trifosfato. Los PIP3 se unen a dominios homólogos de plequestrina de al menos dos proteínas, la serina/treonina quinasa AKT/PKB y la quinasa dependiente de fosfoinosítidos-1

(PDK-1). PDK-1 fosforila AKT en su residuo de treonina (Thr 308) mientras que su residuo de Serina 473 (Ser473) es fosforilado por el complejo mTORC2(64). Estas fosforilaciones solo ocurren una vez AKT ha sido translocada a la membrana celular a través de su dominio de homología a plequestrina.

La función de supervivencia de PI3K en particular esta mediada por la activación de AKT, la cual tiene múltiples sustratos y se encarga de desactivar por fosforilación mediadores pro-apoptóticas como: Bad, Bax, caspasa-9, GSK- β , p53 y Forkhead; y de activar por fosforilación proteínas anti-apoptóticas como: Bcl-2, Bcl-XI e inhibidores de las proteínas de la apoptosis (65-68).

Los estudios desarrollados en neuronas dopaminérgicas de pacientes con EP han mostrado una disminución de AKT total y fosforilado en su residuo de Ser473 mientras que su activación con IGF-1 e insulina inhibe la pérdida de neuronas dopaminérgica en varios modelos animales de EP y permite la regeneración axonal (69). Además se ha descrito que agentes protectores como 2,3,5,4'-tetrahidroxiestilbeno-2-O- β -D-glucósido (un componente activo del extracto de rizoma de *Polygonum multiflorum*), la cafeína y el IGF-1 median su protección potenciando la activación de la vía PI3/AKT (70, 71).

Frente a los genes asociados a EP y las proteínas para las cuales codifican se ha señalado que Pink1 puede potenciar la fosforilación de AKT frente a un neurotóxico como la ceramida (72); LRRK2 tiene como sustrato fisiológico a AKT1 y mutaciones en esta proteína (R1441C, G2019S y I2020T) inhiben la activación de la vía PI3K/AKT (73). Por su parte los estudios con DJ-1, otra proteína implicada en esta patología, han mostrado que sus mutaciones conducen a deficiencias en la activación de la vía PI3K/AKT y en la respuesta al estrés oxidativo (74, 75) y adicionalmente se ha demostrado que DJ-1 puede inhibir la actividad fosfatasa de PTEN (regulador negativo de la vía PI3K/AKT). Otras proteínas como GBA y FBXO7 también participan en la supervivencia neuronal y evidencian una relación estrecha con la vía PI3K/AKT (Figura 2).

Recientemente se ha resaltado la importancia del equilibrio entre la activación de la AKT y la inhibición de la vía de JNK en el destino celular (muerte o supervivencia) en EP, debido a que AKT regula negativamente la fosforilación y

activación de JNK mediante ASK1 (del inglés *Apoptosis Signal-Regulating Kinase1*) y JIP1 (del inglés *JNK-Interacting Protein 1*) (76). Estos hallazgos convierten a AKT en un excelente blanco terapéutico en enfermedades neurodegenerativas. Sin embargo, se requieren de más estudios que contribuyan a explicar esta relación.

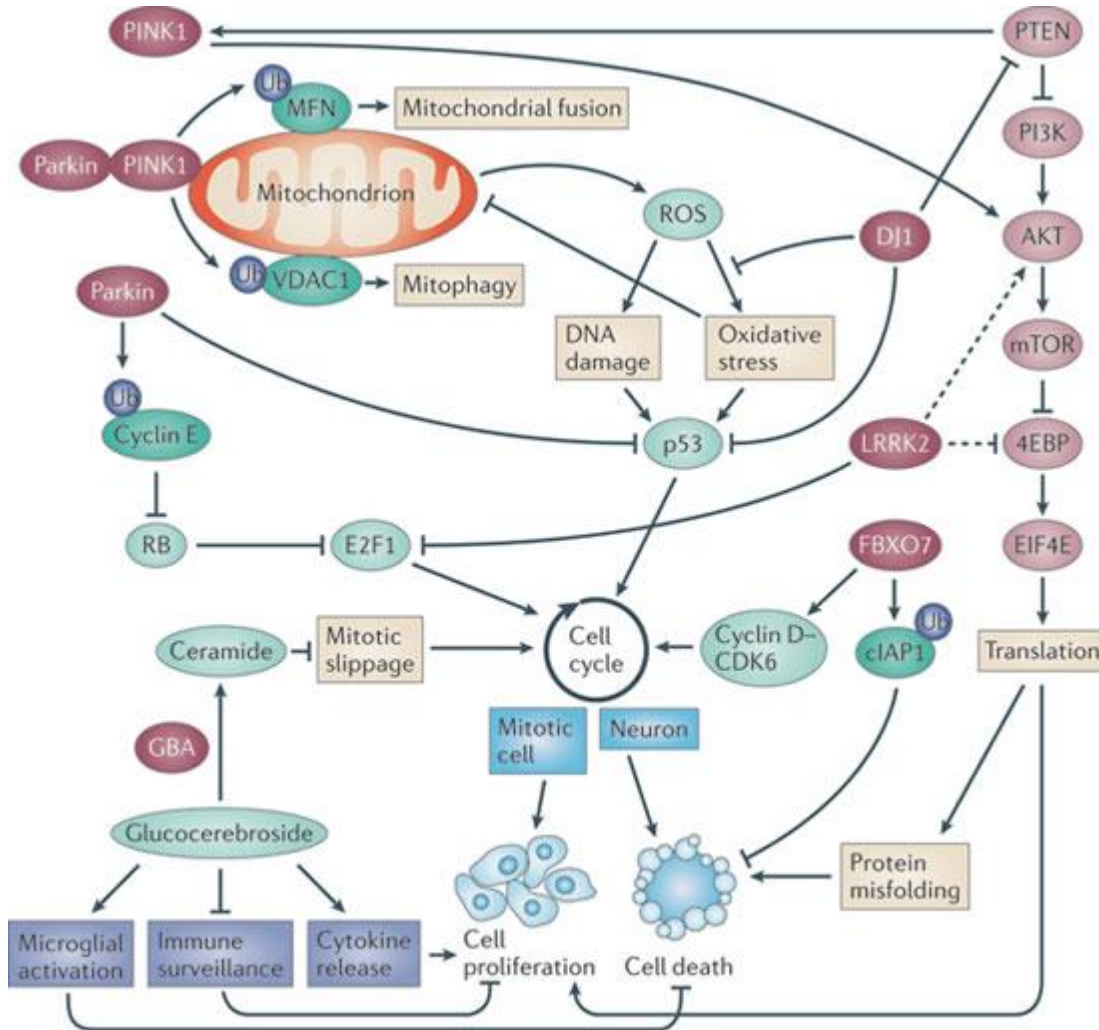


Figura 2. Proteínas asociadas a la EP y la vía PI3K/AKT.

E3 ubiquitina ligasa (Parkin), quinasa 1 inducida por PTEN (PINK1), DJ1, quinasa con repeticiones ricas en leucina 2 (LRRK2), glucocerebrosidasa (GBA) y FBXO7 regulan la supervivencia celular a través de la vía PI3K/AKT. Parkin interactúa con PINK1 para evitar la fusión mitocondrial a través de la degradación de mitofusina (MFN) y regula la mitofagia través de la ubiquitinización de VDAC. Por su parte DJ1 puede reprimir la expresión de p53, minimizar el daño causado por el estrés oxidativo y potenciar la fosforilación de AKT mediante la atenuación de la regulación negativa

PTEN. LRRK2 ayuda a mantener la señalización de mTOR a través de la fosforilación de AKT fosforilando a la proteína de unión a eIF4E (4EBP). GBA cataliza la conversión de glucocerebrosidos a ceramida, evitando así las consecuencias inflamatorias de la acumulación de glucocerebrosidos mientras FBXO7 ayuda a la descomposición del inhibidor de las proteínas apoptóticas (cIAP1). Las mutaciones en estos genes interrumpen los controles y equilibrio en la integridad neuronal. Tomado de Devine 2011(77).

MAPK

La vía MAP quinasas, (de las siglas en inglés *Mitogen-Activated Protein Kinases*) es una ruta de transducción de señal activada por RTKs que participa en múltiples procesos celulares como proliferación, diferenciación y apoptosis, en respuesta a estímulos extracelulares como mitógenos, citoquinas proinflamatorias, estrés celular y factores de crecimiento, mediante la regulación de la expresión génica (78, 79).

En términos generales esta vía se compone de tres enzimas que son activadas en serie: MAP quinasa, MAP quinasa quinasa (MKK, MEK o MAP2K) y MAP quinasa quinasa quinasa (MKKK, MEKK o MAP3K). La familia MAPK de mamífero incluye ERK, p38 y JNK. La vía de señalización de ERK1/2 se activa por la MEK1/2, que se activa por Raf, la cual es activada por el Ras GTPasa y funciona como un interruptor (cuando se encuentra unido GDP su estado es inactivo y cuando está unido GTP se encuentra activo) (80) (Figura 3).

La activación de ERK1/2 regula mediante fosforilación muchos blancos citoplasmáticos y nucleares que controlan funciones biológicas importantes como proliferación, diferenciación y muerte celular (81, 82). Dentro de los mecanismos usados por ERK1/2 para favorecer la supervivencia celular se encuentran la regulación de proteínas pro y antiapoptóticas de la familia Bcl2, además puede favorecer la fosforilación de Bad de forma indirecta al activar RSK (del inglés *Ribosomal S6 Kinase*) y MSK1 (del inglés *Mitogen and Stress Activated Protein Kinase 1*). También puede reprimir la transcripción de factores proapoptóticos como Bim al fosforilar el factor de transcripción FOXO3a (del inglés *Forkhead Box Class 3a*) y favorecer la expresión de proteínas antiapoptóticas como Bcl2, Bcl-xl y MCL1

los receptores de dopamina (DA) pueden regular la señalización de ERK1/2 en DIL (85, 86)(Figura 4).

Por otro lado estudios reportan que la sobreexpresión de DJ-1 activa la vía de señalización de ERK1/2 y de esta manera protegen contra el estrés celular inducido con neurotóxicos e incrementa la expresión de tirosina hidroxilasa mediante la transcripción del receptor nuclear asociado 1 (Nurr1) vía ERK1/2 (87, 88), mientras la sobreexpresión de LRRK2 modula la remodelación de neuritas (89). Esta evidencia señala que la modulación de la señalización de ERK puede ser un potencial blanco terapéutico en pacientes con EP.

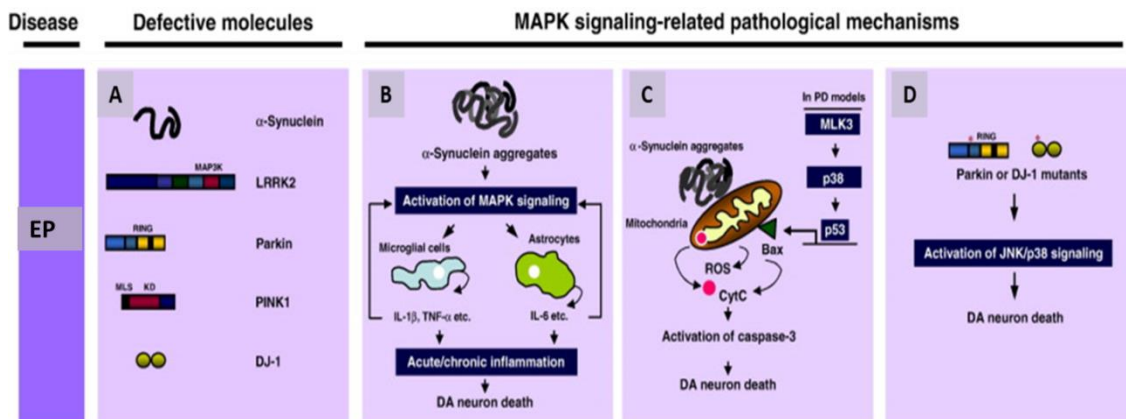


Figura 4. Función de la vía MAPK en EP

A) La EP se ha asociado con defectos funcionales en varios genes que codifican para las proteínas α - sinucleína , LRRK2 , Parkin, PINK1 y DJ-1. **B)** Los agregados de α - sinucleína inducen la producción de citoquinas pro inflamatorias (IL - 1β y TNF- α) en la microglía y astrocitos vía MAPK. **C)** Los agregados de α -sinucleína estimulan la producción de ERO permitiendo la liberación de Citocromo C, desencadenando la activación de caspasas e inducción de apoptosis. **D)** Los mutantes de Parkin y DJ-1 incrementa la activación de vías de señalización de JNK o p38 favoreciendo la activación de apoptosis. Tomado y modificado de Kim y Choi 2010 (84).

2.4 PARKIN (PARK2)

Parkin fue el primer gen identificado para las formas autosómica recesivas de la EP. Esta localizado en el cromosoma 6q25.2-2, contiene 12 exones separados por grandes regiones intrónicas y abarca más de 1.53 Mb (90). Parkin codifica para una proteína de 465 aminoácidos (52 kDa) con un dominio de homología a la

ubiquitina en la porción N-terminal (UBL del inglés *ubiquitin-like*), un dominio específico de Parkin (*linker*), en la región central y tres dominios RING-finger (del inglés *Really Interesting New Gene finger*) (RING0, RING1, RING2) en su extremo C-terminal, separados por un dominio IBR (del inglés *in-between ring*) (Figura 5B). Esta configuración similar con las ubiquitinas ligasas y su interacción con UbCH7, UbCH8, cullin1, FBOX/WD y la subunidad 26S llevó a pensar en su posible función en el sistema ubiquitina proteasoma (SUP) (91, 92).

	Sustratos	Referencia		Sustratos	Referencia
Dominio UBL	UbCH7 y UbCH8	(93)	Dominio LINKER	Miro	(94)
	26S	(95)		p53	(96)
	Cullin1 y FBOX/WD	(97)		PGC-1 α	(98)
	Hexoquinas a	(12)		CDCrel-2	(99)
	26S	(95)		Mitofusina	(100)
	Eps15	(101)		α/β tubulina	(102)
	Endophilin-A	(103)		SEPT4	(99)
	CD36 (FAT)	(104)		sinaptotagmina XI,	(105)
Dominio IBR	20S	(106)		GPR37	(107)
	Sinfilina	(108)		Sudunidad p38 del complejo aminoacil-tRNA sintetasa	(109)
	Pink1	(110)		VDAC	(111)
Dominio LINKER	Sept5	(112)		Septin 4	(113)
	FAF1(Fas-associated factor 1) y Drp1 (dynamin-	(114, 115)		Fbw7 β adaptador para la degradación proteasomal	(116)

	related protein 1)			
	ARTS (proteína pro-apoptica mitocondrial)	(117)		Bax y Bcl-2 (proteínas pro-apoptica) (115, 118)

Tabla 2. Sustratos de Parkin.

Parkin ha sido descrita como una E3 ubiquitina ligasa para la cual se le han identificado cerca de 30 sustratos (Tabla 2) involucrados en múltiples procesos celulares. Su mecanismo de ubiquitinización puede ser explicado en dos pasos: el primero es la transtiolación que consiste en la transferencia de la ubiquitina de la región C-terminal de la E2 ubiquitina ligasa a la cisteína 431 (Cys431) de Parkin mediante un enlace tioester y el segundo es una reacción de transferencia de la ubiquitina desde la cisteína aceptora (Cys431) de Parkin a un grupo amino del sustrato formando un enlace isopeptídico (Figura 5A). Lo anterior demuestra la importancia de la Cys431 en su actividad ubiquitina ligasa y explica la relación de la mutación C431F de Parkin en EP (93, 119, 120).

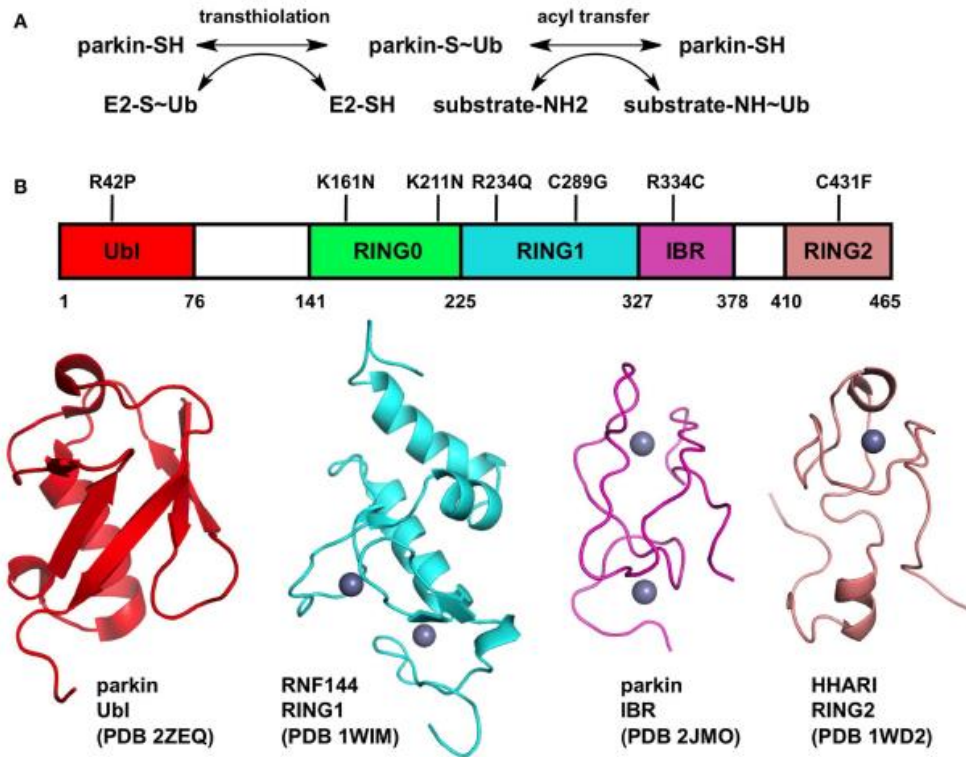


Figura 5. Mecanismo bioquímico, mutaciones y estructura de Parkin.

A) Dos mecanismos para ubiquitinización del sustrato de parkin. **B)** Estructura de parkin y número de mutaciones asociadas a EP: dominio UBL (#41; 32.3%), dominio RING1 (#33; 26%), dominio IBR (#22; 17.3%), dominio RING2 (#13; 10.2%) y C-terminal (#6; 4.7%). Tomado de Trempe y Fon 2013 (121). <http://www.molgen.vib-ua.be/PDMutDB>

Parkin es expresado en cerebro, corazón, hígado, riñón y testículo de ratón (23). Se localiza en el citoplasma pero puede translocarse a núcleo y membrana mitocondrial externa (91, 92). Investigaciones han descrito posibles mecanismos reguladores de la actividad de Parkin: 1) puede ser auto-inhibido en su estado basal por la interacción de su dominio UBL con el dominio C-terminal (RING2); 2) es regulado por modificaciones postranscripcionales como la fosforilación en la Ser 65 del dominio UBL por la quinasa PINK1 (activándolo), mediante fosforilación de Tyr143 por la tirosina quinasa c-Abl (reprimiéndolo) o puede ser inactivado por estrés oxidativo y nitrosilación de sus cisteínas esenciales (Cys431) y 3) puede ser autoubiquitinado. Además se han descrito que BAG5 (del inglés *BCL2 Associated Athanogene 5*) y 14-3-3 η se asocian con Parkin para inhibir su actividad ubiquitina

ligasa, mientras que otra E3 ubiquitin ligasa conocida como Ndrp1 (del inglés *neuregulin receptor degradation protein-1*) favorece su degradación (122).

■ Neuroprotección mediada por PARKIN

Los primeros estudios del efecto neuroprotector de Parkin en neuronas expuestas a estrés celular o neurotóxicos explican que Parkin puede proteger por varios mecanismos: a) Parkin degrada proteínas mutadas y glicosiladas de α -sinucleína (123, 124); b) disminuye las proteínas nitrosiladas e incrementa la actividad proteosomal (125); c) protege a la mitocondria del efecto tóxico de la ceramida (126); d) Parkin regula positivamente la vía de supervivencia PI3K/AKT favoreciendo la degradación de EPS15, una proteína adaptadora relacionada con la endocitosis de EGFR (del inglés *epidermal growth factor receptor*) (127); e) puede actuar como represor transcripcional de p53 (128) y mediar la participación de p53 en el metabolismo de la glucosa (96); f) regula los niveles de PGC-1 α , un regulador de la biogénesis mitocondrial (98); g) ubiquitina varias proteínas proapoptóticas como ARTS, Bax y Bcl-2 (117, 129) y h) participa en la degradación de proteínas alteradas por la oxidación de DA y su metabolismo (130). Tales mecanismos requieren de la actividad ligasa de Parkin pero los mecanismos moleculares exactos que subyacen a estos procesos celulares continúan siendo desconocidos.

A pesar de los controvertidos sustratos de Parkin y su participación en diversos procesos celulares, los estudios de su mecanismo neuroprotector se han centrado en la regulación en la vía bioenergética y el control de calidad de las mitocondrias (131). Se ha descrito que Parkin es una proteína que se encuentra en el citosol y es reclutada por Pink1 a las mitocondrias despolarizadas para activar su degradación por autofagia (mitofagia) (132-134). Inicialmente se describió que Parkin puede ubiquitinar varias proteínas como MFN, Miro y VDAC para favorecer la fragmentación mitocondrial, permitir el reclutamiento de p62 (un receptor de autofagia) y de esta manera regular la mitofagia (135). Además se ha señalado la interacción de Parkin con otras proteínas asociadas a EP como Pink1 y DJ1 las cuales se asocian a MFN para modular la dinámica mitocondrial (136,

137). Recientemente un estudio realizado por McCoy y colaboradores describió la importancia de Pink1 y las hexoquinas I y II para el reclutamiento de Parkin a la mitocondria frente a un daño inducido por CCCP, además la HKI fue descrita como un nuevo sustrato de Parkin (12, 138).

2.5 PINK1 (PARK6)

Pink1 es un gen con 8 exones localizado en el cromosoma 1 (1p35-36) que abarcan 18Kb y codifica para una proteína de 581 aminoácidos (63 kDa). Pink1 (del inglés PTEN-induced putative kinase) fue descubierto por Unoki en el año 2001 y se identificó en el 2004 como el tercer gen asociado a EP juvenil de herencia autosómica recesiva (139). El gen Pink1 es transcripcionalmente activado por fosfatasa y homólogos del gen de la tensina (*Pten*). El transcrito codifica para una proteína con un dominio de localización mitocondrial denominada MTS en su región N-terminal (del inglés *matrix targeting sequence*), seguido de un dominio transmembrana TM (del inglés *transmembrane domain*), un dominio quinasa (DK) serina/treonina y un dominio C-terminal de función desconocida (Figura 6) (121).

Pink1 se expresa ampliamente en tejidos epiteliales y en el SNC. Se localiza en el citoplasma y puede ser translocada a la mitocondria gracias a su dominio TM en su extremo amino terminal donde puede ubicarse en la membrana externa, en la membrana interna o en el espacio intermembranal de la mitocondria (140); sin embargo, aún no están claras las señales que regulan su clivaje y localización en la mitocondria.

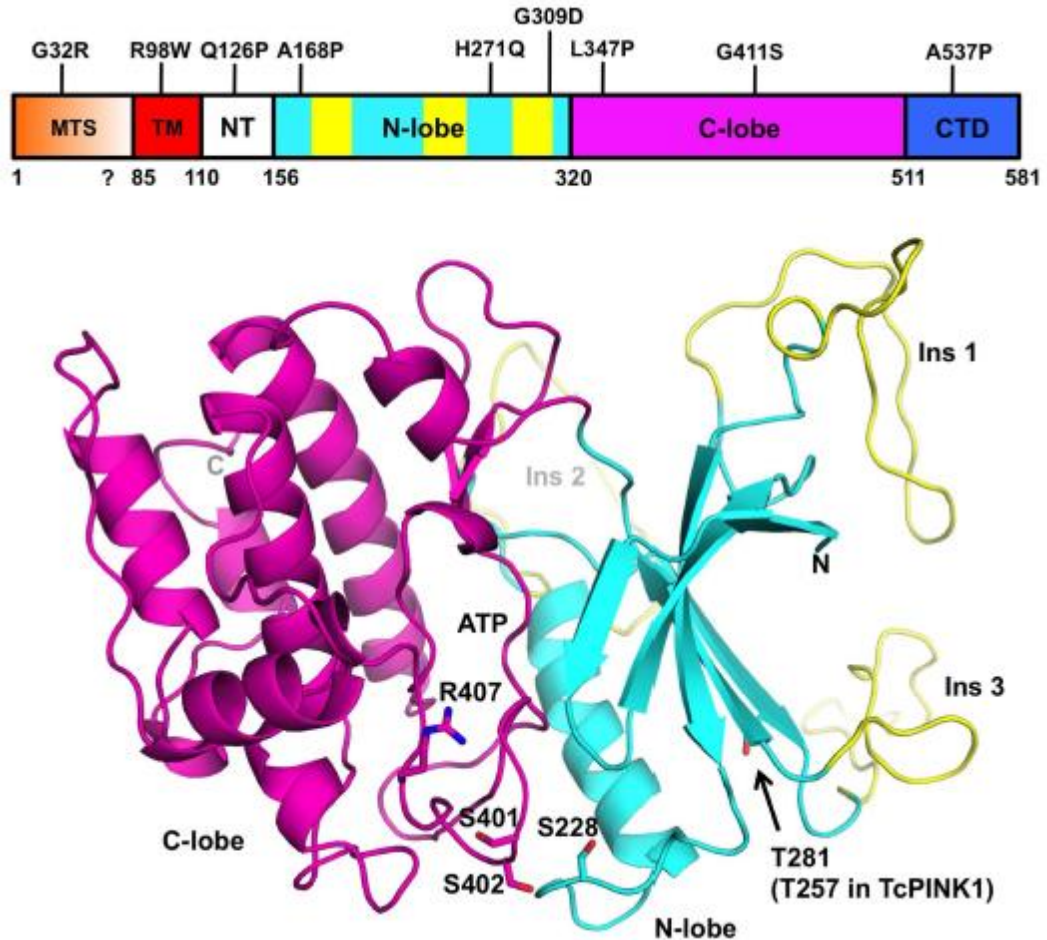


Figura 6. Modelo estructural de Pink1.

Dominios de Pink1 y principales mutaciones asociadas a EP. Dominio mitocondrial MTS (naranja), dominio transmembrana TM (rojo), región reguladora N-terminal NT (blanco), DK que se compone de 2 lobes que contiene los sitios de unión ATP:Mg²⁺ (cian y magenta) y el dominio C-terminal (azul). Los 3 loop de Pink1 son representados en amarillo mientras que los residuos activaciones de loop (Ser401, Ser402, and Arg407) y las 3 sitios de fosforilación (Ser228, Ser402, Thr281) se muestran en barras (mutaciones en estos sitios se han asociado a EP) Tomado de Trempe y Fon 2013 (121).

Frente a la localización subcelular de Pink1 estudios han reportado que su activación depende de su oligomerización, autofosforilación y presencia de Ca²⁺ (12, 138, 141, 142) e indican que Pink1 (63 kDa) es translocado a la membrana mitocondrial interna de mitocondrias sanas formando un gran complejo multimerico de 700 kDa con las translocasas TOM20/TIM23 y allí es clivado por la peptidasa mitocondrial MPP (del inglés *mitochondrial processing peptidase*) y por la proteasa PARL (del inglés *Presenilins-associated rhomboid-like protein*) (143) entre la

alanina 103 y la fenilalanina 104, generando un fragmento de 52 kDa (Pink1 clivado), el cuál es soluble en el citosol y puede ser fácilmente degradado por la proteasa sensible a MG132 (144). Sin embargo, estudios realizados por Becker y colaboradores en el 2012 señalan que Pink1 (63 kDa) y Pink1 clivado pueden acumularse en la membrana mitocondrial externa para fosforilar proteínas citosolicas o de la membrana mitocondrial externa (145), mientras en mitocondrias despolarizadas con CCCP se ha visto que Pink1 puede fosforilar a Parkin en presencia de Ca⁺ para iniciar el proceso de mitofagia. Además se ha descrito que para el regreso de Pink1 al citosol, la chaperona Hsp90 debe interactuar con el DK y debe ocurrir un clivaje en algún sitio cercano al dominio TM (146). Tales indicios nos indican que el procesamiento de Pink1 y su localización son dependientes del estado de la mitocondria. Sin embargo, la función de Pink1 y sus isoformas sigue siendo desconocida.

La identificación de varios sustratos de Pink1 han permitido elucidar acerca de su función: a) el primer sustrato identificado fue la chaperona mitocondrial TRAP1 (del inglés *TNF receptor-associated protein 1*) (147); b) seguido por la proteasa mitocondrial HtrA2/OMI (148); c) se asocia con rictor y activa el complejo mTORC2 (149); d) fosforila a Miro, una proteína involucrada en el transporte axonal de la mitocondria (94); e) interactúa con DJ-1 regulando la degradación de proteínas (150) y con una nueva isoforma de PGC-1 α (35 kDa) regulando la biogénesis mitocondrial en el cerebro (151); f) fosforila a TRAF6, TAK1, Tollip e IRAK1 para regular la activación de NF- κ B (152); y g) fosforila a Parkin en la serina 65 de su dominio UBL (153). Aunque la evidencia señala a Parkin como el principal sustrato de Pink1 se requieren estudios que permitan aclarar la base estructural de la actividad quinasa de Pink1 sobre Parkin.

Neuroprotección mediada por PINK1

Para comprender el papel neuroprotector de Pink1 es importante destacar dos propiedades relevantes. En primer lugar, Pink1 es una quinasa implicada en la transducción y amplificación de las señales intracelulares y puede fosforilar varias proteínas implicadas en la supervivencia celular (61); en segundo lugar, su dominio

de localización mitocondrial lo señala como un regulador potencial de los procesos mitocondriales asociados con la apoptosis, como la cadena de transporte de electrones y la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (154).

PINK1 regula varias vías de señalización como Parkin/quinasa IKB (IKK)/NF- κ B (155); PI3K/AKT (61, 156) y Omi/HtrA2 (66). Además se ha descrito que PINK1 puede fosforilar a TRAP1 para bloquear la liberación de CytC y mantener la integridad mitocondrial (157); puede inhibir la vía JNK mediante la fosforilación de Omi/HtrA2 (158); participa con Parkin en una misma vía para regular la mitofagia (159).

Las mutaciones de Pink1 en pacientes con EP al igual que la deficiencia de Pink1 en modelos celulares y animales causan disfunción mitocondrial y susceptibilidad al estrés inducido por Rotenona y MPP+ (160). Adicionalmente, causa incremento de radicales libres asociados a un menor nivel de glutatión (161), desbalance de la homeostasis de calcio mitocondrial (162), pérdida del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi$ m) (163), disminución en el consumo de oxígeno, deficiencia en la síntesis de ATP, deterioro proteosomal, alteraciones en la morfología mitocondrial (favoreciendo la fragmentación mitocondrial) (131), disminución de los niveles de HKI (lo cual impide la translocación de Parkin a la mitocondria) (138) y disminución de la expresión de EGFR causando defecto de la proliferación celular (151). Tal evidencia señala la importancia de Pink1 en la integridad mitocondrial y su papel clave en la supervivencia celular.

Pink1 también ha sido implicado en la fosforilación de AKT (61, 72, 156), la liberación de DA, la plasticidad del circuito nigroestriado (164) y la sinapsis dopaminérgica (165-167) lo cual resalta su papel en la supervivencia selectiva de neuronas dopaminérgicas. Adicionalmente, se ha observado que la sobreexpresión de PINK1 protege contra la muerte celular inducida por estrés oxidativo dependiente de estaurosporina (168), rotenona (169), ceramida (72), peróxido de hidrógeno, cisplatina, tunicamicina y cloruro de cadmio (149). Por otro lado, otros estudios han señalado que alteraciones en PINK1 puede estar asociado a la diabetes tipo 2. Son muchas las contradicciones relacionadas con la intervención de PINK1 en el proceso de dinámica mitocondrial y se desconoce su participación

en el metabolismo de la glucosa por tanto se requieren más estudios que permitan esclarecer su función protectora y establezcan la relación entre diabetes y neurodegeneración (170, 171).

2.6 Hexoquinasa

La HK es una enzima muy importante encargada de catalizar la conversión dependiente de ATP de glucosa (Glc) a glucosa 6 fosfato (Glc-6-P), la cual participa en varias rutas metabólicas. Existen varias isoformas (HKI, HKII, HKIII y HIV), codificadas por cuatro genes diferentes (Tabla 3). La HKI es la más abundante en el cerebro (172), la HKII se expresa en musculo y tejido adiposo (173), mientras que la HKIII predomina en linfocitos y la HKIV en hígado y tejido pancreático (174).

Los estudios evolutivos han descrito que invertebrados, plantas y hongos expresan una HK de 50 KDa, mientras que los mamíferos expresan una HK de 100 KDa (HKI, HKII y HKIII) y la glucoquinasa (HKIV) de 50 KDa, y han demostrado que la HK de 100 KDa es un producto de duplicación de la HK ancestral de 50kDa (175, 176).

Gen	Cromosoma	Referencia
HK1	10q22	(177)
HKII	2p12	(178)
HKIII	5q35	(179)
HKIV/GCK	7p13	(180)

Tabla 3. Genes de hexoquinasa en el genoma humano

La importancia de la HKI, la cual tiene un Km para glucosa de 0.04 mmol/l y presenta la mayor expresión en neuronas y astrocitos, se debe a que el cerebro consume el 13% de su peso en glucosa y cerca del 40% de toda la glucosa circulante es requerida para su metabolismo energético (172). A cerca de la estructura de HKI, se conoce que posee un dominio catalítico C-terminal (residuo 1-474) y un dominio regulador N-terminal (residuo 475-917) que es sensible a las concentraciones de Glc-6-P y fosfato inorgánico (Pi), e interactúa con la membrana mitocondrial interna (Figura 7) (181).

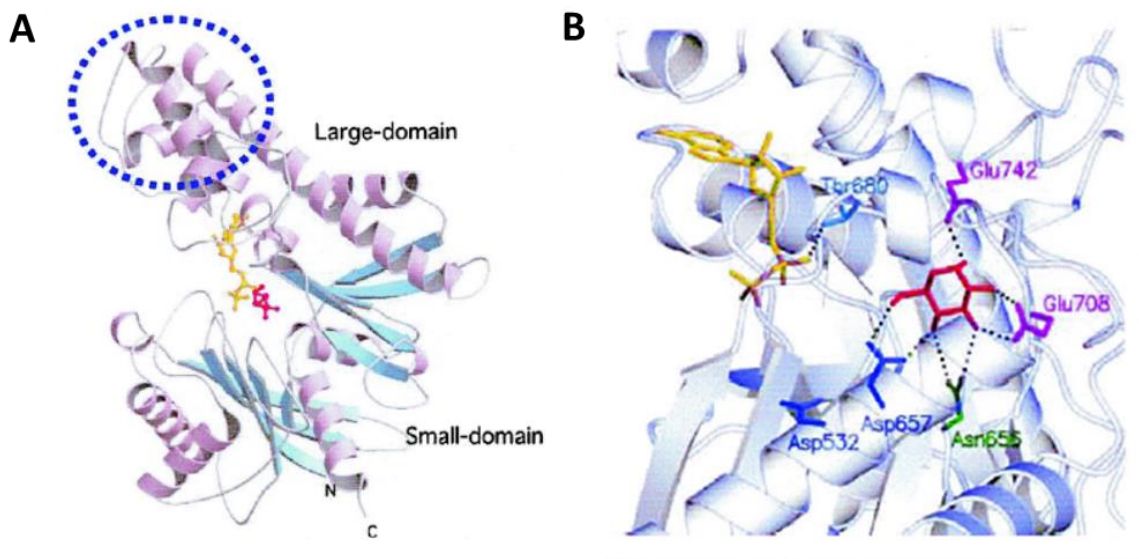


Figura 7. Modelo estructural de Hexoquinasa I.

A) Dominios de la hexoquinasa I: el dominio grande (N- terminal) que contiene sitios de unión a glucosa (rojo) y ATP (amarillo), que contiene un subdominio flexible (encerrado en el círculo azul) y un dominio pequeño (C-terminal). **B)** Sitios de unión de la glucosa y ATP al dominio grande. Las líneas punteadas indican los puentes de hidrogeno. Tomado de Kawai 2005 (182).

Frente a la regulación de la HKI inicialmente se plantearon dos modelos: 1) La Gluc-6-P se une fuertemente como un inhibidor alostérico para el dominio N-terminal, impidiendo la unión de ATP mientras Pi impide dicha inhibición al competir directamente con la Gluc-6-P en la unión al dominio N-terminal; 2) La Gluc-6-P se une fuertemente al dominio C-terminal como un inhibidor del sitio activo y compete directamente con el ATP, mientras Pi se une al dominio N-terminal y estabiliza la unión de ATP al sitio activo (182).

Por su parte Brewster y Altaba propusieron que la expresión de HKI puede ser regulada por Gli2, un factor de transcripción que tiene una función neurogénica potente. Sus estudios del sistema nervioso en embriones de rana revelan que la HKI inicia su expresión en la gástrula media (estado 12 embrionario) lo cual sugiere que el metabolismo de la glucosa coincide con el tiempo de diferenciación neuronal (183).

Recientemente se ha sugerido que Parkin puede ubiquitinar a HKI para regular su actividad (12) y McCoy y colaboradores evidencian la importancia de

HKI y HKII para reclutar a Parkin a la mitocondrias dañadas. Tal controversia resalta la necesidad de desarrollar estudios que permitan esclarecer la regulación de la actividad HK y su relación con la supervivencia neuronal (138).

■ Neuroprotección mediada por Hexoquinasa

Evidencias previas sugieren que la HK juega un papel antiapoptótico cuando está unida a la mitocondria, pues es capaz de inhibir proteínas proapopticas como BAX y BAD (184-188). Wilson y colaboradores demostraron que la HKI se une a la membrana mitocondrial externa a través de dos sitios de unión: un sitio A sensible a tratamientos con Glc6P y un sitio B insensible a Glc6P, en esta unión participa la porina VDAC (175). Por otro lado se ha visto una relación entre el aumento de la expresión de HK II y la supervivencia celular en diferentes tipos de células (184) y se demostró que la sobreexpresión de HKII en neuronas protege contra la muerte celular inducida por rotenona gracias a una mejora en la glicólisis y la unión a mitocondria (189). Además la vía PI3K/AKT también ha sido señalada como reguladora de la función HK y la función mitocondrial, otorgándole una contribución neuroprotectora teniendo en cuenta la vital importancia de la glucosa como fuente energética y de carbono en las neuronas (190) y resaltando que PI3K/AKT regula el metabolismo celular a través de la asimilación, expresión y movilización de los transportadores de glucosa (Glut4 y Glut1)(191, 192).

La HKI se une a VDAC intramitocondrial y acopla directamente la síntesis de ATP con el metabolismo de la glucosa. Kathrin y colaboradores en el 2001 proporcionaron la evidencia de que tal acoplamiento es una función efectora de AKT mediante 3 mecanismos que contribuyen a la supervivencia celular: En primer lugar, AKT aumenta la actividad HK asociada a la mitocondria; en segundo lugar la actividad antiapoptótica de AKT requiere sólo el primer paso del metabolismo de la Glc catalizada por la HK y finalmente la expresión ectópica de la HK imita la capacidad de AKT para inhibir la liberación de cytc. De esta manera AKT aumenta el acoplamiento de metabolismo de Glc a la fosforilación oxidativa y regula la apertura del poro de permeabilidad mitocondrial promoviendo la interacción HK-VDAC en la membrana mitocondrial (Figura 8) (193).

Se tiene poca evidencia acerca de la relación entre la vía MAPK y HK, sin embargo, un estudio realizado por Robey y colaboradores reportan una disminución en la utilización de glucosa en células mesenquimales tratadas con el inhibidor de MEK1/2 (194, 195). Tales investigaciones evidencian la participación de vía MAPK en el metabolismo glucolítico y resaltan la importancia de este tipo de estudios en SNC.

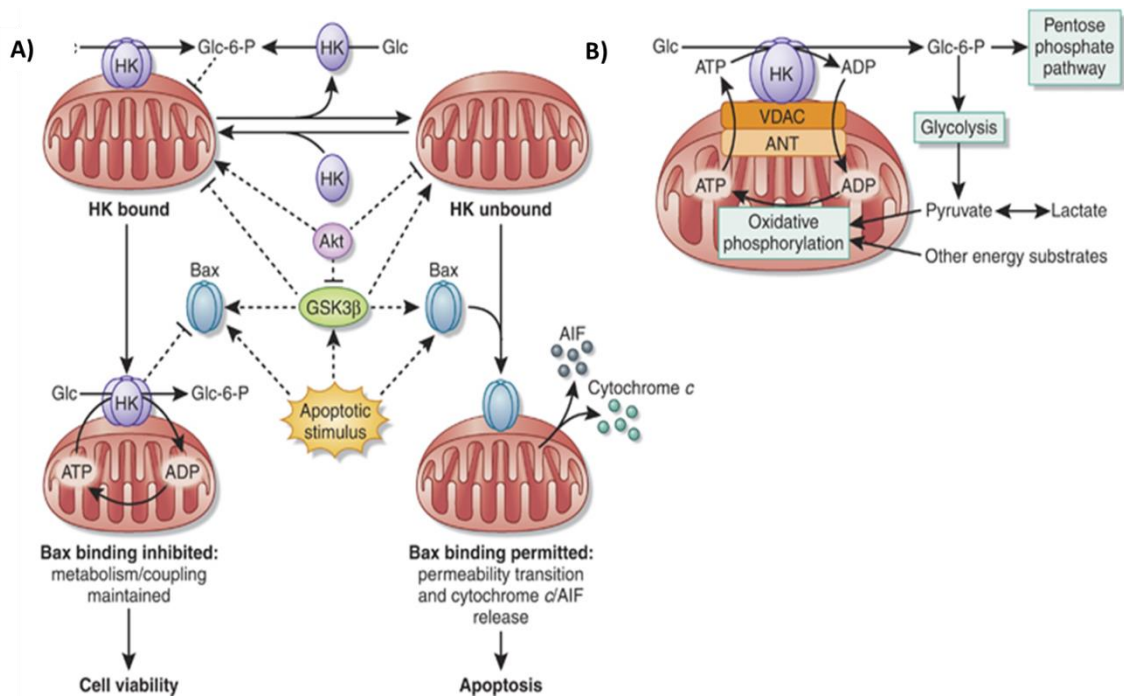


Figura 8. Funciones antiapoptóticas de la hexoquinasa mitocondrial.

A) La hexoquinasa promovida por la fosforilación de AKT impide la translocación de Bax a la mitocondria y favorece la supervivencia celular, mientras la glicógeno sintasa quinasa 3 β (GSK3 β) puede activar la translocación de Bax a la mitocondria permitiendo la liberación de cytc e induciendo la apoptosis. **B)** La HK mitocondrial mantiene la configuración "abierta" de los canales aniónicos dependientes de voltaje (VDAC), para permitir la entrada/salida de metabolitos aniónicos de la mitocondria y acoplar directamente la fosforilación oxidativa con el metabolismo citosólico a través del reciclaje de nucleótidos de adenina (ATP/ADP). Tomado de Robey 2011 (196).

2.7. Ceramida

La ceramida es un segundo mensajero lipídico involucrado en diversas respuestas celulares como proliferación, diferenciación y apoptosis (197). Las

ceramidas son generadas por dos mecanismos enzimáticos: 1) a través de la síntesis de novo en el retículo endoplásmico y aparato de Golgi, iniciando con la condensación de la serina y palmitoil-CoA por la enzima serin palmitoil transferasa (SPT) para producir 3-cetoesfinganina, la cual es reducida a esfinganina y convertida a dihidroceramida por la enzima ceramida sintasa para terminar con la desaturación de la dihidroceramida y formar la ceramida, un precursor para esfingomielina y otros esfingolípidos complejos como cerebrósidos y gangliósidos (198); 2) mediante el ciclo de esfingomielina donde la enzima esfinomielinasa (SMasa) rompe la esfingomielina para formar ceramida y fosforilcolina. La hidrólisis de la esfinomielina es considerada la principal vía para la producción de ceramida como transductor de señales que regulan la muerte celular (199).

El ciclo de la esfingomielina describe el mecanismo por el cual señales de estrés como citoquinas (TNFa, FasL, IL-1), agentes citotóxicos, óxido nítrico (NO), estrés ambiental, son capaces de aumentar los niveles de ceramida (38). Tales estímulos han sido considerados como mediadores de muerte neuronal, por tanto una activación inadecuada del ciclo de la esfingomielina puede contribuir a la neurodegeneración observada en EP (197, 200-203).

El mecanismo de acción de la ceramida es inducir la de-fosforilación de AKT, desencadenando la cascada apoptótica (204). Así mismo, se ha demostrado que la ceramida induce muerte celular por alteración de la función mitocondrial, incluyendo generación de ERO, alteración en la homeóstasis del calcio, colapso del potencial de membrana mitocondrial, liberación de CytC (197, 205), formación directa de poros sobre la membrana mitocondria e inhibición de los complejos I y III de la cadena respiratoria, lo cual la convierte en una excelente toxina para estudiar efectos neuroprotectores (206, 207). La ceramida ha sido propuesta como un camino putativo de muerte neuronal en EP y recientemente como una toxina endógena de neuronas dopaminérgicas (208, 209). Por tanto el grupo de Muerte Celular la ha usado como inductor de apoptosis en la línea catecolaminérgica CAD como modelo de la EP (210).

2.8. Células CAD

Las neuronas dopaminérgicas se caracterizan fenotípicamente por la presencia de tirosina hidroxilasa (TH), la enzima que se encarga de la síntesis de DA, este tipo de neuronas representan el 2.5% de toda la población de neuronas mesencefálicas cultivadas (211, 212), lo cual la convierte en un modelo difícil de manipular en el sentido de lograr obtener una línea celular inmortalizada que contenga una población homogénea de células. Sin embargo, esta investigación utiliza las células CAD, una línea celular aislada de un tumor mesencefálico de ratón transgénico denominada células CATH.a. Las células CAD fueron donadas por la Dra. Chikaraishi DM del departamento de Neurobiología del Duke University Medical Center, Durham, North Carolina al Dr. Gonzalo Arboleda del grupo de muerte celular de la Universidad Nacional de Colombia. Estas células son un modelo bastante útil para estudiar la EP porque expresan las enzimas DA-β-hidroxilasa y TH; sintetizan altos niveles de DA y norepinefrina; Además se caracterizan por expresar proteínas de neurofilamentos, sinaptofisina (213); canales dependientes de voltaje sensibles a corrientes de K⁺, Na⁺ (sensibles a tetrodotoxina) y Ca²⁺ similares a los reportados en otras neuronas, indicando que las poseen una membrana excitable, una propiedad característica de las neuronas (214). Las células CAD cultivadas en medio libre de proteínas y/o SFB (células CAD diferenciadas) detienen su proliferación y empiezan a extender largos procesos (500 a 2.000 μm) similares a neuritas con presencia de varicosidades (215) (Figura 9)

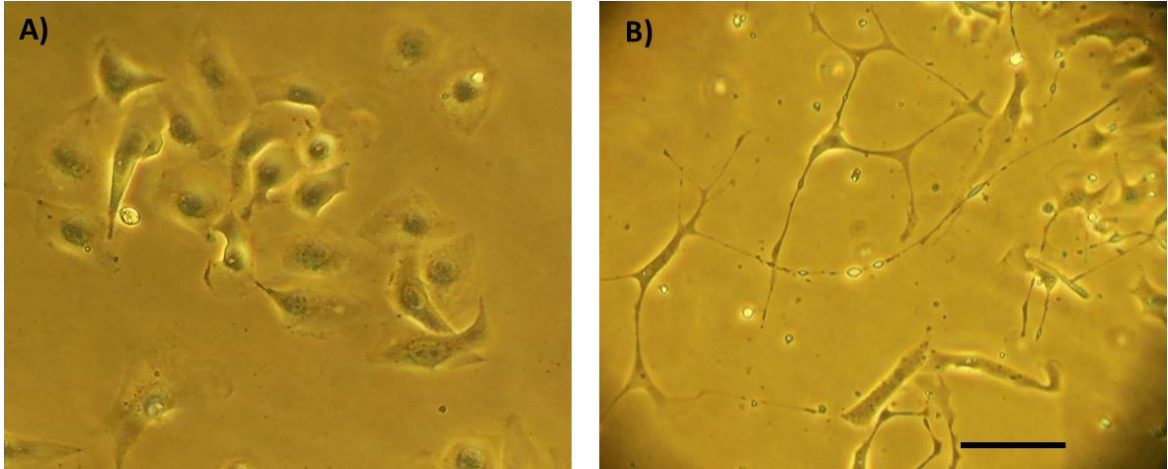


Figura 9. Morfología de las Células CAD.

A) Células CAD creciendo en medio DMEMF12 con 10% SFB. **B)** Células CAD diferenciadas por 4 días en medio DMEMF-12 en ausencia de SFB suplementado con sodio selenita 50 ng/mL, transferrina 1X y 1% de P/S. Barra de escala: 30 µm.

3. Capítulo 3

Objetivos

3.1. Objetivo General

Analizar el efecto de la disminución de la expresión en PINK1 y PARKIN sobre vías de supervivencia mediada por receptores tirosina quinasa en un modelo de neuronas dopaminérgicas.

3.2. Objetivos específicos

Establecer el efecto de la disminución de la expresión de PINK1 y PARKIN en células CAD sobre:

- 1) Viabilidad celular con y sin exposición a C2-Ceramida, IGF-1 e insulina.
- 2) Niveles de expresión y actividad de los receptores IGF-1R e IR.
- 3) Vías de supervivencia celular PI3K/AKT y ERK1/2.
- 4) Distribución mitocondrial y potencial de membrana mitocondrial.
- 5) Niveles de expresión, localización y la actividad de la hexoquinasa.
- 6) Evaluar la viabilidad celular con sobreexpresión de la hexoquinasa.

4. Capítulo 4

Metodología

4.1. Cultivos Celulares

Los cultivos se establecieron a partir de células CAD criopreservadas en el pasaje 15. Las Células CAD fueron cultivadas en medio DMEM/F12 (LONZA, Walkersville, USA), suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (GIBCO, USA), 1% glutamina (2 mM) y 1% penicilina 100 U/mL /estreptomicina 100 ug/mL (P/S) (LONZA, Walkersville, USA) en platos de cultivo estándar a una densidad de 5×10^6 para frascos de 75 cm², 2.5×10^4 por pozo, para placas de 6 pozos y 7×10^3 por pozo para placas de 96 pozos, en una incubadora a 37 °C y una concentración 5% de CO₂. El medio de cultivo fue reemplazado cada 3 días, y al obtener una confluencia aproximada del 80 % se realizaron los subcultivos o pasajes. Para inducir la diferenciación, las células CAD se sembraron en medio DMEM/F12 sin SFB suplementado con sodio selenita 50 ng/mL, transferrina 1X y 1% de P/S por 4 días (medio de diferenciación).

4.2. Transducción y establecimiento de las líneas celulares con disminución permanente de la expresión de Pink1 y Parkin

Para el desarrollo de este estudio, en primer lugar se crearon tres líneas celulares: 1) línea celular con la disminución de la expresión de Pink1 (CAD shPink1) de forma permanente usando dos constructos shRNA pLenti6 (usados individualmente y en conjunto para generar 3 líneas con la disminución de la expresión de Pink1)(Tabla 4) donados por el Dr Marck Cookson del NIH (National Institutes of Health), los cuales cuentan con el gen de resistencia a la blasticidina,

2) línea celular con la disminución de la expresión de Parkin (CAD shParkin) usando un plásmido lentiviral shRNA de la casa comercial Santa Cruz (sc-42159), que contienen el gen de resistencia a la puromicina y 3) la línea celular control (CAD shControl) se generó usando un plásmido lentiviral shRNA de la casa comercial Santa Cruz (sc-108060) que contienen el gen de resistencia a la puromicina.

Constructo	Secuencia
shPink1 A	5'- GCTGGAGGAGTATCTGATAGG-3'
shPink1 B	5'-GGGAGCCATCGCCTATGAAAT-3'

Tabla 4 Secuencias de los constructos de shRNA para Pink1.

Para determinar la dosis del antibiótico de selección de las células transducidas se realizó una curva inicial de blasticidina y puromicina en la línea celular CAD. Se probaron varias dosis de blasticidina y puromicina (0-2-4-6-8-10 µg/ml) durante 14 días para determinar la dosis mínima de los antibióticos de selección capaz de matar el 100% de las células CAD en un periodo de 48-72 horas (Tabla 5).

Línea celular	Antibiótico	Dosis
shControl	Puromicina	3 µg/ml
shPink1	Blasticidina	6 µg/ml
ShParkin	Puromicina	3 µg/ml

Tabla 5. Dosis de los antibióticos de selección en células CAD

Posteriormente se realizó la transducción de las células CAD usando los vectores lentivirales shRNA Pink1, Parkin y Control de la siguiente manera: 1) las células fueron sembradas en DMEMF12 con 10% de SFB a una densidad de 2.5×10^4 por pozo, 2) el siguiente día se removió el medio y se cambió por 700 µl de la solución de transfección, la cual se compone de 2 µg de los plásmidos, 3 µl de Lipofectamina ®2000 (Invitrogen, USA) en Optimen (GIBCO, USA) 3) 6 horas después se adicionó medio DMEMF12 con 10% de SFB y el antibiótico de selección, blasticidina (6 µg/ml) o puromicina (3 µg/ml), 4) posteriormente se tomaron varios clones de

células y se cultivaron en cajas de 75 cm² en DMEMF12 con 10% de SFB y el respectivo antibiótico de selección por 15 días y 5) finalmente la transducción se verificó por WB usando anti-Pink1 (Abcam, USA) y anti-Parkin (Santa Cruz Biothecnology, USA).

Adicionalmente con el fin de estudiar el efecto protector de la hexoquinasa (HK), las células CAD shPink1 y shParkin fueron transfectadas transitoriamente por lipofección (Lipofectamina® 2000, Invitrogen) usando los plásmidos pCDNA3.1 como control de la transfección y el vector pCDNA3.1 HKI-WT para la sobreexpresión de HK. Brevemente la transfección transitoria se realizó de la siguiente manera: 1) las células fueron sembradas en DMEMF12 con 0.5% de SFB a una densidad de 2.5×10^4 por pozo, 2) el siguiente día se removió el medio y se cambió por 700 μ l de la solución de transfección, la cual se compone de 2 μ g de los plásmidos, 3 μ l de Lipofectamina ®2000 (Invitrogen, USA) en Optimen (GIBCO, USA) 3) 6 horas después se adicionó medio de diferenciación por 24, 48 y 72 horas para posteriormente extraer la proteína y verificar mediante un WB usando anti-HKI (Abcam, USA).

4.3. Conteo celular

Para determinar la densidad celular (número de células/mL) se usó el método de azul tripán, un colorante vital que permite diferenciar las células viables (no teñidas) de las no viables (teñidas de azul). El precipitado obtenido después del desprendimiento celular se resuspende en 1 ml de medio sin SFB, se toma una alícuota de 20 μ l de la suspensión a la cual se le adiciona 20 μ l de azul tripán, para obtener una dilución 1: 2, posteriormente se mezcla bien y se llenan los dos retículos de la cámara de Neubauer cada uno con 10 μ l, se deja en reposo 1 minuto para precipitar las células, se verifica al microscopio la homogeneidad y número de células y finalmente se cuentan los cuadrantes de las esquinas de ambos retículos teniendo en cuenta que las células sobre las líneas límites superior y derecha de cada cuadrante se incluyen. Para hallar las células vivas por mL, se tienen en cuenta el número de cuadrantes contados (8 cuadrantes cada uno con un volumen de 0,1 mm³) y el factor de dilución para aplicar la siguiente ecuación.

$$\text{células/ml} = \frac{\text{células vivas contadas}}{0,8 \text{ mm}^3} \times \frac{1000 \text{ mm}^3}{1 \text{ ml}} \times \text{Factor de dilución}$$

4.4. Viabilidad celular

Inicialmente se aplicó el método WST, una sal de tetrazolio (4-[3-(4-Iodofenil)-2-(4-nitrofenil)-2H-5-tetrazolio]-1,3-disulfonato de benceno) la cual es transformada en formazán mediante un complejo sistema mitocondrial succinato-tetrazolio-reductasa y es activa sólo en el caso de células viables. La cantidad de formazán producida durante el ensayo se evaluó mediante la absorbancia en un espectrofotómetro y se relacionó con el número de células viables (número de células metabólicamente activas dentro del cultivo). Las células fueron sembradas a una densidad de 7×10^5 en 200 μl de medio de diferenciación por pozo en una placa de 96 pozos. Las células CAD shControl, CAD-shPink1 y CAD shParkin diferenciadas fueron tratadas con C2-ceramida 25 mM (Sigma–Aldrich,USA) por 6 horas, IGF-1 100 ng/mL (Prospec, USA) e insulina 200 ng/mL (Eli Lilly and Company,USA) por 1 hora. Una vez cumplido el tiempo de los tratamientos fueron removidos 100 ml de medio, posteriormente se adicionaron 10 ml de la solución stock de WST (1:10), se incubó la placa de 96 pozos durante 2 horas a 37°C y finalmente la absorbancia fue leída a 450 nm. Las células sin tratamiento se usaron como control positivo.

El porcentaje de sobrevivencia celular fue calculado como:

$$\% \text{ de sobrevivencia} = 100 \times \frac{X}{\text{control}}$$

En donde X es la lectura promedio del metabolismo de WST en un grupo con un solo tratamiento.

En segundo lugar se usó CytoTox 96 Non-Radiactive Cytotoxicity Assay (Promega, USA) para el método de LDH, esta técnica mide cuantitativamente la liberación de lactato deshidrogenasa por colorimetría y es útil para determinar la citotoxicidad mediada por C2-Ceramida. La LDH es una enzima estable en el citoplasma y es liberada de la célula después de su lisis celular, por tanto permanece en el medio de cultivo. El ensayo básicamente consistió en tomar 50

μL de medio de cultivo (por triplicado) e incubarlos con el sustrato (substrate mix) y buffer (Assay buffer) por 30 min. Luego se adiciono 50 μl de solución de parada y finalmente se leyó la caja de 96 pozos a una absorbancia de 490 nm. El proceso que se lleva a cabo es la conversión de la sal de tetrazolium a un producto de formazán rojo. La intensidad del color formado es proporcional al número de células lisadas.

El análisis de los datos se realizó teniendo en cuenta dos controles: el background del medio dado por el rojo fenol y por el LDH presente en el SFB (absorbancia de 100 μl de medio de cultivo sin células se usa para normalizar todos los valores obtenidos de absorbancia de las muestras y del control de lisis total). El control de lisis total o lisis 100% se obtuvo congelando los pozos a -70°C por 45 minutos, para luego descongelarlo a temperatura ambiente, recoger todo el medio de cada pozo junto con las células lisadas y centrifugar a 900 rpm por 4 min para tomar 50 μL de este sobrenadante que se transfieren a la caja de 96 pozos.

4.5. Transformación de *E.coli* JM109 con el plásmido para la sobreexpresión de hexoquinasa

El plásmido para la sobreexpresión de hexoquinasa fue donado por el Dr. Mark Cookson del NIH (National Institute of Health). La transformación en la cepa de *E.coli* JM109 se realizó por termo competencia. Las bacterias transformadas se seleccionaron con kanamicina 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y se cultivaron toda la noche en medio LB para luego congelarlas en glicerol al 10% para posteriores experimentos.

4.6. Purificación de los plásmidos para la sobreexpresión de hexoquinasa

Las colonias transformadas fueron crecidas toda la noche en erlenmeyer con 250 mL de medio LB y posteriormente la purificación de los plásmidos se realizó utilizando el kit Zyppy Plasmid Midiprep (Zymo Research, USA). Los plásmidos fueron cuantificados en un Nanodrop y almacenados en el congelador a -20°C para ser utilizados en la transfección de las CAD-shPink1 y CAD-shparkin.

4.7. Extracción y cuantificación de proteínas

Las células CAD-shControl, CAD-shPink1 y CAD-shparkin fueron cultivadas en placas de 6 pozos a una densidad de 2.5×10^4 , una vez cumplido el tiempo de los tratamientos las células se lisaron en frío usando buffer de lisis RIPA suplementado con inhibidores de proteasas (Complete Mini, EDTA Free. Roche) y fosfatasas (PhosphoStop. Roche). Los lisados se centrifugan a 10000 rpm por 10 min a 4°C, y el sobrenadante se alícuota y se almacena a -20°C. La concentración de proteína de cada muestra se determina usando Ácido Bicinonínico (BCA Protein Assay, Pierce) que tiene la ventaja de ser un método muy sensible y que tiene muy pocas interferencias ya que es compatible con la mayoría de detergentes iónicos y no iónicos. Para este ensayo se emplea la relación reactivo: muestra (20:1) recomendada en el kit, se realiza una curva de calibración con 5 patrones de trabajo desde 5 a 25 mg de BSA, que abarca el rango de linealidad del ensayo. La mezcla se incuba a 37 °C durante 30 minutos y la absorbancia se mide mediante espectrofotometría en placas de 96 pozos a una longitud de onda 570 nm. El ácido bicinonínico, es un compuesto capaz de formar un complejo púrpura intenso formado por la quelación de dos moléculas de BCA con un ión cuproso. Los iones cuprosos se originan por la reducción de iones cúpricos por las proteínas en medio alcalino.

4.8. Electroforesis en SDS-PAGE

Para el análisis de las proteínas se uso una cámara de electroforesis vertical BIORAD mini PROTEAN III para la separación de proteínas de acuerdo a su tamaño en geles SDS-poliacrilamida de 8 % y 10%. El gel se coloca entre dos placas de vidrio separadas por espaciadores de 0.75mm en un soporte vertical. Una vez polimerizado, el gel se coloca en la cámara de electroforesis y se cubre con buffer de corrido 1X. Las muestras de proteína (20 µg en total) diluidas en buffer Laemmli y el marcador de peso se colocan en los pozos y se lleva a cabo la electroforesis a 100V.

4.9. Detección de proteínas por Western blot

Luego de la electroforesis, las proteínas se transfieren a membranas de PVDF (Amersham, Buckinghamshire) usando una cámara de transferencia BIORAD Mini Trans-Blot. El gel se cubre con la membrana de PVDF que se coloca entre papel Whatmann y dos esponjas de filtración. El ensamblaje se colocó en un cassette de soporte y se insertó en la cámara de transferencia con buffer de transferencia 1X. La transferencia se lleva a cabo por 1h a 100V. Luego de la transferencia, la membrana de PVDF se incuba en buffer de bloqueo (5% leche descremada en TBS con 0.1% (v/v) Tween-20 (TBS-T)) por 1h a temperatura ambiente y posteriormente se incuba con los anticuerpos primarios en buffer de bloqueo por 1h o toda la noche a 4°C, se lava 3 veces en TBS-T (5min/lavado). El anticuerpo unido se visualiza mediante incubación de la membrana con el anticuerpo secundario específico (1:1000) por 1h a temperatura ambiente y se lava 3 veces con TBS-T (10min/lavado). El anticuerpo secundario unido se detecta usando quimioluminiscencia, para esto la membrana se incuba con 500 µl de ECL por 1min, y se expone a una película de revelado para visualizar los productos de quimioluminiscencia. Las bandas en la placa fotográfica se escanean para finalmente realizar la densitometría usando el software Image-J (NIH, USA version 1.44) y su análisis con y GrapPad Prism 5.

Para determinar los niveles de hexoquinasa y receptores de insulina e IGF1-1 se realizó un WB contra HKI, IGF-1Ry IR. Con el fin de evaluar la activación de la vía PI3K/AKT se realizaron ensayos de WB para AKT total y fosforilado en su residuo de Ser 473 mientras que la vía MAPK se estudió mediante ensayos de WB de ERK1/2 total y fosforilado en sus residuos Tirocinas 202/204, como control de carga se usó la β -actina.

Anticuerpo Primario	Casa comercial	Dilución	Anticuerpo Secundario
Pink1	Abcam, USA	1: 500	Conejo
Parkin	Santa Cruz Biothecnology, USA	1: 500	Ratón
Hexoquinasa I	Abcam, USA	1: 1000	Ratón
IGF-1R Total	Cell Signaling, USA	1: 1000	Conejo
p-IGF-1R(Tyr 1165/1166)	Santa Cruz Biothecnology, USA	1: 200	Ratón
IR Total	Cell Signaling, USA	1: 1000	Cabra
p-IR(Tyr 1162/1163)	Santa Cruz Biothecnology, USA	1: 200	Conejo
AKT Total	Cell Signaling, USA	1: 2000	Conejo
p-AKT (Ser 473)	Cell Signaling, USA	1: 2000	Conejo
ERK1/2 Total	Cell Signaling, USA	1: 2000	Conejo
p-ERK1/2 (Tyr 202/204)	Cell Signaling, USA	1: 2000	Conejo
p-GSK3 β (Ser 9)	Cell Signaling, USA	1: 1000	Conejo
β -actina	Sigma, USA	1: 25000	

Tabla 6. Anticuerpos empleados para los ensayos de Western Blot

4.10. Actividad hexoquinasa, IGF1R e IR

La actividad de la hexoquinasa se midió usando un kit comercial (136957- Abcam, USA). Para este ensayo se usó 50 μ g de proteína por pozo y se ajustó a un volumen final de 50 μ l con el buffer del kit, cada muestra se realizó por triplicado. El ensayo cuenta con tres controles importantes; el background del buffer del kit, el background de la mezcla de reacción sin el sustrato y el control positivo (1:99) en 50 μ l de buffer del kit. Posteriormente se adicionan 50 μ l de mezcla de reacción por pozo (34 μ l de buffer, 2 μ l de enzima, 2 μ l de revelador, 2 μ l de coenzima y 10 μ l del sustrato). El ensayo requiere de una curva de calibración con 5 patrones de trabajo desde 0 a 14,5 nmol de NADH, que abarca el rango de linealidad del ensayo. Finalmente el plato de 96 pozos se incubo durante 60 minutos a temperatura ambiente y la absorbancia se midió a diferentes tiempos (10, 30 y 60 minutos) usando un espectrofotómetro a una longitud de onda 450 nm. La actividad hexokinasa se calculó aplicando la siguiente formula:

$$\text{Actividad Hexokinasa} = B/(\Delta T \times V) \times \text{Dilution Factor} = \text{nmol/min/ml/} = \text{mU/ml}$$

En donde B es la cantidad de NADH de la curva de calibración (nmol), ΔT (T2 - T1) es el tiempo de reacción (min), V es el volumen de la muestra (ml). Para obtener B se debe aplicar la curva de calibración a ΔOD ($\Delta OD = A2 - A1$).El

resultado se expresa como unidades de hexoquinasa, una unidad de HK es la cantidad de enzima que se genera 1.0 μmol de NADH por minuto a un pH 8 y temperatura ambiente.

La actividad de los receptores IGF1R e IR se evaluó mediante WB usando anticuerpos que identifican la fosforilación de residuos de activación de cada receptor: p-IGF1R (Tyr 1165/1166) y p-IR (Tyr 1162/1163).

4.11. Inmunofluorescencia

Para evaluar la localización de hexoquinasa se realizó ensayos de inmunofluorescencia en las células CAD shControl, shPink1 y shParkin. Las células se cultivaron según las indicaciones arriba mencionadas sobre cubreobjetos tratados de la siguiente manera: Los cubreobjetos son sumergidos en ácido clorhídrico 10N para retirar cualquier elemento orgánico de su superficie. Posteriormente se enjuagan con agua desionizada para retirar el ácido, se colocan dentro de las platos de 6 pozos y se cubren con una solución de Poli-D-lisina a una concentración de 0.01 mg/ml durante 10 minutos, finalmente se enjuagan con agua desionizada y se irradian con luz ultravioleta para asegurar la esterilidad durante 1 o 2 horas.

Luego se siembran las células a la densidad de 2.5×10^4 células por pozo, una vez cumplidos los tiempos de los tratamientos, las células se fijan con paraformaldehído al 4% en PBS, se retira el paraformaldehído y se lava con PBS 3 veces por 5 minutos. Posteriormente las células son permeabilizadas con 0.1% de Triton X-100 en PBS durante 10 minutos, se lava con buffer de bloqueo (PBS con 1% de BSA, 1% de SFB y 0,05% de Triton X-100) 3 veces por 5 min y se incuban en buffer de bloqueo durante 1 hora para bloquear la unión inespecífica de anticuerpos. Una vez se cumple el tiempo de bloqueo las células se incuban con el anticuerpo primario diluido en buffer de bloqueo (1:50) toda la noche en un ambiente húmedo. El siguiente día se lavan con buffer de bloqueo 5 veces por 10 min y se incuban con el anticuerpo secundario Alexa Fluor® 568 o 488 (Invitrogen, USA) diluido en buffer de bloqueo (1:1000) durante 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente se lavan con buffer de bloqueo 3 veces por 10 min y se

tiñe el núcleo con Hoechst (1:5000, Invitrogen 33258) por 1 min. Finalmente se saca el cubre objeto de cada pozo individual, se deja secar y se coloca sobre el portaobjetos con medio de montaje apropiado para fluorescencia (Vectashield®) y se visualiza en un microscopio confocal NIKON C1 PLUS ECLIPSE TI. El análisis de las imágenes se realizó mediante el software Image-J (NIH, USA version1.44).

4.12.Distribución mitocondrial y potencial de membrana mitocondrial con JC-1.

Para analizar la distribución de las mitocondrias, las células CAD se sembraron en platos de 6 pozos a una densidad de 2.5×10^4 por pozo y se adicionó MitoTracker® Red CM-H2XRos (Invitrogen, USA) a una concentración de 200 nM durante 45 min, se lavó dos veces con DMEM-F12 precalentado a 37°C, se fijó con paraformaldehído a 4% en PBS durante 20 min y se realizó el montaje apropiado para visualizarlas en el microscopio confocal. Como control positivo de fusión mitocondrial las células fueron tratadas con forskolina (FK) 25 μ M durante 45 min. La FK tiene la función de activar la vía de señalización del cAMP, lo que termina por fosforilar a Drp1 y la forma fosforilada de esta proteína no es reclutada en la membrana mitocondrial y por lo tanto no promueve fisión mitocondrial. Como control positivo de fisión las células CAD se trataron con CCCP en una concentración de 10 μ M durante 1 hora.

La funcionalidad de la mitocondria se evaluó usando JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide (invitrogene, USA). Para este ensayo las células se siembran en platos negros de 96 pozos a una densidad de 7×10^3 en medio de diferenciación por 4 días, posteriormente se adiciona el JC1 (0,5 mM) y se incuba por 15 minutos a 37°C y 5% de CO₂. Una vez cumplido el tiempo de incubación se retira el medio y se lava 3 veces por 5 minutos para finalmente leer la placa en un fluorometro a una excitación de 560 nm y emisión de 595 nm para detectar los agregados de JC-1 (rojo) que indican las mitocondrias con un potencial de membrana estable, mientras que las células con mitocondrias despolarizadas o monómeros de JC-1 (verde) se detectan con un filtro de excitación de 485 nm y uno de emisión de 535 nm. Como control positivo para

despolarizar las mitocondrias se usó el desacoplador CCCP 1 μ M durante 1 minuto. El análisis correspondiente al potencial de membrana mitocondrial se realizó mediante la relación de la señal de los monómeros sobre los agregados de JC-1 (verde/rojo).

4.13. Análisis estadístico

Cada uno de los ensayos se realizó por triplicado y se aplicó un test de análisis de varianza (ANOVA) para corroborar las diferencias en el total de los grupos. Si el test ANOVA resultó positivo, *p-value* <0,05, se realizó una prueba post-hoc de Tukey-Kramer (comparación múltiple), para averiguar si existen diferencias significativas entre grupos y en cuál de los grupos radica la diferencia.

Los *p-values* obtenidos en el test de Tukey-Kramer son expresados en las gráficas de la siguiente manera:

“*” si *p-value* es inferior a 0,05

“**” si *p-value* es inferior a 0,01

“***” si *p-value* es inferior a 0,001

Los análisis de colocación se realizaron teniendo en cuenta el coeficiente de Pearson.

5. Capítulo 5

Resultados y Discusión

5.1. Resultados

5.1.1. La disminución de la expresión de Pink1 y Parkin reduce la viabilidad celular y aumenta la vulnerabilidad al daño inducido por C2-ceramida

La eficiencia de la transducción fue comprobada mediante Western blot (WB) e inmunofluorescencia (IF). En la figura 10 se muestra la disminución de la expresión de Pink1 en un 63% (Figura 10A) y Parkin en un 85% en las células CAD transducidas (Figura 10B). Los ensayos de IF confirman la disminución de la expresión de Pink1 y Parkin (Figura 10C)

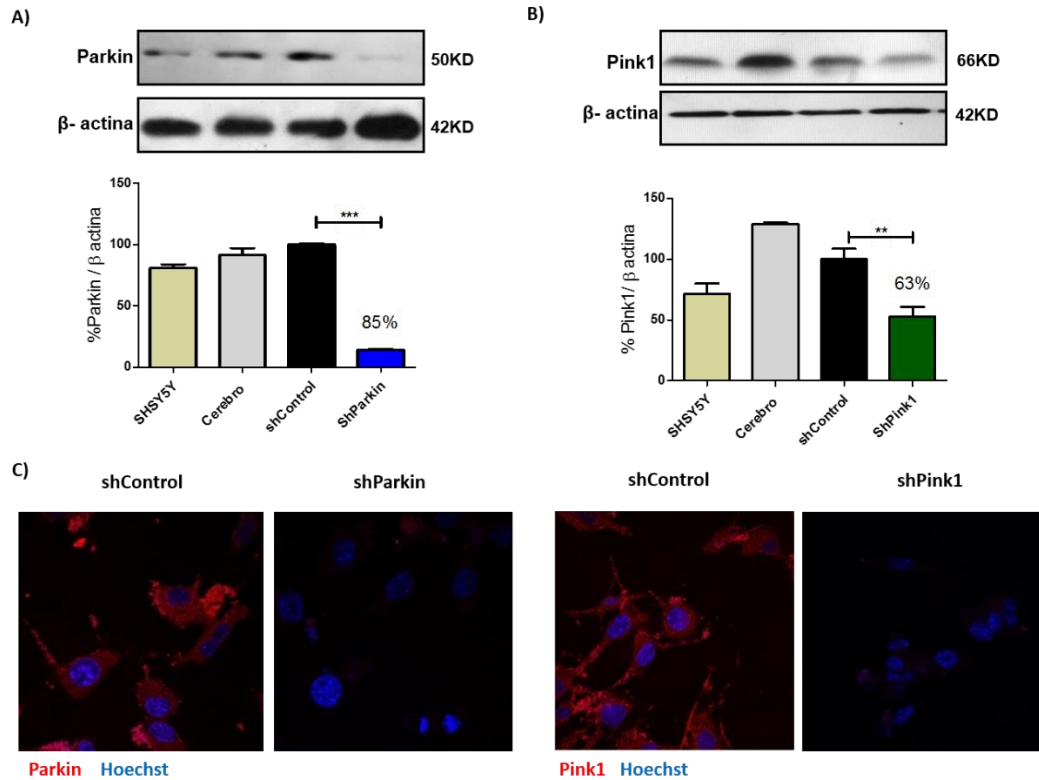


Figura 10. Establecimiento de las 3 líneas celulares.

A) Niveles de expresión de Pink1 en células SHSY5Y, cerebro de ratón y células CAD transducidas con las secuencias shControl y shPink1. **B)** Niveles de expresión de Parkin en células SHSY5Y, cerebro de ratón y células CAD transducidas con las secuencias shControl y shParkin. **C)** Ensayos de inmunofluorescencia para verificar la transducción en las líneas celulares. Pink1 (rojo), Parkin (rojo) y núcleo (azul), n=3, ANOVA y prueba Tukey-Kramer.

Con el fin de evaluar si la disminución de la expresión de Pink1 induce cambios en la expresión de Parkin y viceversa, se realizó un WB contra Pink1 en las células shParkin y se encontró una disminución de su expresión en un 31% comparado con las células shControl (Figura 11A), mientras que el WB de Parkin en células shPink1 no evidencia cambios con respecto a las células shControl (Figura 11B).

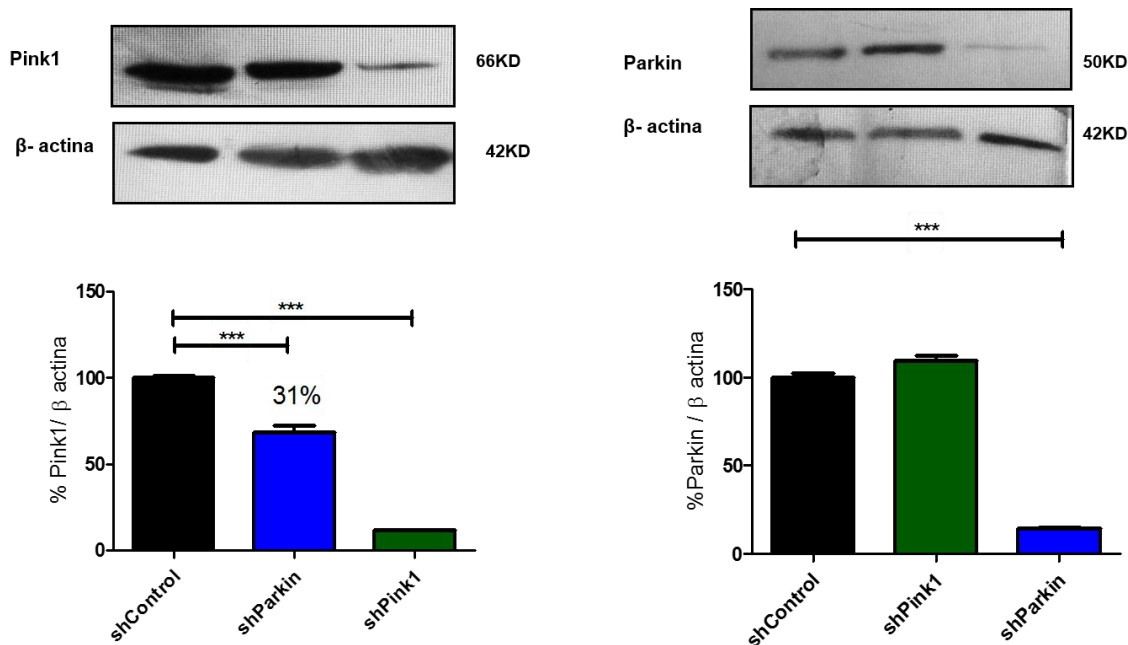


Figura 11. Efecto de la disminución de Pink1 en shParkin y Parkin en shPink1.

A) Niveles de expresión de Pink1 en las células shControl y shParkin. **B)** Niveles de expresión de Parkin en las células shControl y shPink1. n=3, ANOVA y prueba Tukey-Kramer.

Una vez establecidas las 3 líneas celulares se evaluó la actividad mitocondrial como un indicador de viabilidad celular mediante un ensayo de WST. Las células shPink1 y shParkin disminuyen su actividad mitocondrial en un 26% a 40% comparadas con las células shControl en condiciones basales y son más vulnerables a los tratamientos con C2-ceramida (25μM por 6 horas), ya que evidencian una disminución de la actividad mitocondrial en un 32% a 47%. Las células shControl tratadas con IGF-1 (100 ng/mL por 1 hora) e insulina (200 ng/mL por 1 hora) incrementan la actividad mitocondrial en un 25% a 33%; sin embargo, las células shPink1 no muestra una respuesta frente a IGF-1 e insulina y las shParkin tampoco responden a los tratamientos con insulina (Figura 12A).

La prueba de liberación de LDH muestra que las células shParkin presentan un incremento del 11% en la liberación de lactato deshidrogenasa al medio celular comparado con las células shControl en condiciones basales, mientras que los tratamientos con C2-ceramida incrementan la liberación de LDH desde un 8% hasta un 13% en las células shParkin y shPink1 comparado con las células sin tratamiento. Los tratamientos con IGF-1 e insulina no evidencian cambios en

ninguna de las 3 líneas celulares (Figura 12B). Los ensayos de WST y LDH nos indican que las células que disminuyen la expresión de Pink1 y Parkin reducen la viabilidad celular y son más vulnerables frente a toxinas como C2-ceramida.

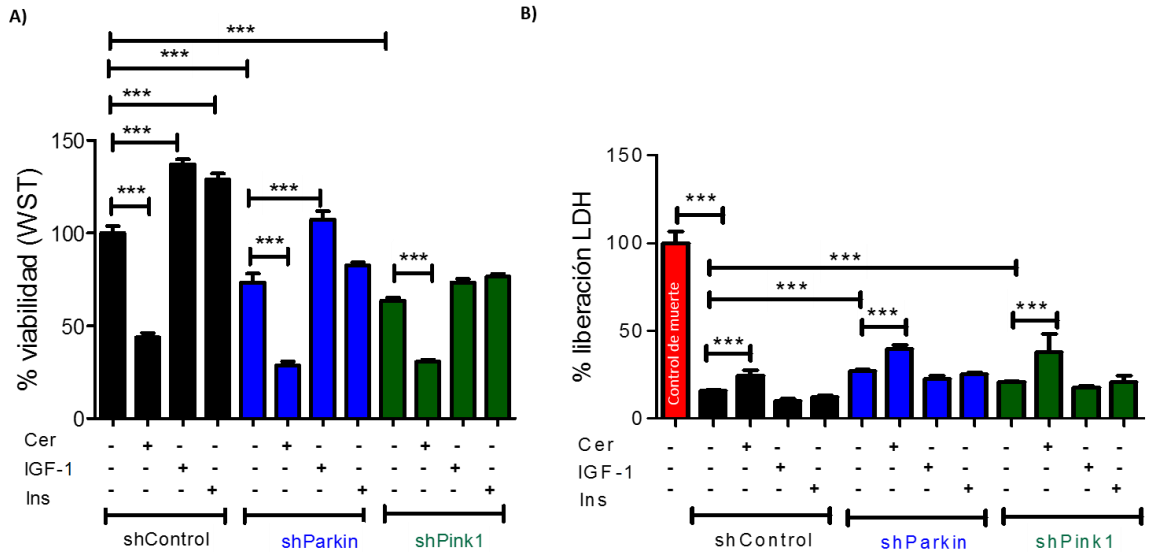


Figura 12. La disminución de la expresión de Pink1 y Parkin disminuye la supervivencia celular.

A) Actividad mitocondrial en células shControl, shPink1 y shParkin con o sin tratamientos de C2-Ceramida (25µM) por 6 horas, IGF-1 (100 ng/mL) e insulina (200 ng/m) por 1 hora. **B)** Porcentaje de liberación de lactato deshidrogenasa al medio extracelular en células shControl, shPink1 y shParkin con o sin tratamientos de C2-Ceramida, IGF-1 e insulina. n=12, ANOVA y prueba Tukey-Kramer.

5.1.2. La disminución de la expresión de Pink1 y Parkin altera la activación de los receptores tirosina quinasa (RTKs).

Los niveles totales del receptor de IGF-1 se encuentran incrementados en las células shPink1 y shParkin (Figura 13 A-B) sin embargo los análisis de los niveles de fosforilación del receptor IGF-1 se encuentran disminuidos en las células shPink1 y shParkin comparado con el shControl (Figura 13C). Las células shControl y shParkin tratadas con C2-Ceramida disminuyen los niveles de IGF-1R mientras que las células shPink1 incrementan los niveles de IGF-1R frente a C2-Ceramida. La activación del receptor con IGF-1 solo se evidencia en las células shControl (Figura 13C).

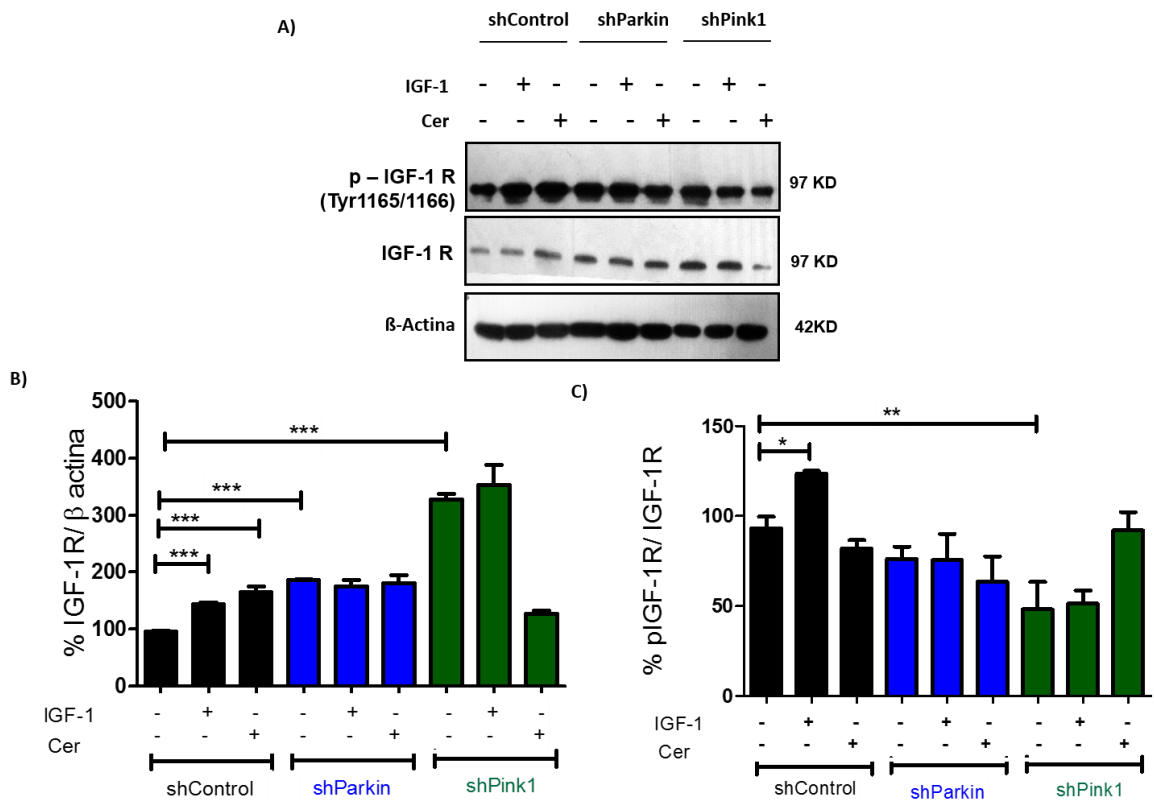


Figura 13. La disminución de la expresión de Pink1 y Parkin altera los niveles y activación de IGF-1R.

A) WB contra el receptor de IGF-1 total y fosforilado en CAD shControl, shParkin y shPink1 tratadas con IGF-1 (100ng/mL) y C2-Ceramida (25 μ M). **B)** Densitometría de los niveles de IGF-1R en CAD shControl y shParkin. **C)** Densitometría de los niveles de fosforilación del IGF-1R en CAD shControl, shParkin y shPink1. n=3, ANOVA y prueba Tukey-Kramer.

Los niveles del receptor total de insulina (IR) se encuentran incrementados en las células shParkin y disminuidos en las células shPink1 (Figura 14B) sin embargo los análisis de fosforilación del receptor de insulina (pIR) se encuentran estables en las células shPink1 y disminuidos en las shParkin comparado con el shControl (Figura 14C). La activación de pIR con insulina es bloqueada en las células shParkin y los tratamientos con C2-Ceramida incrementan los niveles de pIR en las células shParkin y shPink1 (Figura 14C).

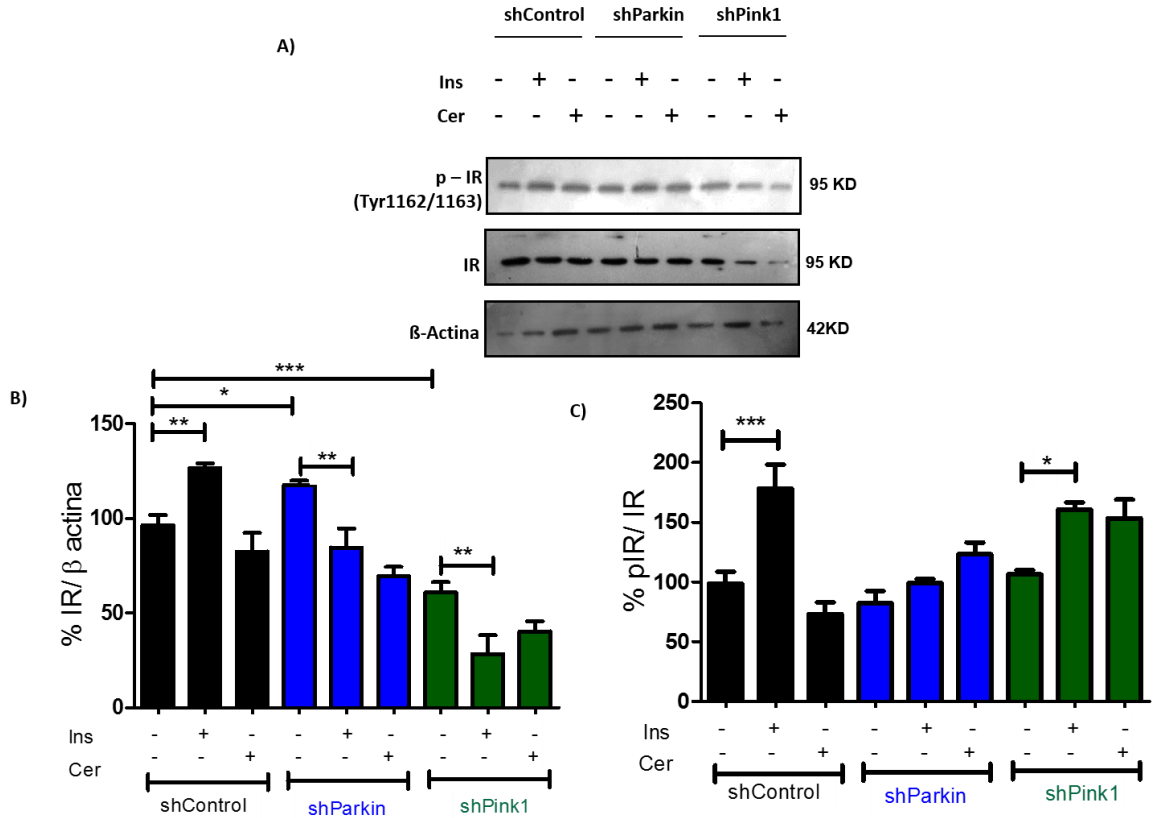


Figura 14 .La disminución de la expresión de Pink1 y Parkin altera los niveles y activación del Receptor de Insulina.

A) WB contra el receptor total y fosforilado en insulina en CAD shControl, shParkin y shPink1 tratadas con insulina (200ng/mL) y C2-Ceramida (25µM). **B)** Densitometría de los niveles de IR en CAD shControl, shParkin y shPink1. **C)** Densitometría de los niveles de p-IR en CAD shControl, shParkin y shPink1 n=3, ANOVA y prueba Tukey-Kramer.

5.1.3. La disminución de la expresión de Pink1 y Parkin reduce la activación de vías de supervivencia celular

Las células CAD fueron transducidas para la disminución de Pink1 usando 2 secuencias diferentes (Tabla 3) que dieron origen a 3 líneas celulares, una línea con la secuencia A, otra con la secuencia B y una con las 2 secuencias A y B. Las 3 líneas celulares presentan una disminución de Pink1 (Figura 15A-B) y evidencian una reducción en la fosforilación de AKT en su residuo de Ser 473 (Figura 15C). Además se encontró una disminución de la fosforilación de ERK2 en su Tyr204 (Figura 15D) y GSK3β en su Ser 9 (Figura 15E).

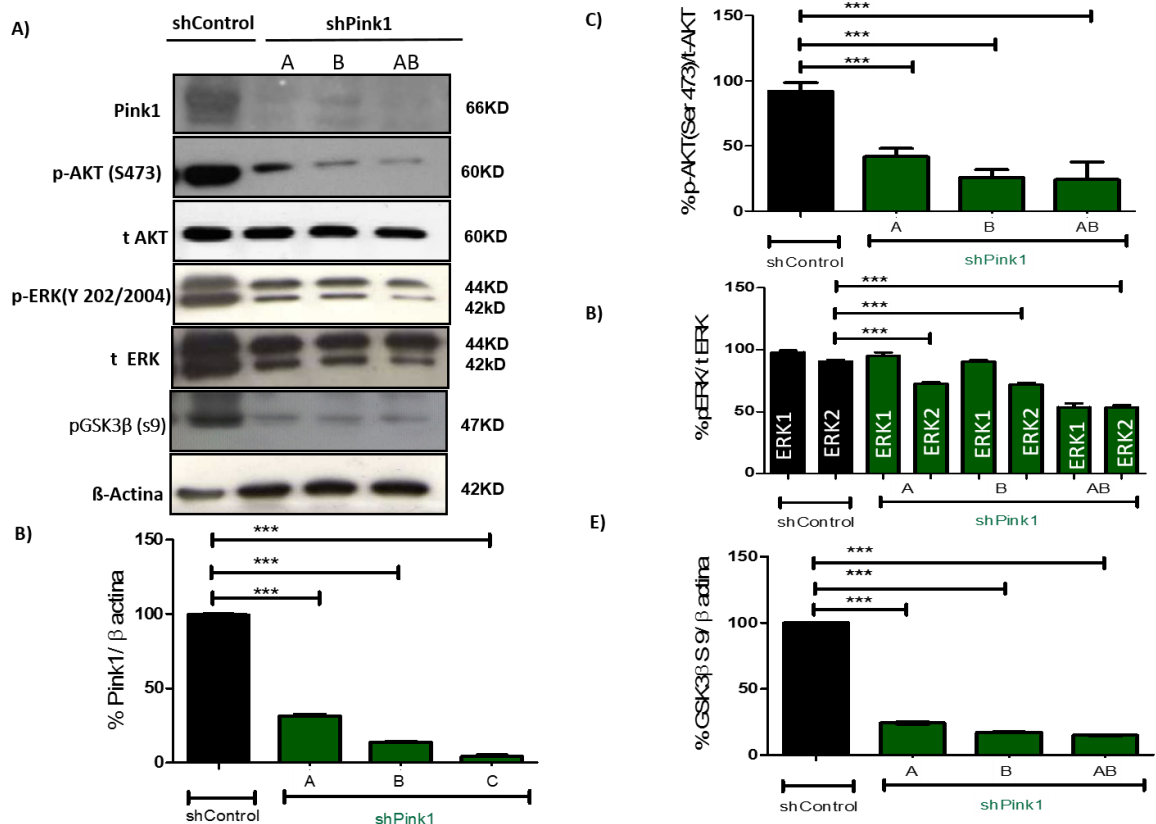


Figura 135. Efecto de la disminución de la expresión de Pink1 sobre la fosforilación de AKT, ERK y GSK3β.

A) WB contra la fosforilación de AKT (Ser 473), AKT total, ERK1/2 fosforilado (Tyr 202/204), ERK1/2 total, GSK3β fosforilado (Ser 9) y β actina en células shPink1. **B)** Densitometría de los niveles de Pink1 en células shPink1 y shControl. **C)** Densitometría de los niveles de AKT fosforilado. **D)** Densitometría de los niveles de ERK1 y ERK2 fosforilado **E)** Densitometría de los niveles de GSK3β fosforilado en células shPink1. n=3, ANOVA y prueba Tukey-Kramer.

Las células CAD transducidas para la disminución de Parkin (Figura16A-B) también presentan una clara disminución de la fosforilación de AKT y GSK3β (Figura 16C y 16E) pero a diferencia de shPink1 se encontró una disminución de la fosforilación de ERK1 en su Tyr202 (Figura 16D).

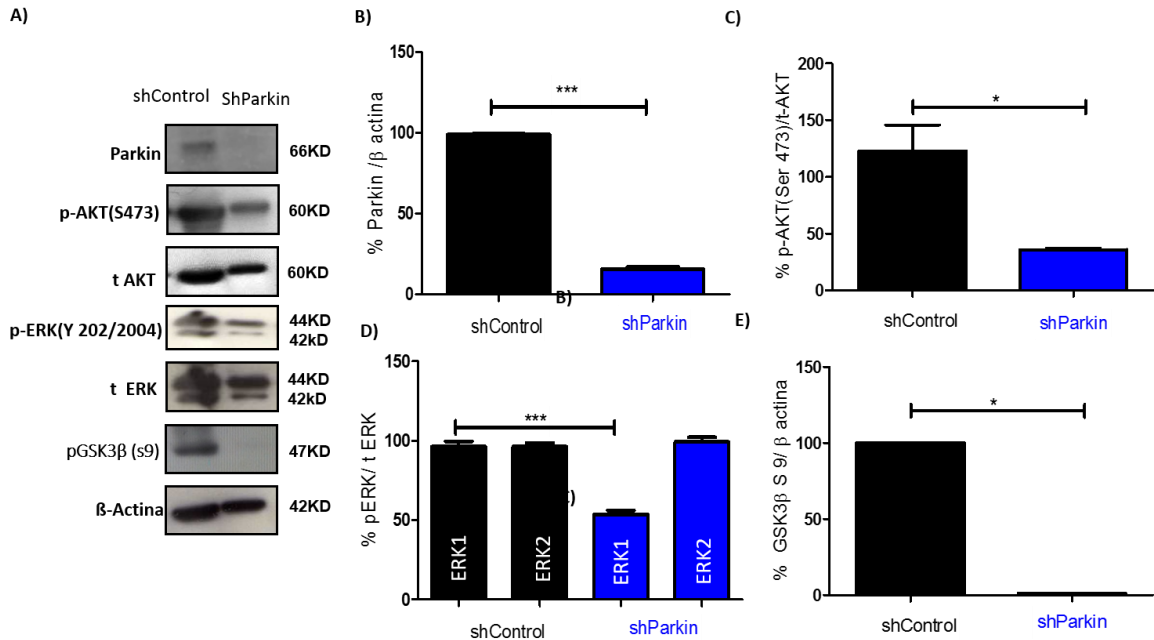


Figura 16. Efecto de la disminución de la expresión de Parkin sobre la fosforilación de AKT, ERK y GSK3 β .

A) WB contra la fosforilación de AKT (Ser 473), AKT total, ERK1/2 fosforilado (Tyr 202/204), GSK3 β fosforilado (Ser 9) y β actina en células shParkin. **B)** Densitometría de los niveles de Parkin en células shParkin y shControl. **C)** Densitometría de los niveles de AKT fosforilado. **D)** Densitometría de los niveles de ERK1 y ERK2 fosforilado **E)** Densitometría de los niveles de GSK3 β fosforilado en células shParkin. n=3, ANOVA y prueba Tukey-Kramer.

5.1.4. La disminución de la expresión de Pink1 y Parkin induce cambios en la distribución y función mitocondrial

Para evaluar la distribución mitocondrial las células CAD fueron marcadas con mitotracker (200 nM por 45 min). Las células shControl presentan unas redes mitocondriales que salen de la zona perinuclear y se extiende por todo el citoplasma, mientras que en las células shParkin se observa un menor marcaje de mitocondrias, las cuales se ubican perinuclearmente, fenotipo que es más evidente en las células shPink1. Las células shPink1 y ShParkin presentan un patrón de distribución mitocondrial similar a las células shControl tratadas con CCCP, usado como control positivo de fisión. Las células shControl tratadas con forskolina, usado como control positivo de fusión mitocondrial, genera unas mitocondrias más grandes y alargadas a lo largo del citoplasma (Figura 17).

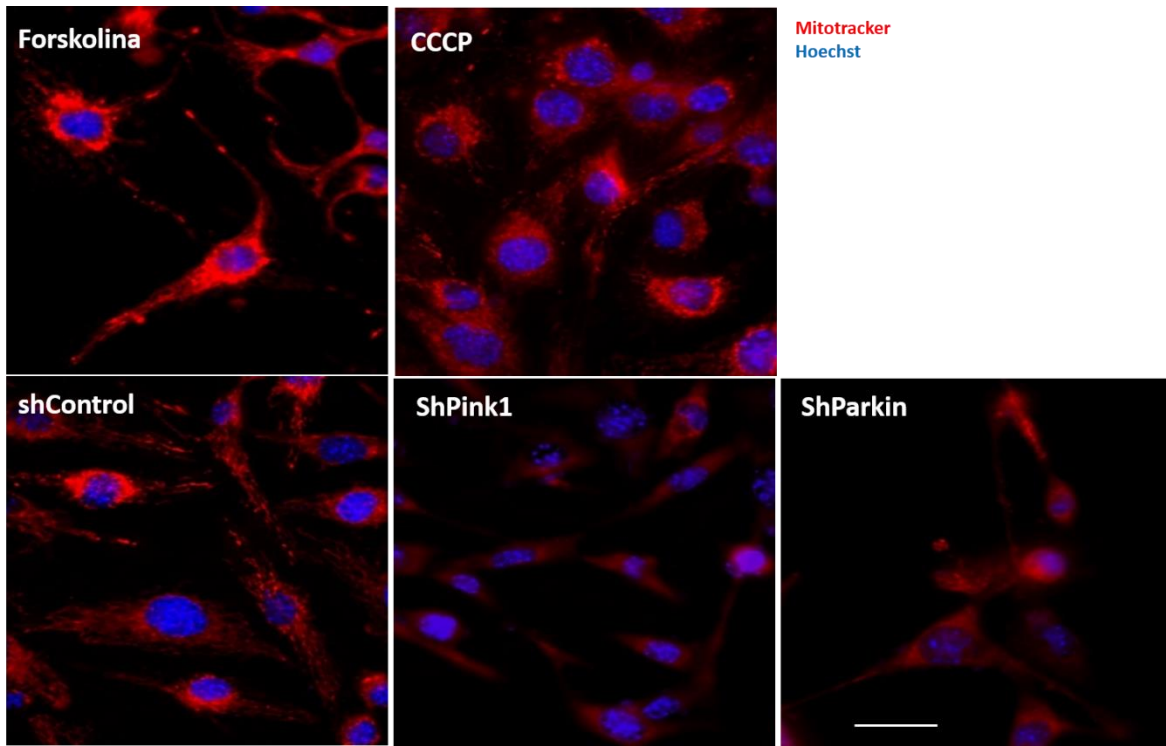


Figura 17. La disminución de la expresión de Pink1 y Parkin cambia la distribución mitocondrial.

Las células shControl, shPink1 y shParkin marcadas con tratadas con mitotracker Red (200 nM por 45 min). Las células shControl fueron tratadas con CCCP (10 μ M por 1 hora) y forskolina (25 μ M por 45 min). Barra de escala: 10 μ m.

Por otro lado se encontró que las células shPink1 y shParkin reducen drásticamente el potencial de membrana mitocondrial comparado con las células shControl. El tratamiento con C2-Ceramida (25 μ M por 6 horas) disminuye completamente el potencial de membrana mitocondrial en las 3 líneas celulares, mientras que en células shControl y shParkin tratadas con IGF-1 e insulina generan una pequeña hiperpolarización que no se observa en las shPink1 (Figura 18).

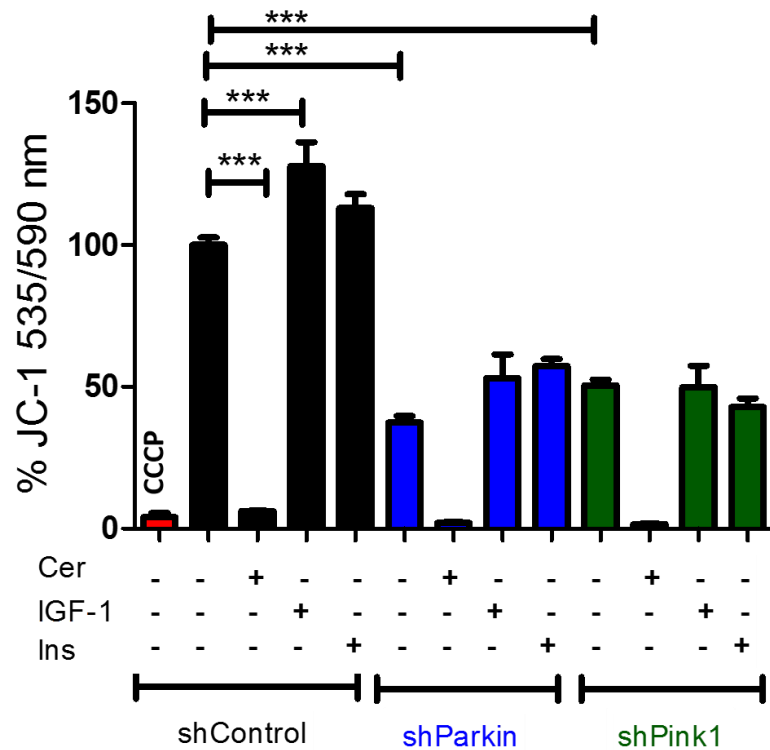


Figura 18. La disminución de la expresión de Pink1 y Parkin altera el potencial de membrana mitocondrial.

El CCCP tumba el potencial de membrana mitocondrial, n=3, ANOVA y prueba Tukey-Kramer.

5.1.5. La disminución en la expresión de Pink1 y Parkin altera los niveles, localización y actividad de la HKI

Las células shParkin presentan un incremento del 63% en los niveles de hexokinasa I (HK1) (Figura 19A), mientras que las shParkin evidencian una disminución del 59% en su expresión (Figura 19B). Las células CAD shControl estimuladas con IGF-1 (100ng/mL 1 hora) e insulina (200ng/mL 1 hora) incrementan los niveles de HKI en un 10% a 26%; por el contrario la C2-ceramida (25µM por 6 horas) disminuye los niveles de HKI en un 29%. Las células shPink1 y shParkin responden diferente frente a estos tratamientos: la disminución de los niveles de Pink1 bloquea la respuesta al estímulo con IGF-1 e incrementa los niveles de HKI en un 28% frente a C2-Ceramida, mientras que la disminución de los niveles de Parkin incrementa los niveles de HKI frente a IGF-1, insulina y C2-Ceramida (Figura 19A-B).

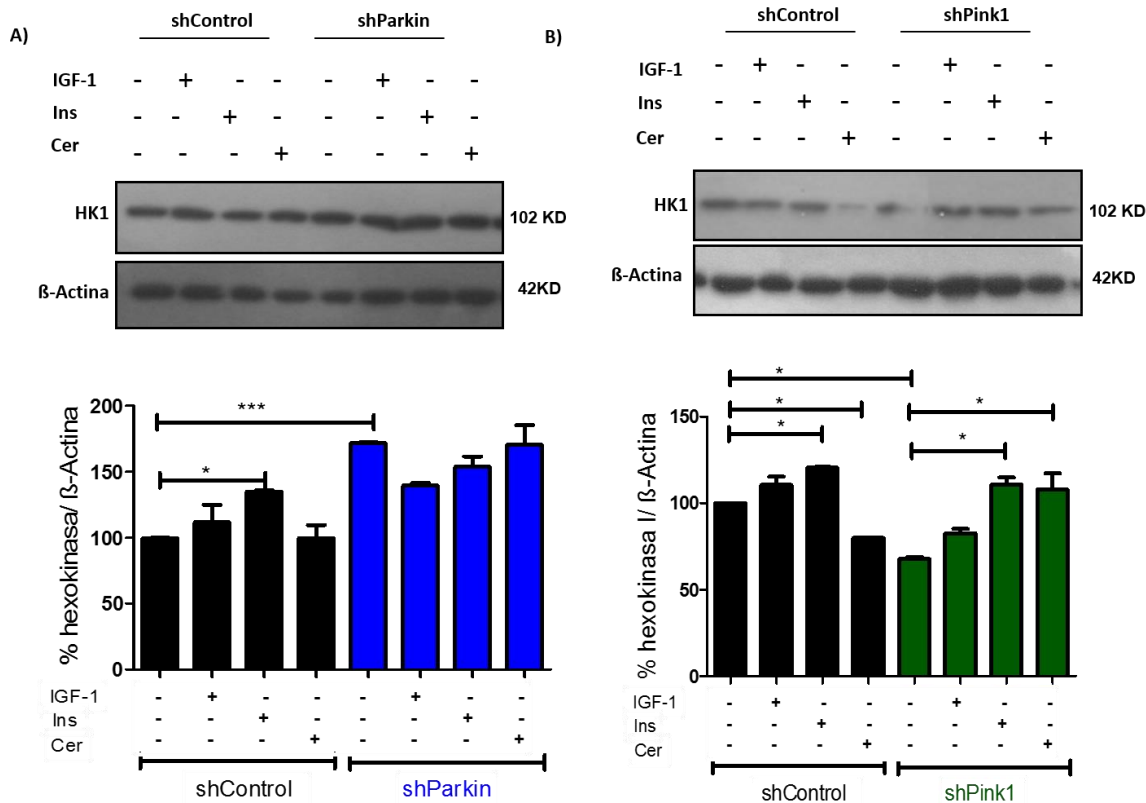


Figura 19. La disminución de la expresión de Pink1 y Parkin altera los niveles de hexoquinasa I.

A) Niveles de HK1 en células shPink1. **B)** Niveles de HK1 en células shParkin tratadas con IGF-1 (100ng/mL), insulina (200ng/mL) y C2-Ceramida (25µM), n=3, ANOVA y prueba Tukey-Kramer.

La HK1 en células CAD se localiza en el citoplasma y puede ser translocada a la mitocondria frente a IGF-1 e insulina mientras que los tratamientos con C2-Ceramida disminuyen su localización mitocondrial. Para evaluar la localización de HK1 las mitocondrias fueron marcadas con mitotracker (200 nM por 45 min). En las células shPink1 y ShParkin en condiciones basales se encontró una disminución en la localización de HK1 en la mitocondria. La disminución de Pink1 reduce la translocación de HK1 a la mitocondria estimulada por IGF-1 e insulina, e intensifica la pérdida de localización mitocondrial frente a C2-Ceramida, este fenotipo es más evidente en las células con disminución de Parkin (Figura 20A).

de HKI se consiguió a las 48 horas (Figura 22A y 22 B). Posteriormente se realizaron los ensayos de WST y LDH y se encontró que la sobreexpresión de HKI en las células shPink1 en condiciones basales logra rescatar el metabolismo mitocondrial y disminuir los niveles de liberación de LDH, lo cual se asocia a una recuperación de la viabilidad celular (Figura 22C-D), mientras que al sobreexpresar HKI en las células shParkin no se evidencia recuperación de la viabilidad y no existe protección frente a C2-Ceramida (Figura 23A-D).

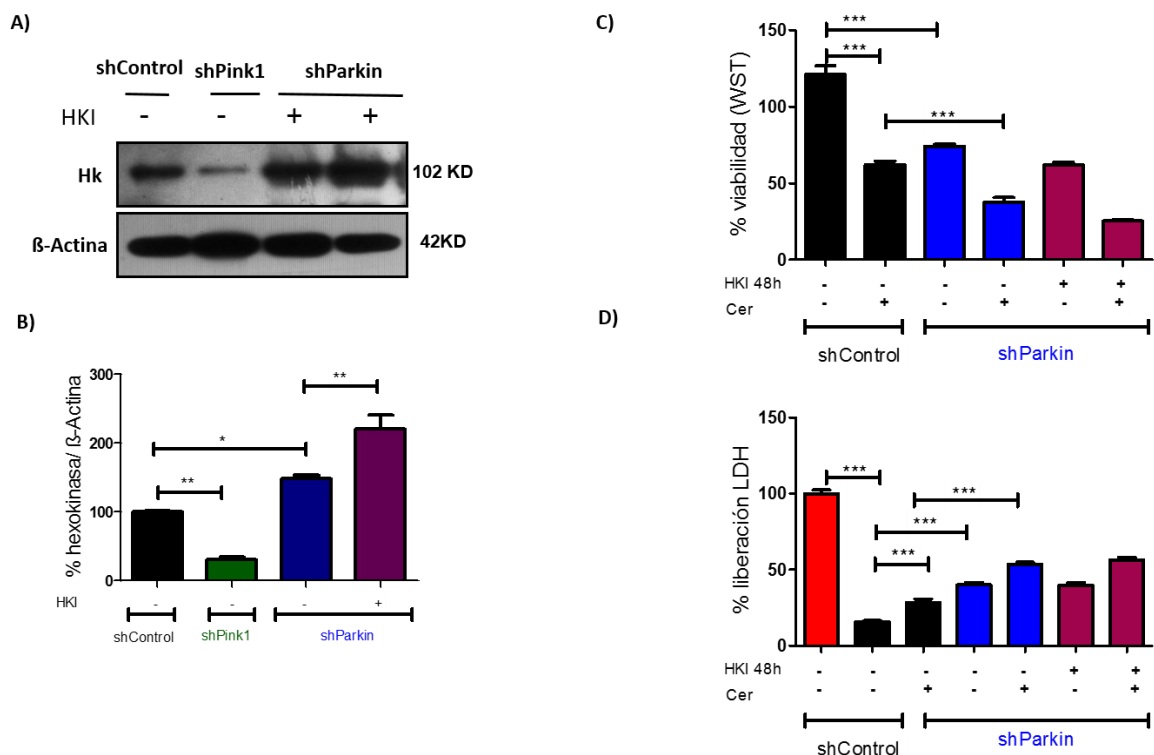


Figura 21. La sobreexpresión de hexoquinasa rescata la viabilidad celular en shPink1.

A) WB sobreexpresión de HKI por 24, 48 y 72 horas en shPink1. **B)** Densitometría niveles de HKI por 24, 48 y 72 horas en shPink1. **C)** Actividad mitocondrial en células shPink1 que sobreexpresan HKI con o sin C2-Ceramida (25 μ M) por 6 horas. **D)** Porcentaje de liberación de lactato deshidrogenasa al medio extracelular en células shPink1 con o sin C2-Ceramida., n=3, ANOVA y prueba Tukey-Kramer.

WB sobreexpresión de HKI en shParkin. **E)** Actividad mitocondrial en células shParkin que sobreexpresan hexoquinasa con o sin C2-Ceramida. **F)** Porcentaje de liberación de lactato deshidrogenasa al medio extracelular en células shParkin con o sin C2-Ceramida

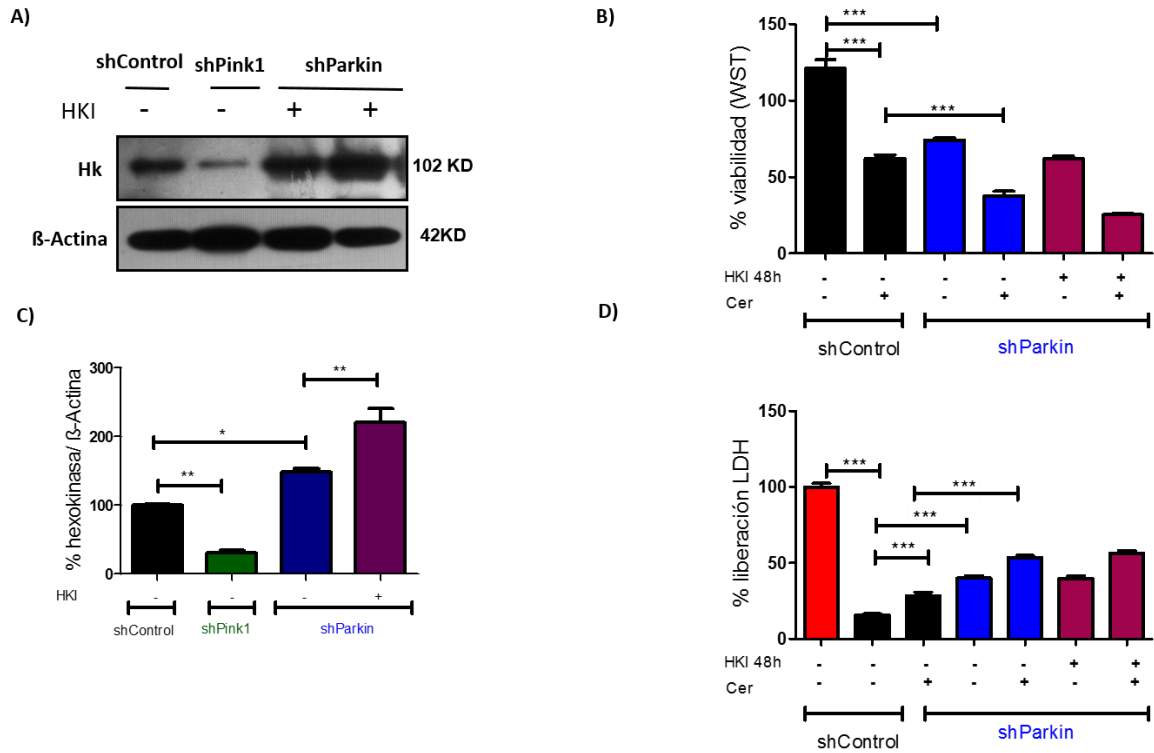


Figura 22. La sobreexpresión de hexoquinasa no rescata la viabilidad celular en shParkin.

A) WB sobreexpresión de HKI por 24, 48 y 72 horas en shParkin. **B)** Densitometría niveles de HKI por 24, 48 y 72 horas en shParkin. **C)** Actividad mitocondrial en células shParkin que sobreexpresan HKI con o sin C2-Ceramida (25 μ M) por 6 horas. **D)** Porcentaje de liberación de lactato deshidrogenasa al medio extracelular en células shParkin con o sin C2-Ceramida., n=3, ANOVA y prueba Tukey-Kramer.

5.2. Discusión

Los estudios en enfermedad de Parkinson se han centrado en la disfunción mitocondrial (218, 219) y recientemente dos de los principales genes mutados en las formas familiares de la enfermedad (Pink1 y Parkin) se han determinado como involucrados en la homeostasis mitocondrial. La función de Parkin se encuentra corriente abajo de Pink1 y parecen ambos actuar en la misma vía molecular regulando la dinámica mitocondrial y la mitofagia (132). Nuestros resultados muestran que las células con la disminución de Pink1 evidencian una disminución de Parkin mientras que las células con la disminución de Parkin no presentan alteraciones en Pink1 (Figura 11), lo cual apoya los estudios previos desarrollados

en *Drosophila* y fibroblastos humanos donde sólo la sobreexpresión de Parkin en células deficientes de Pink1 revierte el fenotipo causado por la ausencia de PINK1 (131). Sin embargo, otros estudios más recientemente desarrollados por Matsui et al., en fibroblastos embrionarios de ratón reportaron que la deficiencia de estos dos genes causa alteraciones en la actividad mitocondrial y demuestran que el fenotipo causado por la pérdida de Parkin puede ser revertido por la sobreexpresión de Pink1 (220). En conjunto estos estudios señalan que Pink1 y Parkin funcionan de manera complementaria para regular la función mitocondrial.

Los ensayos de viabilidad celular muestran una notable disminución de la actividad mitocondrial y un aumento considerable de la liberación de lactato deshidrogenasa en las células con la disminución de Pink1 y Parkin, lo cual se asocia a una disminución de la viabilidad celular. Así mismo se observa una mayor susceptibilidad a la apoptosis inducida por C2-ceramida y una disminución de la respuesta frente a factores de crecimiento como IGF-1 e insulina en las células shPink1 (Figura 12A-B). Estos hallazgos están de acuerdo con varios estudios que evidencian una mayor susceptibilidad en las células deficientes de Pink1 frente a ciertas toxinas como estaurosporina, rotenona, peróxido de hidrógeno, cisplatina, tunicamicina, cloruro de cadmio y C2-Ceramida (30, 137, 168, 169, 221), mientras que su sobreexpresión puede proteger frente a la apoptosis inducida por C2-ceramida (72). Por su parte Parkin también puede proteger frente a tratamientos con MPTP (222), además se encarga de regular los niveles de PGC-1 α , un regulador de la biogénesis mitocondrial (98) y de ubiquitinar varias proteínas proapoptóticas como ARTS, Bax y Bcl-2 (117, 129). Adicionalmente, Parkin participa en la degradación de proteínas alteradas por la oxidación de DA y su metabolismo (130). Sin embargo, la pregunta sigue siendo ¿Cuál son los mecanismos por los cuales Pink1 y Parkin favorecen la supervivencia celular?

Pink1 y Parkin participa en la activación de vías de supervivencia celular como PI3K/AKT y ERK1/2. Nuestros hallazgos señalan una clara disminución de la fosforilación de AKT en las shPink1 y shParkin (Figura 15 y 16), lo cual apoya los estudios realizados por Kim et al., donde se muestra una disminución de la fosforilación de AKT en rodajas de cerebro de ratones deficientes de Pink1 (61).

Sin embargo, hasta la fecha no existen reportes de la deficiencia de activación de AKT relacionados con Parkin y nuestro estudio es el primer reporte de asociación entre Parkin y AKT. Aunque no se conocen reportes acerca de la relación de Pink1/Parkin y ERK1/2, se sabe que ERK1/2 juega un papel importante en el desarrollo de DIL en modelos animales de EP y además se han descrito alteraciones en la activación de proteínas que modulan la transcripción corriente arriba de ERK1/2 como cAMP y DARPP-32 (un regulador clave de la neurotransmisión dopaminérgica) y corriente abajo como MSK1 y la histona 3. Adicionalmente se ha reportado que los receptores de DA pueden regular la señalización de ERK1/2 (86, 223).

Los presentes resultados indican que la disminución de la expresión de Pink1 causa una disminución en la activación de ERK2, la isoforma predominante en el cerebro y que controla positivamente la proliferación celular dependiente de Ras; sin embargo, en las células con disminución de Parkin se encontró una disminución de la expresión de ERK1, el cual está asociado con la inhibición de ERK2 para regular la proliferación celular. Esto puede estar asociado con la participación de Parkin en cáncer; sin embargo, se requieren de nuevos estudios que permitan esclarecer tal interacción (223, 224).

La disminución de Pink1 también afecta otras proteínas blancos de AKT como la fosforilación de GSK3 β (incrementando su función) y la expresión de HKI (Figura 15E), la cual se encuentra disminuida al igual que su actividad y su localización mitocondrial mientras la disminución de Parkin conduce a un incremento de los niveles de HKI (Figura 19 y 20). Este efecto es de gran relevancia teniendo en cuenta la capacidad de la HKI para impedir la translocación de proteínas proapoptóticas como Bax y Bad a la mitocondria, bloqueando de esta manera la liberación del CytC y favoreciendo la supervivencia neuronal. Por otro lado la inhibición de la fosforilación de GSK3 β favorece la translocación de Bax a la mitocondria y activa la apoptosis (184, 185, 196, 225, 226).

Las células con disminución de Parkin evidencian un incremento de la expresión de hexoquinasa, lo cual puede ser explicado por los estudios realizados por Okatsu et al., los cuales señalan que Parkin puede ubiquitinar a hexokinasa I

(Figura 19A) (12); sin embargo, los análisis de actividad y localización indican una deficiencia de la actividad hexoquinasa (Figura 17 y 18), lo que podría explicar la disminución en el metabolismo mitocondrial (Figura 11) y los resultados relacionados con los estudios reportados por McCoy y colaboradores, en los cuáles se resalta la importancia de HKI, HKII y Pink1 para reclutar a Parkin a la mitocondrias dañadas (138); además es importante recalcar que las células shParkin adicionalmente presentan disminución en la expresión de Pink1 (12).

Un gran número de estudios se han centrado en la interacción de Pink1 y Parkin para regular la dinámica mitocondrial (fisión, fusión, mitofagia) (132-134). Si bien nuestros estudios no se centran en la dinámica mitocondrial, si logramos identificar un patrón de distribución característico en las mitocondrias de las células shPink1 y shParkin donde las mitocondrias se observan perinuclearmente a diferencia de las células control donde se evidencian claramente las redes mitocondrias distribuidas a lo largo del soma neuronal (Figura 17). Las mitocondrias perinucleares regulan las ondas de Ca^{2+} y varios estudios han señalado a Pink1 como un regulador del Ca^{2+} ; sin embargo, se requieren de estudios más detallados que puedan vislumbrar el papel de Pink1 en estos procesos (227). Adicionalmente la deficiencia de Pink1 y Parkin muestran una pérdida del potencial de membrana mitocondrial (Figura 18) y recientemente se ha descrito que la disipación del potencial de membrana mitocondrial desencadena la fosforilación tanto de PINK1 como de Parkin para activar la translocación de Parkin a las mitocondrias despolarizadas. Por tanto la deficiencia de Pink1 y Parkin altera el control de calidad de las mitocondrias.

Los cambios observados en los niveles de HKI así como el patrón de distribución mitocondrial encontrados en las células shPink1 y shParkin nos condujeron a evaluar si la sobreexpresión de HK podía revertir la pérdida de viabilidad celular evidenciada en estas líneas celulares, teniendo en cuenta que: a) se ha visto una relación entre el aumento de la expresión de Hk II y la supervivencia celular en diferentes tipos de células (184); b) la sobreexpresión de HK II en neuronas protege contra la muerte celular inducida por rotenona gracias a una mejora en la glicólisis y la unión a mitocondria (189); y c) la vía PI3K/AKT regula la

función HK y la función mitocondrial (190-192). Sin embargo, tal mejoría asociada a sobreexpresión de HK solo fue observada en las células shPink1. Esto puede deberse a que la sobreexpresión de HKI tiene como blanco directo la mitocondria ya que es capaz de unirse a VDAC intramitocondrial y acoplar directamente la síntesis de ATP con el metabolismo de la glucosa bloqueando la translocación de Bax e inhibiendo la apoptosis, y por tanto la pregunta es si la disminución de Parkin y Pink1 afecta la vía de señalización corriente arriba de AKT y ERK1/2, es decir ¿Pueden Pink1 y Parkin regular los RTKs y de esta manera estar involucrado en diversos procesos?

Finalmente nosotros encontramos que la deficiencia de Pink1 y Parkin puede alterar la activación de los RTKs. Las células shPink1 presentan una disminución en la fosforilación del IGF-1R, mientras que las células shParkin muestran una pérdida de fosforilación en IGF-1R e IR (Figuras 13 y 14). Estudios previos señalan que Parkin regula positivamente la vía de supervivencia PI3K/AKT favoreciendo la degradación de EPS15, una proteína adaptadora relacionada con la endocitosis de EGFR (127), y Choi et al., describieron que la pérdida de Pink1 en astrocitos disminuye la expresión de EGFR y causa defectos en la proliferación celular (84). Adicionalmente, los estudios realizados por Lee et al., señalan que Pink1 puede regular la activación de la vía NFK β por medio de la vía IL-1 β mediante la regulación de Tollip e IRAK1 (152). En conjunto estas evidencias resaltan la importancia de desarrollar nuevos estudios que permitan aclarar el papel de Pink1 y Parkin en la regulación de los RTKs (Figura 23)

Estudios recientes han evidenciado el papel transcripcional directo de IGF-1R e IR. Adicional a la vía clásica donde actúan como receptores activados por un ligando que inducen la autofosforilación de su dominio tirosina quinasa para activar IRS-1 y otros sustratos para finalmente promover la activación de varias vías como PI3K/AKT y MAPK se ha demostrado la habilidad de IGF-1R e IR para translocarse al núcleo y actuar como factores de transcripción (228, 229). El mecanismo propuesto para la translocación de IGF-1R al núcleo requiere de la sumoilación de tres residuos de lisina por RanBP2 para activar la transcripción de la ciclina D1 y su autoregulación (230). Un estudio previo ha descrito que Parkin tiene como

blanco a RanBP2 lo cual nos puede dar un indicio de su participación en la regulación de RTKs, sin embargo se requieren de estudios que permitan esclarecer el nuevo paradigma entre Pink1, Parkin y RTKs (231, 232).

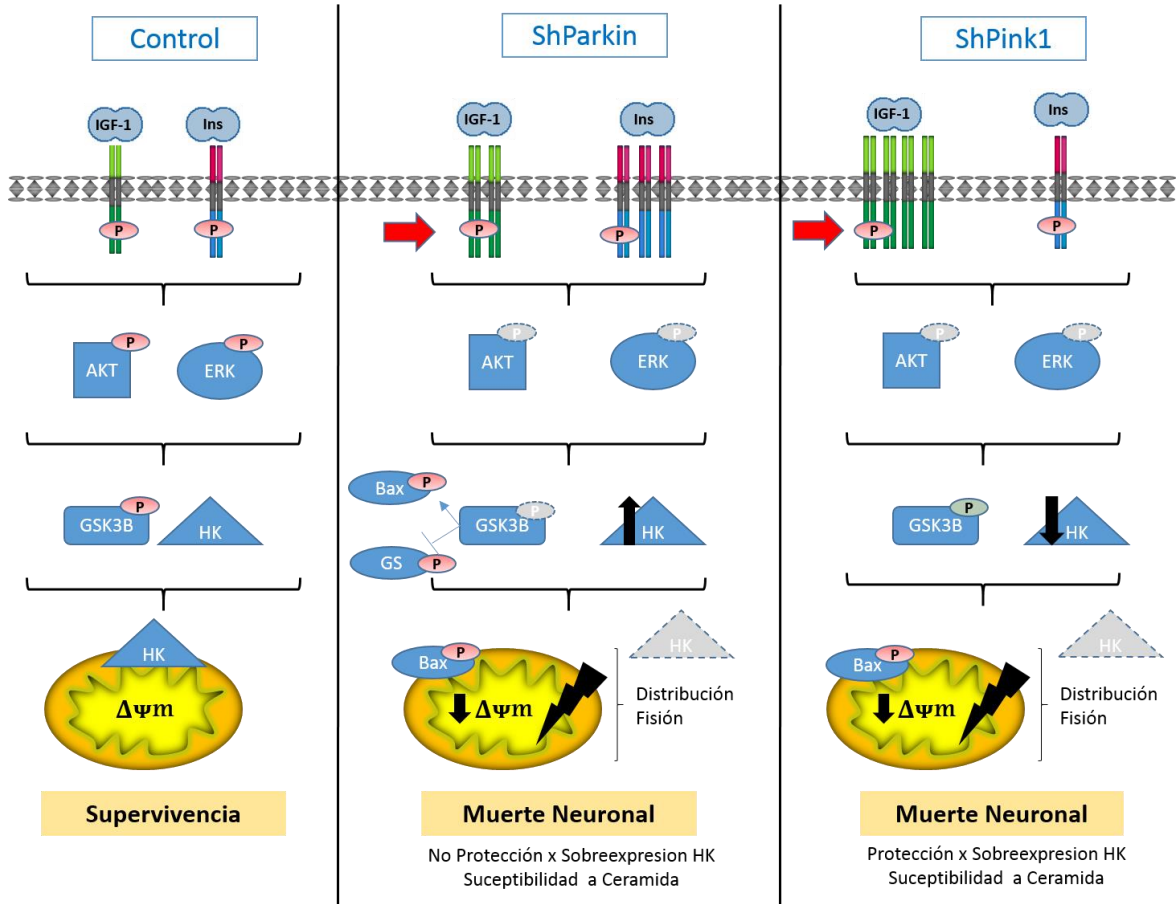


Figura 23. Modelo propuesto de la participación de Pink1 y Parkin en la supervivencia celular.

La disminución de la expresión de Pink1 y Parkin afecta drásticamente la supervivencia celular debido a una disminución en la activación de vías de supervivencia celular como PI3K/AKT y MAPK/ERK1/2, alteraciones en la dinámica mitocondrial, deficiencia en la actividad HKI, estos efectos secundarios son causados por una falla en la activación de los RTKs. La sobreexpresión de HKI en CAD-shPink1 logra recuperar la viabilidad celular debido a que su blanco directo es la mitocondria (impidiendo la translocación de Bax a la mitocondria y regulando VDAC), mientras que en CAD-shParkin aumenta la muerte celular, luego Pink1 y Parkin pueden servir como proteínas de andamiaje entre los RTKs y sus sustratos; regular la endocitocitosis y exocitosis de RTKs o regular la disponibilidad de los sustratos de RTKs como IRS1.

6. Capítulo 6

Conclusiones y Perspectivas

6.1. Conclusiones

La disminución de la expresión de Pink1 y Parkin altera:

- a) viabilidad celular
- b) activación de vías de supervivencia como PI3K/AKT y MAPK/ERK1/2
- c) expresión y actividad hexoquinasa
- d) función y morfología mitocondrial
- e) Estos efectos pueden ser explicados por un defecto en la activación de los RTKs. En este contexto Pink1 y Parkin promueven la neuroprotección regulando directa o indirectamente la fosforilación de los RTKs por lo cual es necesario el desarrollo de nuevos estudios que permitan aclarar la interacción entre Pink1, Parkin y los RTKs.

6.2. Perspectivas

- La función de Pink1 y Parkin en la activación de los RTKs es un punto clave que debe ser investigado, por tanto es necesario realizar ensayos de inmunoprecipitación o pull down que permitan determinar si existe una interacción directa.
- Sobreexpresar los genes contrarios (Pink1 en las shParkin y Parkin en las shPink1) y evaluar si existe una recuperación de la activación de los RTKs.

- Realizar ultracentrifugación diferencial para evaluar la translocación de Parkin y Pink1 a la mitocondria frente a toxinas como C2-Ceramida, rotenona.
- Evaluar los niveles y la activación de los RTKs en cultivos neuronales a partir de ratones deficientes de Pink1 y Parkin.
- Evaluar si la disminución de Pink1 o Parkin puede tener un efecto en síntesis de lípidos y de esta manera regular la composición de la membrana celular para regular indirectamente los RTKs.
- Analizar la participación de Pink1 y Parkin en otro tipo de receptores como TLRs.
- Estudiar la regulación de los RTKs como factores de transcripción y su interacción con Pink1 y Parkin.

7. Bibliografía

1. C. Huerta *et al.*, *Neurosci Lett***413**, 202 (Feb 21, 2007).
2. A. H. Schapira, P. Jenner, *Mov Disord***26**, 1049 (May, 2011).
3. S. Rosner, N. Giladi, A. Orr-Urtreger, *Acta Pharmacol. Sin.***29**, 21 (2008).
4. K. J. Thomas *et al.*, *Hum Mol Genet***20**, 40 (Jan 1, 2011).
5. A. Wood-Kaczmar, S. Gandhi, N. W. Wood, *Trends Mol Med***12**, 521 (Nov, 2006).
6. D. J. Moore, A. B. West, V. L. Dawson, T. M. Dawson, *Annu Rev Neurosci***28**, 57 (2005).
7. H. Braak, E. Ghebremedhin, U. Rub, H. Bratzke, K. Del Tredici, *Cell Tissue Res***318**, 121 (Oct, 2004).
8. J. T. Greenamyre, T. G. Hastings, *Science***304**, 1120 (May 21, 2004).
9. A. H. Schapira, *Lancet Neuro***7**, 97 (Jan, 2008).
10. C. W. Olanow, *Mov Disord***22 Suppl 17**, S335 (Sep, 2007).
11. G. Xiomerisiou *et al.*, *Neurosurg Focus***28**, E7 (Jan, 2010).
12. K. Okatsu *et al.*, *Biochem Biophys Res Commun***428**, 197 (Nov 9, 2012).
13. M. K. McCoy, M. R. Cookson, *Autophagy***7**, (May 1, 2011).
14. K. M. Al-Mansoori, M. Y. Hasan, A. Al-Hayani, O. M. El-Agnaf, *Curr Alzheimer Res***10**, 559 (Jul, 2013).
15. A. B. Singleton *et al.*, *Science***302**, 841 (Oct 31, 2003).
16. S. Lesage *et al.*, *Hum Mutat***28**, 27 (Jan, 2007).
17. I. F. Mata, P. J. Lockhart, M. J. Farrer, *Hum Mol Genet***13 Spec No 1**, R127 (Apr 1, 2004).
18. A. West *et al.*, *Am J Med Genet***114**, 584 (Jul 8, 2002).
19. M. Kann *et al.*, *Ann Neuro***51**, 621 (May, 2002).
20. M. Farrer *et al.*, *Ann Neuro***50**, 293 (Sep, 2001).
21. C. B. Lucking *et al.*, *N Engl J Med***342**, 1560 (May 25, 2000).
22. N. Abbas *et al.*, *Hum Mol Genet***8**, 567 (Apr, 1999).
23. T. Kitada, S. Asakawa, S. Minoshima, Y. Mizuno, N. Shimizu, *Mamm Genome***11**, 417 (Jun, 2000).
24. A. L. DeStefano *et al.*, *Am J Hum Genet***70**, 1089 (May, 2002).
25. M. Farrer *et al.*, *Hum Mol Genet***8**, 81 (Jan, 1999).
26. M. Farrer *et al.*, *Mov Disord***15**, 1075 (Nov, 2000).
27. S. Lincoln *et al.*, *Neuroreport***10**, 427 (Feb 5, 1999).
28. E. Leroy, D. Anastasopoulos, S. Konitsiotis, C. Lavedan, M. H. Polymeropoulos, *Hum Genet***103**, 424 (Oct, 1998).
29. S. Song *et al.*, *J Biol Chem***288**, 5660 (Feb 22, 2013).
30. E. M. Valente *et al.*, *Science***304**, 1158 (May 21, 2004).
31. E. M. Valente *et al.*, *Am J Hum Genet***68**, 895 (Apr, 2001).
32. F. Ghazavi *et al.*, *Mov Disord***26**, 80 (Jan, 2011).
33. V. Bonifati *et al.*, *Neurol.Sci.***24**, 159 (2003).
34. L. Zhang *et al.*, *Parkinsonism Relat Disord***19**, 897 (Oct, 2013).
35. L. J. Ozelius *et al.*, *N Engl J Med***354**, 424 (Jan 26, 2006).

36. Q. Z. Fei *et al.*, *Neurosci Lett***475**, 61 (May 14, 2010).
37. A. Ramirez *et al.*, *Nat Genet***38**, 1184 (Oct, 2006).
38. K. Haugarvoll *et al.*, *Eur J Hum Genet***17**, 336 (Mar, 2009).
39. A. Zimprich *et al.*, *Parkinsonism Relat Disord***15**, 532 (Aug, 2009).
40. N. Pankratz *et al.*, *Hum Mol Genet***12**, 2599 (Oct 15, 2003).
41. R. Kruger *et al.*, *Neurobiol Aging***32**, 548 e9 (Mar, 2011).
42. E. K. Tan *et al.*, *Neurology***75**, 508 (Aug 10, 2010).
43. L. Z. Luo *et al.*, *Neurosci Lett***482**, 86 (Sep 27, 2010).
44. I. F. Mata *et al.*, *Mov Disord***26**, 819 (Apr, 2011).
45. M. E. Gegg *et al.*, *Ann Neuro***72**, 455 (Sep, 2012).
46. J. Nakae, Y. Kido, D. Accili, *Endocr Rev***22**, 818 (Dec, 2001).
47. A. Ullrich *et al.*, *EMBO J***5**, 2503 (Oct, 1986).
48. J. F. Youngren, *Cell Mol Life Sci***64**, 873 (Apr, 2007).
49. T. E. Adams, V. C. Epa, T. P. Garrett, C. W. Ward, *Cell Mol Life Sci***57**, 1050 (Jul, 2000).
50. D. LeRoith, R. Baserga, L. Helman, C. T. Roberts, Jr., *Ann Intern Med***122**, 54 (Jan 1, 1995).
51. S. R. Hubbard, J. H. Till, *Annu Rev Biochem***69**, 373 (2000).
52. N. D. Aberg, K. G. Brywe, J. Isgaard, *ScientificWorldJournal***6**, 53 (2006).
53. L. Plum, M. Schubert, J. C. Bruning, *Trends Endocrinol Metab***16**, 59 (Mar, 2005).
54. V. C. Russo, P. D. Gluckman, E. L. Feldman, G. A. Werther, *Endocrine Reviews***26**, 916 (December 1, 2005, 2005).
55. G. M. Cole, S. A. Frautschy, *Exp Gerontol***42**, 10 (Jan-Feb, 2007).
56. E. Steen *et al.*, *J Alzheimers Dis***7**, 63 (Feb, 2005).
57. M. Tong, M. Dong, S. M. de la Monte, *J Alzheimers Dis***16**, 585 (2009).
58. T. Nagatsu, M. Sawada, *Curr Pharm Des***11**, 999 (2005).
59. T. Nagatsu, M. Mogi, H. Ichinose, A. Togari, *J Neural Transm Suppl*, 277 (2000).
60. S. Benisty, F. Boissiere, B. Faucheux, Y. Agid, E. C. Hirsch, *Neuroscience***86**, 813 (Oct, 1998).
61. R. S. Akundi, L. Zhi, H. Bueler, *Neurobiol Dis***45**, 469 (Jan, 2012).
62. A. H. Schapira, *Neurol Clin***27**, 583 (Aug, 2009).
63. V. Duronio, *Biochem J***415**, 333 (Nov 1, 2008).
64. C. C. Dibble, J. M. Asara, B. D. Manning, *Mol Cell Bio***29**, 5657 (Nov, 2009).
65. R. Wine, C. McPherson, G. Harry, *Neurotoxicity Research***16**, 280 (2009).
66. A. Abeliovich, *Nature***448**, 759 (Aug 16, 2007).
67. E. Hirsch, C. Costa, E. Ciruolo, *J. Endocrinol.***194**, 243 (2007).
68. E. E. Rodgers, A. B. Theibert, *Int J Dev Neurosci***20**, 187 (Jun-Aug, 2002).
69. S. Timmons, M. F. Coakley, A. M. Moloney, C. O' Neill, *Neurosci. Lett.***467**, 30 (2009).
70. K. Nakaso, S. Ito, K. Nakashima, *Neurosci Lett***432**, 146 (Feb 20, 2008).
71. R. Qin *et al.*, *Toxicol Lett***202**, 1 (Apr 10, 2011).
72. R. M. Sanchez-Mora, H. Arboleda, G. Arboleda, *J Mol Neurosci*, (Jan 3, 2012).
73. E. Ohta, F. Kawakami, M. Kubo, F. Obata, *FEBS Lett***585**, 2165 (Jul 21, 2011).
74. Y. Yang *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A***102**, 13670 (Sep 20, 2005).
75. H. Aleyasin *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A***107**, 3186 (Feb 16, 2010).
76. A. H. Kim *et al.*, *Neuron***35**, 697 (Aug 15, 2002).
77. M. J. Devine, H. Plun-Favreau, N. W. Wood, *Nat Rev Cancer***11**, 812 (Nov, 2011).
78. G. Pearson *et al.*, *Endocr Rev***22**, 153 (Apr, 2001).
79. M. Dews *et al.*, *Endocrinology***141**, 1289 (Apr, 2000).
80. E. Castellano, E. Santos, *Genes Cancer***2**, 216 (Mar, 2011).
81. S. Cagnol, J.-C. Chambard, *FEBS Journal***277**, 2 (2010).

82. J. W. Ramos, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology***40**, 2707 (2008).
83. K. Balmanno, S. J. Cook, *Cell Death Differ***16**, 368 (2008).
84. E. K. Kim, E. J. Choi, *Biochim Biophys Acta***1802**, 396 (Apr, 2010).
85. E. Santini *et al.*, *J Neurosci***27**, 6995 (Jun 27, 2007).
86. H. S. Lindgren, K. E. Ohlin, M. A. Cenci, *Neuropsychopharmacology***34**, 2477 (Nov, 2009).
87. Z. Wang *et al.*, *Ann Neuro***70**, 591 (Oct, 2011).
88. X. Gu, K. S. Masters, *Am J Physiol Heart Circ Physiol***296**, H1748 (Jun, 2009).
89. E. D. Plowey, S. J. Cherra, 3rd, Y. J. Liu, C. T. Chu, *J Neurochem***105**, 1048 (May, 2008).
90. A. West *et al.*, *J Neurochem***78**, 1146 (Sep, 2001).
91. S. Y. Kao, *J Biomed Sci***16**, 67 (2009).
92. H. Deng, J. Jankovic, Y. Guo, W. Xie, W. Le, *Biochem Biophys Res Commun***337**, 1133 (Dec 2, 2005).
93. Y. Zhang, V. L. Dawson, T. M. Dawson, *Neurobiol Dis***7**, 240 (Aug, 2000).
94. X. Wang *et al.*, *Cell***147**, 893 (Nov 11, 2011).
95. E. Sakata *et al.*, *EMBO Rep***4**, 301 (Mar, 2003).
96. C. Zhang *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A***108**, 16259 (Sep 27, 2011).
97. J. F. Staropoli *et al.*, *Neuron***37**, 735 (Mar 6, 2003).
98. J. H. Shin *et al.*, *Cell***144**, 689 (Mar 4, 2011).
99. N. Ageta-Ishihara *et al.*, *Mol Brain***6**, 35 (2013).
100. L. Glauser, S. Sonnay, K. Stafa, D. J. Moore, *J Neurochem***118**, 636 (Aug, 2011).
101. L. Fallon *et al.*, *Nat Cell Biol***8**, 834 (Aug, 2006).
102. Y. Ren, J. Zhao, J. Feng, *J Neurosci***23**, 3316 (Apr 15, 2003).
103. J. F. Trempe *et al.*, *Mol. Cell***36**, 1034 (2009).
104. K. Y. Kim *et al.*, *J Clin Invest***121**, 3701 (Sep 1, 2011).
105. D. P. Huynh, D. R. Scoles, T. H. Ho, M. R. Del Bigio, S. M. Pulst, *Ann. Neurol.***48**, 737 (2000).
106. J. C. Dachsel *et al.*, *FEBS Lett***579**, 3913 (Jul 18, 2005).
107. Y. Suzuki *et al.*, *Mol Cell***8**, 613 (Sep, 2001).
108. K. K. Chung, V. L. Dawson, T. M. Dawson, *Trends Neurosci***24**, S7 (Nov, 2001).
109. H. S. Ko *et al.*, *J Neurosci***25**, 7968 (Aug 31, 2005).
110. M. Iguchi *et al.*, *J Biol Chem***288**, 22019 (Jul 26, 2013).
111. S. Geisler *et al.*, *Nat Cell Biol***12**, 119 (Feb, 2010).
112. P. Choi *et al.*, *Brain Res Mol Brain Res***117**, 179 (Oct 7, 2003).
113. V. Munoz-Soriano, R. Nieto-Arellano, N. Paricio, *J Mol Neurosci***48**, 136 (Sep, 2012).
114. H. Wang *et al.*, *J Biol Chem***286**, 11649 (Apr 1, 2011).
115. J. W. Sul *et al.*, *Hum Mol Genet***22**, 1558 (Apr 15, 2013).
116. S. Ekholm-Reed, M. S. Goldberg, M. G. Schlossmacher, S. I. Reed, *Mol Cell Biol***33**, 3627 (Sep, 2013).
117. S. Kemeny *et al.*, *PLoS One***7**, e38837 (2012).
118. D. Chen *et al.*, *J Biol Chem***285**, 38214 (Dec 3, 2010).
119. D. M. Wenzel, A. Lissounov, P. S. Brzovic, R. E. Klevit, *Nature***474**, 105 (Jun 2, 2011).
120. W. Maruyama, M. Naoi, *Nihon Yakurigaku Zasshi***116**, 333 (Dec, 2000).
121. J. F. Trempe, E. A. Fon, *Front Neuro***4**, 38 (2013).
122. F. Yu, J. Zhou, *Neurosci Lett***440**, 4 (Jul 25, 2008).
123. D. J. Moore, *Biochem. Soc. Trans.***34**, 749 (2006).
124. Y. Imai, M. Soda, R. Takahashi, *J Biol Chem***275**, 35661 (Nov 17, 2000).

125. D. H. Hyun *et al.*, *J Biol Chem***277**, 28572 (Aug 9, 2002).
126. F. Darios *et al.*, *Hum Mol Genet***12**, 517 (Mar 1, 2003).
127. S. S. Safadi, G. S. Shaw, *J Biol Chem***285**, 1424 (Jan 8, 2010).
128. C. R. Sunico *et al.*, *Mol Neurodegener***8**, 29 (Aug 28, 2013).
129. B. N. Johnson, A. K. Berger, G. P. Cortese, M. J. Lavoie, *Proc Natl Acad Sci U S A***109**, 6283 (Apr 17, 2012).
130. H. Jiang *et al.*, *Nat Commun***3**, 668 (2012).
131. N. Exner *et al.*, *J Neurosci***27**, 12413 (Nov 7, 2007).

135. G. Wang, J. Pan, S. D. Chen, *Prog Neurobiol***98**, 207 (Aug, 2012).
136. E. Ziviani, A. J. Whitworth, *Autophagy***6**, (Jul 1, 2010).
137. H. Deng, M. W. Dodson, H. Huang, M. Guo, *Proc Natl Acad Sci U S A***105**, 14503 (Sep 23, 2008).
138. M. K. McCoy, A. Kaganovich, I. N. Rudenko, J. Ding, M. R. Cookson, *Hum Mol Genet*, (Aug 19, 2013).
139. M. Unoki, Y. Nakamura, *Oncogene***20**, 4457 (2001).
140. C. Meissner, H. Lorenz, A. Weihofen, D. J. Selkoe, M. K. Lemberg, *J Neurochem***117**, 856 (Jun, 2011).
141. D. Becker, J. Richter, M. A. Tocilescu, S. Przedborski, W. Voos, *Journal of Biological Chemistry*, (April 30, 2012, 2012).
142. M. Lazarou, S. M. Jin, L. A. Kane, R. J. Youle, *Dev Cell***22**, 320 (Feb 14, 2012).
143. A. W. Greene *et al.*, *EMBO Rep***13**, 378 (Apr, 2012).
144. S. M. Jin *et al.*, *J Cell Bio***191**, 933 (Nov 29, 2010).
145. D. P. Narendra *et al.*, *PLoS Bio***8**, e1000298 (Jan, 2010).
146. T. K. Lin *et al.*, *Chang Gung Med J***32**, 589 (Nov-Dec, 2009).
147. J. W. Pridgeon, J. A. Olzmann, L. S. Chin, L. Li, *PLoS Bio***5**, e172 (Jul, 2007).
148. H. Plun-Favreau *et al.*, *Nat Cell Bio***9**, 1243 (Nov, 2007).
149. H. Murata *et al.*, *J Biol Chem***286**, 7182 (Mar 4, 2011).
150. N. Xiong *et al.*, *PLoS One***4**, e7878 (2009).
151. J. Choi, V. V. Batchu, M. Schubert, R. J. Castellani, J. W. Russell, *Biochem Biophys Res Commun***435**, 671 (Jun 14, 2013).
152. J. Lee, S. Giordano, J. Zhang, *Biochem J***441**, 523 (Jan 15, 2012).
153. C. Kondapalli *et al.*, *Open Bio***2**, 120080 (May, 2012).
154. M. M. Muqit *et al.*, *J Neurochem***98**, 156 (Jul, 2006).
155. I. H. Henn *et al.*, *J Neurosci***27**, 1868 (Feb 21, 2007).
156. J. Kim *et al.*, *Exp Neurobiol***22**, 38 (Mar, 2013).
157. W.-L. Chien *et al.*, *Journal of Neurochemistry***117**, 643 (2011).
158. M. Jankowski, *Postepy Biochem***53**, 297 (2007).
159. N. Matsuda *et al.*, *J Cell Bio***189**, 211 (Apr 19, 2010).
160. C. H. Sim *et al.*, *Hum Mol Genet***15**, 3251 (Nov 1, 2006).
161. A. Wood-Kaczmar *et al.*, *PLoS One***3**, e2455 (2008).
162. S. Gandhi *et al.*, *Mol Cell***33**, 627 (Mar 13, 2009).
163. H. L. Wang *et al.*, *Biochim Biophys Acta***1812**, 674 (Jun, 2011).
164. T. Kitada *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A***104**, 11441 (Jul 3, 2007).
165. C. Eggert *et al.*, *Neurology***74**, 1798 (Jun 1, 2010).
166. N. Pavese *et al.*, *Exp Neurol***222**, 120 (Mar, 2010).
167. M. W. Bishop *et al.*, *J Neurophysiol***104**, 3009 (Dec, 2010).
168. A. Petit *et al.*, *J Biol Chem***280**, 34025 (Oct 7, 2005).
169. M. E. Haque *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A***105**, 1716 (Feb 5, 2008).
170. C. Scheele *et al.*, *FASEB J***21**, 3653 (Nov, 2007).
171. P. W. Franks *et al.*, *FASEB J***22**, 3135 (Sep, 2008).

172. L. D. Griffin, B. D. Gelb, V. Adams, E. R. McCabe, *Biochim Biophys Acta***1129**, 309 (Feb 11, 1992).
173. C. Postic *et al.*, *Am J Physiol***266**, E548 (Apr, 1994).
174. R. L. Printz *et al.*, *J Biol Chem***268**, 5209 (Mar 5, 1993).
175. J. E. Wilson, *J Exp Biol***206**, 2049 (Jun, 2003).
176. M. L. Cardenas, A. Cornish-Bowden, T. Ureta, *Biochim Biophys Acta***1401**, 242 (Mar 5, 1998).
177. A. Ruzzo, F. Andreoni, M. Magnani, *Biochem J***331 (Pt 2)**, 607 (Apr 15, 1998).
178. M. Malkki, M. Laakso, S. S. Deeb, *Biochem Biophys Res Commun***205**, 490 (Nov 30, 1994).
179. S. Sebastian, S. Edassery, J. E. Wilson, *Arch Biochem Biophys***395**, 113 (Nov 1, 2001).
180. M. Stoffel *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A***89**, 7698 (Aug 15, 1992).
181. C. Rosano *et al.*, *Structure***7**, 1427 (Nov 15, 1999).
182. S. Kawai, T. Mukai, S. Mori, B. Mikami, K. Murata, *J Biosci Bioeng***99**, 320 (Apr, 2005).
183. R. Brewster, A. Ruiz i Altaba, *Mech Dev***99**, 159 (Dec, 2000).
184. J. G. Pastorino, N. Shulga, J. B. Hoek, *J Biol Chem***277**, 7610 (Mar 1, 2002).
185. J. G. Pastorino, J. B. Hoek, *Curr Med Chem***10**, 1535 (Aug, 2003).
186. H. Azoulay-Zohar, A. Israelson, S. Abu-Hamad, V. Shoshan-Barmatz, *Biochem J***377**, 347 (Jan 15, 2004).
187. W. S. da-Silva *et al.*, *J Biol Chem***279**, 39846 (Sep 17, 2004).
188. N. Majewski, V. Nogueira, R. B. Robey, N. Hay, *Mol Cell Biol***24**, 730 (Jan, 2004).
189. A. Gimenez-Cassina, F. Lim, T. Cerrato, G. M. Palomo, J. Diaz-Nido, *J Biol Chem***284**, 3001 (Jan 30, 2009).
190. A. Waki *et al.*, *Brain Res***894**, 88 (Mar 9, 2001).
191. M. G. Vander Heiden *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A***97**, 4666 (Apr 25, 2000).
192. D. R. Plas, C. B. Thompson, *Trends Endocrinol Metab***13**, 75 (Mar, 2002).
193. A. Godbole, A. K. Dubey, P. S. Reddy, M. Udayakumar, M. K. Mathew, *Protoplasma***250**, 875 (Aug, 2013).
194. R. B. Robey *et al.*, *J Biol Chem***277**, 14370 (Apr 26, 2002).
195. R. B. Robey, J. Ma, A. V. Santos, *Am J Physiol***277**, F742 (Nov, 1999).
196. R. B. Robey, *Kidney Int***79**, 1163 (Jun, 2011).
197. R. N. Kolesnick, M. Kronke, *Annu Rev Physiol***60**, 643 (1998).
198. A. M. Sanchez *et al.*, *Apoptosis***12**, 2013 (Nov, 2007).
199. N. Andrieu-Abadie, T. Levade, *Biochim Biophys Acta***1585**, 126 (Dec 30, 2002).
200. L. M. Obeid, C. M. Linardic, L. A. Karolak, Y. A. Hannun, *Science***259**, 1769 (Mar 19, 1993).
201. Y. A. Hannun, L. M. Obeid, *Trends Biochem Sci***20**, 73 (Feb, 1995).
202. L. M. Obeid, Y. A. Hannun, *J Cell Biochem***58**, 191 (Jun, 1995).
203. M. P. Mattson, R. G. Cutler, D. G. Jo, *Nat Cell Biol***7**, 1045 (Nov, 2005).
204. B. A. Stoica, V. A. Movsesyan, P. M. t. Lea, A. I. Faden, *Mol Cell Neurosci***22**, 365 (Mar, 2003).
205. S. Mathias, L. A. Pena, R. N. Kolesnick, *Biochem J***335 (Pt 3)**, 465 (Nov 1, 1998).
206. L. J. Siskind, R. N. Kolesnick, M. Colombini, *Mitochondrion***6**, 118 (Jun, 2006).
207. L. J. Siskind, M. Colombini, *J Biol Chem***275**, 38640 (Dec 8, 2000).
208. G. Arboleda, C. Waters, R. Gibson, *Neurosci Lett***421**, 245 (Jun 29, 2007).
209. A. Napolitano, A. Pezzella, G. Prota, *Chem Res Toxicol***12**, 1090 (Nov, 1999).
210. G. Arboleda *et al.*, *Neurotoxicology***31**, 687 (Dec, 2010).
211. P. P. Michel, E. C. Hirsch, Y. Agid, *Rev Neurol (Paris)***158 Spec no 1**, S24 (Dec, 2002).

212. K. E. Larsen, D. Sulzer, *Histol Histopathol***17**, 897 (2002).
213. C. Suri, B. P. Fung, A. S. Tischler, D. M. Chikaraishi, *J Neurosci***13**, 1280 (Mar, 1993).
214. M. Lazaroff, S. Patankar, S. O. Yoon, D. M. Chikaraishi, *J Biol Chem***270**, 21579 (Sep 15, 1995).
215. Y. Qi, J. K. Wang, M. McMillian, D. M. Chikaraishi, *J Neurosci***17**, 1217 (Feb 15, 1997).
216. G. D. A. D. Valverde *et al.*, *Brain Res***1198**, 188 (Mar 10, 2008).
217. I. Shin *et al.*, *Nat Med***8**, 1145 (Oct, 2002).
218. E. A. Schon, S. Przedborski, *Neuron***70**, 1033 (Jun 23, 2011).
219. T. Tatsuta, T. Langer, *EMBO J***27**, 306 (Jan 23, 2008).
220. H. Matsui *et al.*, *Hum Mol Genet***22**, 2423 (Jun 15, 2013).
221. C. A. Gautier, T. Kitada, J. Shen, *Proc Natl Acad Sci U S A***105**, 11364 (Aug 12, 2008).
222. T. Yasuda *et al.*, *J Neuropathol Exp Neurol***70**, 686 (Aug, 2011).
223. C. Vantaggiato *et al.*, *J Bio***5**, 14 (2006).
224. R. N. Alcalay, L. N. Clark, K. S. Marder, W. E. Bradley, *Genes Chromosomes Cancer***51**, 1109 (Dec, 2012).
225. J. G. Pastorino, J. B. Hoek, *J Bioenerg Biomembr***40**, 171 (Jun, 2008).
226. N. Majewski *et al.*, *Mol Cell***16**, 819 (Dec 3, 2004).
227. H. Hashitani, R. J. Lang, H. Suzuki, *Br J Pharmacol***161**, 680 (Oct, 2010).
228. B. Sehat, A. Tofigh, Y. Lin *et al.*, *Sci Signal* **3**, 10 (Nov, 2010)
229. T. Aleksic, M. Chitnis, O. Perestenko *et al.*, *Cancer Res*/**70**:6412–6419 (Oct, 2010)
230. S. Sjoström, D. Warsito, O. Larsson, B. Sehat. Growth Hormones IGF Res. **22**:536 (Oct, 2012)
231. S. Rive and H. Werner. *Endocrinology*/**154**:1672 (May 2013)
232. J. Um and K. Chung KC. *J Neurosci Res*/**7**:1543-54 (Nov 2006)