



TESIS DOCTORAL

ACETILACIÓN, AUTOFAGIA Y ENFERMEDAD DE PARKINSON

Sokhna Maryama Seydina Yakhine Diop

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y
Genética

Con la conformidad de los directores:

Dr. José Manuel Fuentes Rodríguez Dra. Rosa Ana González-Polo Dr. José Manuel Bravo-San Pedro

2016

UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA
FACULTAD DE ENFERMERÍA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA
MOLECULAR Y GENÉTICA



Dr. José Manuel Fuentes Rodríguez, catedrático de Escuela Universitaria del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Genética de la Universidad de Extremadura, Facultad de Enfermería y T.O., Universidad de Extremadura.

Dra. Rosa Ana González Polo, investigadora con un contrato destinado a la retención y atracción de Talento investigador, TA13009, de la Junta de Extremadura.

Dr. José Manuel Bravo San Pedro, investigador postdoctoral, financiado por “La Ligue contre le Cancer”, Equipe 11 labellisée Ligue contre le Cancer, Centre de Recherche des Cordeliers, Paris, Francia.

CERTIFICAN:

Que el trabajo de investigación titulado “*Acetilación, Autofagia y Enfermedad de Parkinson*” realizado por Dña Sokhna Maryama Seydina Yakhine DIOP, ha sido realizado bajo su supervisión en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Genética de la Facultad de Enfermería y T.O de la Universidad de Extremadura, y que una vez revisada la presente memoria, como Directores de la misma, consideran que reúne las condiciones requeridas para ser defendida como Tesis Doctoral.

RESUMEN

La enfermedad de Parkinson (EP) es un desorden neurodegenerativo progresivo y crónico. La mayoría de los casos de Parkinson son idiopáticos debido a una combinación de herencia poligénica, una exposición medioambiental y a una interacción genética-medioambiental. Estos factores ejercen mecanismos epigenéticos que modulan la estructura de la cromatina y la expresión de los genes. Las modificaciones epigenéticas son cambios adquiridos de manera reversible con el tiempo y que modifican el fenotipo celular. Uno de los mecanismos involucrados en la patogénesis de la EP es la acetilación de las histonas que está regulada por las actividades de las histonas acetiltransferasas (HATs) y las histonas deacetilasas (HDACs). Esta modificación post-traducciona es dependiente del metabolismo energético y de los niveles de acetil-coenzima A (acetil-CoA) cuya fuente es la mitocondria, un orgánulo alterado en la EP, produciéndose una desregulación de la homeostasis celular. El propósito de esta tesis doctoral es estudiar los niveles de proteínas acetiladas en un modelo de fibroblastos primarios entre grupos idiopático y genético con la mutación G2019S de la proteína LRRK2. Por lo tanto analizamos las actividades de las enzimas involucradas y los niveles de acetil-CoA. Los resultados muestran que hay un desequilibrio de las actividades HATs/HDACs y que los fenotipos entre individuos idiopático y genético son diferentes.

Palabras clave: Acetilacion, acetil-coenzima A, enfermedad de Parkinson, histonas acetiltransferasas, histonas desacetilasas, LRRK2, mitocondria.

ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is a chronic and progressive neurodegenerative disorder. Most of PD cases are idiopathic due to a combination of polygenic inheritance, an environmental exposure and genetic-environmental interaction. These factors promote epigenetic mechanisms that modulate chromatin structure and gene expression. Epigenetic modifications are reversible over time and influence cellular phenotype. One of the mechanisms involved in the pathogenesis of PD is histone acetylation which is regulated by histone acetyltransferases (HATs) and histone deacetylases (HDACs) activities. This post-translational modification depends on the energetic metabolism and the levels of acetyl coenzyme A (acetyl-CoA) whose source is the mitochondrion, an altered organelle in PD, resulting in the dysregulation of cellular homeostasis. The purpose of this thesis is to study the levels of acetylated proteins in a model of primary fibroblasts among idiopathic and genetic groups with the G2019S LRRK2 protein mutation. Therefore, we analyze the activities of involved enzymes and the levels of acetyl-CoA. The results show that there is an imbalance of HATs/HDACs activities and the phenotypes between idiopathic and genetic individuals are different.

Keywords: Acetylation, acetyl-coenzyme A, Parkinson's disease, histone acetyltransferases, histone deacetylases, LRRK2, mitochondria.

AGRADECIMIENTOS

Madre mía, es una de las primeras palabras que he aprendido en Grupo Park. Nunca en mi vida había pensado que un día iba a aterrizar en España y cumplir una tesis doctoral. Estos tres intensos años de investigación han estado llenos de emociones y de dificultades. Sin embargo, lo hemos conseguido, aunque lejos de la familia. Lo hemos conseguido gracias a los compañeros de trabajo, los “Parkinos”. Así, quisiera en primer lugar agradecer a mis directores de tesis, que han sufrido leyendo el manuscrito estos últimos días y preguntándose... ¿qué quiere decir esta chica?!

Gracias al Dr. José Manuel Fuentes por haberme dado la oportunidad de hacer una tesis en su laboratorio y de haber creído en mí. Gracias por no haber sido solamente un jefe, sino también un padre y un amigo. No hubiéramos podido llegar hasta aquí sin tu perseverancia. Encore une fois, ¡Merci beaucoup Jefazo!

Gracias a una dama especial que nunca empieza su día sin preguntar a lo demás cómo les va o cómo les ha ido. Por eso, la llamo Rosana, ¡la maja! Nunca habría reído tanto corrigiendo la tesis... Como dices siempre... “ya es pan comido Sokhnita con J”. ¡Madre mía, qué Mujer!

A mi jefito, Chema Bravo, recuerdo todavía cuando llegué a Cáceres sin una palabra de español en mi diccionario. Y qué es más frustrante en la vida que querer aprender y no entender. Pero tu altruismo y tu paciencia han sido las llaves maestras de mi éxito. Grace mille Bravo San Pedro! Espero, como doctoranda, no haber fallado a estos maravillosos directores de tesis, y que siempre estaréis orgullosos de este trabajo.

Gracias a Rubén, el doctorcito! He aprendido muchísimo a tu lado. Ha sido una pena verte ir cuando solo me quedaban pocos meses. El perfecto maestro, sé que seras un gran científico. Recuerdo todavía nuestras peleas científicas...hay que ser tenaz para volcarte la bolsa, ¡Qué tío!

A Mireia, qué pena que no te haya conocido antes y disfrutar de tu frescura y aprovechar tus consejos.

A mi parejita de labo, Mariete. Gracias por aguantarme y por ayudarme con mucho gusto y muchas veces a esta cabecita podrida. Eres un ángel, Arribas. Te estoy echando de menos y no te has ido todavía. Ya no gritaré tu nombre en los pasillos del labo. Besos...

A María Pura, bella por dentro y por fuera. No hay palabras para agradecerte. Como me gustaría ser como tú. Ah, se me olvidó decirte, me ha cundido el tiempo jeje... Thank you very very much mother...

Gracias a Guada por aguantar nuestro desorden, y nuestro pesadismo ánimo y mucha suerte con esta nueva etapa de tu vida. Gracias a Eli y mucha suerte con lo que te queda

por delante. A Diana, gracias por haberme animado todos estos días de retiro escriptural con este mensaje “U can do it”. Ya veras que tú también. You will.

A mi socia, Elisa Pizarro! Gracias por ser como eres, echo de menos esas conversaciones que nos hacían vocear y nunca nos poníamos de acuerdo. De vez en cuando se nota que he salido de tu escuela jaja... Gracias por esas salidas instantáneas llenas de recuerdos en las calles de Cáceres. Me muero de ganas que saber que lo has logrado. Mucha suerte morenita.

A Raquelita, madre de mi yerno. Se nota que ya no estás, se me está empobreciendo mi diccionario de expresiones. Gracias por aguantar el frío de la navera y el olor de la lejía.

Ha sido un honor y un placer, trabajar con cada uno de vosotros durante todos estos años que no se pueden resumir en una hoja, compartir los momentos más felices de la vida: boda, nacimientos etc. Quién me lo iba decir... Y sí, soy una extremeña más. Recordad, siempre os estaré agradecido. A Jefito, te estamos esperando porque yo quiero ser madrina LoL.

No hubiera podido llegar hasta aquí sin agradecer a todos esos hombres y mujeres en la sombra que han participado en mi formación desde la escuela elementaria hasta la universidad. Empezado por mi padre que ha sido mi primer maestro enseñándome a leer y a escribir. Gracias a todos aquellos profesores del colegio Lamine Gueye de Dakar, de la Facultad de Ciencias de Dhar el Mehraz de Fès, de la Facultad de ciencias de Orsay de Paris, que me han hecho llegar a la puerta de la investigación a través de sus docencias.

Gracias a mis compañeras de piso que nunca me ven. Felisa que siempre me dice “trabajas por todos nosotros”. Verónica que nunca me ve el pelo. Lo siento por haberos abandonado tanto tiempo. Es una maravilla tener tanta paz. ¡Viva las 3 Marías!

Gracias a Carlos Casti y Yolanda por considerarme como un miembro más de la familia, qué sería sin vosotros en Cáceres. Nunca me habían cuidado tanto, siendo lejos de mi familia durante tantos años. Gracias por ser mi padre español, Casti. Que sepas que en esta vida hay pocas gentes que te cuidan sin esperar agradecimiento y nada de vuelta, y eres una de ellas. Que nada ni nadie te cambie, qué envidia te tengo.

Gracias a Vicente por pensar en mí. Gracias a Javier Guisado, a nuestros compañeros de Fisiología, a Victoria (a la que nunca he dejado trabajar en paz, gracias por esas dulces que no nos comemos enseguida por su perfecta elaboración). Gracias a David Cariche y a Mirei por ese día inolvidable de todos los santos. Todavía tengo el sabor del anchopis en la boca. Madre mia...hay que repertirlo..si si. Gracias a Fernando Sánchez nunca olvidaré la mejor paella que he comido en España. Hemos vuelto a probar otra pero no era lo mismo, hemos tirado dinero. No soy comilona pero como una buena senagalesa me gusta el arroz y la paella me vuelve nostálgica. Gracias a Almu por ese día de la feria del queso, madre mia, la próxima vez que vamos a ir menos tikets

Gracias a todos mis amigos que me han apoyado y animado durante este tramo de mi vida que califican de locura. Puede que sí, pero inolvidable y fructífera. Gracias a Mame Diarra Diop, Mourtada Mbacke, Cheikh Bassirou Mbacke, Papa Birame Ndiaye, Coumba Thiam, Soda Balla Diop, Mamadou Moustapfa Sarr. Gracias a Mouhamed Sylla que nunca ha dejado de llamar y preguntar cómo me va, a Mamadou Lamine Diop, Mouhamadou Aballah Tall, Fatou Diongue por siempre haber estado ahí cuando más lo necesitaba.

En fin, gracias a mi familia que nunca ha dejado de apoyarme a pesar de la distancia, de la nostalgia y de mi cabezonería. A mi padre que me ha apoyado en todo momento en mis estudios sin lamentación. A mis hermanos que siempre han sido mis pilares y mis luces para seguir delante y no abandonar. A una gran dama que dejó escrito a su marido que quisiera que su Fuzty sea “un Docteur”. Espero que allá donde estés te sientas orgullosa de tu hija. Descansa en paz, Adja Marième. A mi abuela, Mame Aminata que dejó todo para dedicarse a nosotros. Cada ciclo que terminaba me decía: “Bintou Imran, has saltado un hoyo y quedan otros más grandes”. Hemos saltado juntos todos los hoyos y solo te faltaba este último. Descansa en paz, Mame.

Durante estos últimos días de redacción, he tenido un cocktail de sentimientos que no he podido compartir con nadie. Eran mio y solo mio con ganas de tirar la toalla pero también de luchar y terminar. Esos sentimientos disparados que no se pueden compartir, que no se pueden contar hasta que uno lo entiende han sido lo bonito de la tesis y solo se vive una vez. Hasta aquí hemos llegado, se cierra un camino para abrirse otro.

Cada uno tiene su estrella y la mia es verde

DEDICATORIA

A Adja Marième

A Mame Aminata

A Cheikh Moussa

*IL ne faut pas remettre à demain tout ce qui peut être fait aujourd'hui.
Demain est un autre jour rempli de mystères.*

SMSYDIOP

ÍNDICE

ACRÓNIMOS.....	1
ÍNDICE DE TABLAS	5
ÍNDICE DE FIGURAS	7
1. INTRODUCCIÓN.....	9
1.1. Enfermedad de Parkinson.....	11
1.1.1. Definición y epidemiología	11
1.1.2. Origen	11
1.1.3. Síntomas y tratamientos.....	12
1.1.4. Etiología	13
1.1.4.1. Factores medioambientales.....	13
1.1.4.2. Factores genéticos	14
1.1.4.2.1. La proteína LRRK2	16
1.2. Autofagia	17
1.3. Modificaciones epigénéticas.....	20
1.3.1. La acetilación de histonas.....	22
1.3.1.1. Histonas acetiltransferasas.....	23
1.3.1.1.1. Familia p300/CBP	24
1.3.1.1.2. Familia MYST.....	25
1.3.1.1.3. Familia GNAT	26
1.3.1.2. Histonas desacetilasas.....	27
1.3.1.2.1. Clase I, II y IV	28
1.3.1.2.2. Clase III	31
1.4. Fuentes y destinos del acetil-CoA	33
1.4.1. Síntesis de ácidos grasos y acetil-CoA.....	34
1.4.2. Acetilación y Acetil-CoA	36
2. HIPÓTESIS	37
3. OBJETIVOS	41
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	45
4.1. Materiales	47
4.1.1. Aparatos.....	47
4.1.2. Reactivos	48
4.2. Métodos	52
4.2.1. Líneas celulares	52
4.2.2. Mantenimiento celular.....	53
4.2.2.1. Descongelación y congelación	53
4.2.2.2. Cultivos celulares	54
4.2.3. Extracción del ADN genómico	54
4.2.3.1. Amplificación del exón 41 del gen LRRK2 por PCR	55
4.2.3.2. Análisis de restricción	56
4.2.4. Tratamientos	57

4.2.5. Detección de los niveles de expresión de proteínas	57
4.2.5.1. Cuantificación de proteínas	58
4.2.5.2. Electroforesis	59
4.2.5.3. Transferencia	60
4.2.5.4. Revelado	62
4.2.6. Actividad colorimétrica de las HDACs	62
4.2.7. Actividad colorimétrica de las HATs	63
4.2.8. Determinación de acetil-CoA por fluorimetría.....	64
4.2.8.1. Desproteínización de las muestras.....	65
4.2.8.2. Cantidad de acetil-CoA	65
4.2.9. Expresión de los niveles de ARN mensajeros (ARNm) por PCR.....	66
4.2.9.1. Extracción del ARN total	67
4.2.9.2. Calidad del ARN	67
4.2.9.3. Síntesis del ADN complementario (ADNc).....	67
4.2.9.4. PCR cuantitativa a tiempo real	68
4.2.10. Viabilidad celular	70
4.2.10.1. Método del MTT	70
4.2.10.2. Anexina V-FITC / Yoduro de propidio (IP).....	70
4.2.10.3. Potencial de membrana mitocondrial	71
4.2.10.4. Niveles de ROS	71
4.2.11. Inmunofluorescencia	72
4.2.12. Silenciamiento de genes por siARN.....	73
5. RESULTADOS.....	75
5.1. Variación de los niveles de proteínas acetiladas en modelos celulares de EP	77
5.2. Actividad de las histonas acetiltransferasas.....	78
5.3. Niveles de expresión de las HATs.....	79
5.4. Modificaciones epigenéticas de histonas en fibroblastos de enfermos portadores de la mutación G2019S de LRRK2	82
5.5. Diminución de la actividad de las histonas desacetilasas en fibroblastos idiopáticos.....	84
5.6. Niveles de expresión de las HDACs de Clases I y II	85
5.7. Modificación de los niveles de expresión de las HDACs de Clase III.....	87
5.8. Incremento de la actividad de SIRT1 en los individuos G2019S.....	87
5.9. Efecto de los inhibidores de las HDACs de Clase I, II y III en los fibroblastos .	90
5.10. Metabolismo	93
6. DISCUSIÓN.....	99
7. CONCLUSIONES.....	107
8. BIBLIOGRAFÍA	111

ACRÓNIMOS

6-OHDA	6-hidroxidopamina
ACC	Acetil-CoA carboxilasa
AceCS1	Acetil-CoA sintasa 1
AceCS2	Acetil-CoA sintasa 2
ACTR	del inglés <i>Activated thyroid and retinoid receptor</i>
ACLY	ATP- citrato liasa
AGS	Ácido graso sintasa
ANK	del inglés <i>Ankyrin repeat</i>
AKT	del inglés <i>Serine-threonine kinase</i>
AMP	del inglés <i>Adenosin monophosphate</i>
AMPK	del inglés <i>AMP-activated protein kinase</i>
ARM	del inglés <i>Armadillo repeat</i>
Atg	del inglés <i>Autophagy-related genes</i>
Brap2	del inglés <i>BRCA1-associated protein 2</i>
BCOR	del inglés <i>Bcl-6-interacting co-repressor</i>
BCA	del inglés <i>Bicinchonic acid</i> , ácido bicinchonínico
BECN1	Beclina 1
CaMKK	del inglés <i>Calcium/calmodulin-dependent kinase</i>
CPT-1	del inglés <i>carnitine palmitoyltransferase</i>
CBP	del inglés <i>CREB-binding protein</i>
CtBP	del inglés <i>C-terminal binding protein</i>
CL	Cuerpos de Lewy
CobB	del inglés <i>Cobalamin, vitamin B12</i>
Coenzima A	CoA
COR	del inglés <i>C-terminal of Roc</i>
CoREST	del inglés <i>Corepressor REST (repressor element 1 silencing transcription factor)</i>
CREB	del inglés <i>cAMP response element-binding protein</i>
Ct	del inglés <i>threshold cycle</i>
DA	Dopamina
DCC	del inglés <i>Dosage compensation complex</i>
DMEM	del inglés <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMEM/F12	del inglés <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient F-12</i>
EA	Enfermedad de Alzheimer
EH	Enfermedad de Huntington
ELA	Esclerosis lateral amiotrófica
EP	Enfermedad de Parkinson
ERK	del inglés <i>Extracellular signal-regulated kinase 1/2</i>
Esa1	del inglés <i>Essential Sas family acetyltransferase 1</i>
ERO	Especies reactivas del oxígeno

FADD	del inglés <i>Fas-Associated protein with Death Domain</i>
Gcn5	del inglés <i>General control nonderepressible-5</i>
H	Horas
H1	Histona 1
H2A	Histona 2A
H2B	Histona 2B
H3	Histona 3
H4	Histona 4
H3K14	Histona 3 lisina 14
H4K8	Histona 4 lisina 8
HAT	Histona acetiltransferasa
Hat1	Histona acetiltransferasa 1
HDA1	Histona deacetilasa-1
HDAC	Histona deacetilasa
Hsp90	del inglés <i>heat shock protein 90</i>
hMOF	del inglés <i>human MOF</i>
HRP	del inglés <i>horseradish peroxidase</i>
HUB	del inglés <i>HDAC6-USP3-Brap2-related zinc finger</i>
LC3	del inglés <i>microtubule-associated protein 1 light chain 3</i>
LRR	del inglés <i>Leucine rich-repeat</i>
LRRK2	del inglés <i>Leucine rich-repeat-kinase 2</i>
MAO-B	Monoamina oxidasa B
MAPK	del inglés <i>Mitogen activated protein kinase</i>
MAPKKK	del inglés <i>Mitogen activated protein kinase kinase kinase</i>
MEF2	del inglés <i>Myocyte enhancer factor 2</i>
Min	Minutos
MnSOD	del inglés <i>Manganese-dependent superoxide dismutase</i>
MOF	del inglés <i>Males absent on the first</i>
MOZ	del inglés <i>Monocytic leukemia zinc finger protein</i>
MPP⁺	1-metil 4-fenilpiridinio
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
mTORC1	del inglés <i>mammalian target of rapamycin complex 1</i>
MYST	(MOZ, Ybf2/Sas3, Sas2, y Tip60)
NAD⁺	del inglés <i>Nicotinamide adenine dinucleotide</i>
NES	del inglés <i>Nuclear export signal</i>
N-CoR	del inglés <i>Nuclear receptor corepressor</i>
NF-κB	del inglés <i>Nuclear factor-κB</i>
NLS	del inglés <i>Nuclear localization signal</i>
Nrf-2	del inglés <i>Nuclear factor (erythroid-derived)-like 2</i>
NuA3	del inglés <i>Nucleosomal acetyltransferase of histone H3</i>
NuA4	del inglés <i>Nucleosomal acetyltransferase of histone H4</i>
NuRD	del inglés <i>Nucleosome-remodeling HDAC</i>
PCAF	del inglés <i>p300/CREB-binding protein-associated factor</i>

PCAF-HD	del inglés <i>PCAF homology domain</i>
PFA	Paraformaldehido
PHD	Piruvato deshidrogenasa
PhD	del inglés <i>Plant homeo domains</i>
PI3K/AKT	del inglés <i>phosphatidylinositol 3-kinase/serine-threonine kinase</i>
PINK1	del inglés <i>PTEN-induced putative kinase 1</i>
PKA	Protein kinase A
p-mTOR	del inglés <i>phospho-mTOR</i>
$\Delta\Psi_m$	Potencial de membrana mitocondrial
PQ²⁺	Paraquat
RPD3	del inglés <i>Reduced potassium dependency 3</i>
Roc	del inglés <i>Ras of Complex</i>
RIP	del inglés <i>Receptor-interacting protein</i>
SAS2/SAS3	del inglés <i>Something about silencing 2 y 3</i>
SAGA	del inglés <i>Spt-Ada-Gcn5-Acetyltransferase</i>
Sin3	del inglés <i>Swi-independent 3</i>
Sir2	del inglés <i>Silencing information regulator gene 2</i>
SMRT	del inglés <i>Silencing mediator for retinoid and thyroid receptors</i>
SNCA	α -sinucleína
SNpc	del latín <i>Sustancia negra pars compacta</i>
SREBP-1	del inglés “ <i>sterol regulatory element binding protein-1</i> ”
SUP	Sistema ubiquitin-proteasoma
Swi/Snf	del inglés <i>Switch/Sucrose-non fermentable</i>
TBE	Tris/ácido bórico/EDTA
TSA	Tricostatina A
Tip60	del inglés <i>TAT-interacting protein 60</i>
TRADD	del inglés <i>Tumor necrosis factor receptor type 1-associated DEATH domain protein</i>
TTBS	del inglés <i>Tween Tris Buffer Saline</i>
ULK1	del inglés <i>Uncoordinated-51-like protein kinase</i>
USP3	del inglés <i>Ubiquitin-specific protease 3</i>
WT	del inglés <i>Wild type</i>

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1: Loci identificados en parkinsonismo familiar	15
Tabla 1.2: Resumen de las diferentes familias HATs y sus sustratos	25
Tabla 1.3: Las diferentes clases de HDACs y sus distintos miembros y localización celular	28
Tabla 4.1: Presentación de los tres grupos de individuos.....	52
Tabla 4.2: Componentes de la reacción de PCR convencional	55
Tabla 4.3: Condiciones de amplificación de la reacción de PCR para LRRK2	55
Tabla 4.4: Reacción de la enzima de restricción	56
Tabla 4.5: Inhibidores utilizados para bloquear diferentes vías de señalización.....	57
Tabla 4.6: Composición del tampón NP40.....	58
Tabla 4.7: Preparación de la recta de calibración y de las muestras a cuantificar.....	58
Tabla 4.8: Composición del tampón de carga o de desnaturalización.....	59
Tabla 4.9: Composición del tampón de electroforesis Laemli 1X	59
Tabla 4.10: Composición del tampón de transferencia tris/glicina/metanol 1X	60
Tabla 4.11: Composición de la solución de lavado y de dilución de los anticuerpos	60
Tabla 4.12: Características y diluciones de los anticuerpos primarios específicos para cada proteína estudiada	62
Tabla 4.13: Preparación e incubación de las muestras en una placa de 96 pocillos de fondo en U a 37°C	63
Tabla 4.14: Preparación de la recta de calibrado en una placa de 96 pocillos de fondo en U a 37°C	63
Tabla 4.15: Preparación de las muestras en una placa de 96 pocillos de fondo llano	64
Tabla 4.16: Preparación y tiempo de incubación de la recta de acetil-CoA standard y de la muestra desproteínizada para medir la cantidad de acetil-CoA por reacción fluorimétrica.....	66
Tabla 4.17: Oligonucleótidos de sentido y anti-sentido de los genes a amplificar	69
Tabla 4.18: Los componentes de la reacción de PCR a tiempo real	69
Tabla 4.19: Ciclos térmicos y tiempo de amplificación de la reacción de la PCR cuantitativa a tiempo real.....	69
Tabla 4.20: Clasificación de la muerte celular con los marcajes de anexina V e IP ..	71
Tabla 4.21: Relación de anticuerpos primarios y secundarios usados en inmunofluorescencia	72

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1: Estructura de la proteína LRRK2.....	16
Figura 1.2: Las diferentes etapas de la macroautofagia.....	18
Figura 1.3: Código epigenético de las histonas.....	22
Figura 1.4: Regiones conservadas en las tres familias HATs.....	24
Figura 1.5: Estructura de p300/CBP, Tip60, hMOF y PCAF.....	27
Figura 1.6: Estructuras de las HDACs de clase I y II.....	30
Figura 1.7: Reacción de desacetilación con las sirtuinas.....	31
Figura 1.8: Síntesis y oxidación de acetil-CoA.....	35
Figura 4.1: Niveles de acetilación en cultivos primarios de fibroblastos humanos ...	53
Figura 4.2: Determinación de la mutación G2019S LRRK2 en los fibroblastos	56
Figura 5.1: Acetilación de proteínas en modelos celulares de la enfermedad de Parkinson	77
Figura 5.2: Inmunofluorescencia de los niveles de proteínas totales acetiladas en modelos de EP	78
Figura 5.3: Actividad global de las HATs en fibroblastos y neuronas.....	79
Figura 5.4: Expresión de ARNm de tres familias distintas de HATs.....	80
Figura 5.5: Expresión proteínica de PCAF y Tip60 en modelos idiopático y genético de Parkinson.....	81
Figure 5.6: Hiperacetilación de Histona 4 en fibroblastos G2019S	82
Figura 5.7: Efecto del ácido anacárdico sobre la acetilación de las histonas	83
Figura 5.8: Efecto citoprotector del ácido anacárdico en los idiopáticos.....	84
Figura 5.9: Actividad global de HDACs en fibroblastos y neuronas.....	85
Figura 5.10: Expresión del ARNm de las HDACs de clase I y II en células neuronales y fibroblastos	86
Figura 5.11: Niveles de expresión génica de las sirtuinas o HDACs de clase III	88
Figura 5.12: Expresiones de las proteínas sirtuinas en fibroblastos procedentes de enfermos de Parkinson y controles	89
Figura 5.13: Efecto dosis-respuesta de TSA y de NAM en fibroblastos.....	91
Figura 5.14: Efecto citotóxico de los inhibidores HDACs en fibroblastos primarios	92
Figura 5.15: TSA incrementa los niveles de acetilación de la histona 3.....	93
Figura 5.16: Concentración de acetil-CoA en fibroblastos	93
Figura 5.17: Nivel de expresión de ACLY en fibroblastos y en neuronas.....	94
Figura 5.18: Nivel de expresión de las enzimas lipogénicas en fibroblastos y en neuronas	95
Figura 5.19: Nivel de expresión de ACC y AMPK α en fibroblastos y neuronas.....	96
Figura 5.20: Efecto de la inhibición de AMPK α en fibroblastos	97
Figura 6.1: Cadena de transporte electrónico mitocondrial.....	105

1. INTRODUCCIÓN

1.1. ENFERMEDAD DE PARKINSON

1.1.1. Definición y epidemiología

Las enfermedades neurodegenerativas son procesos progresivos y crónicos caracterizados por una pérdida de neuronas en diferentes regiones del sistema nervioso. Las enfermedades neurodegenerativas más prevalentes son la enfermedad de Alzheimer (EA) y la enfermedad de Parkinson (EP), aunque existen otras enfermedades importantes, como la enfermedad de Huntington (EH), ataxia esclerótica lateral amiotrófica (ELA), etc. [1].

La EP fue descrita por primera vez por James Parkinson en 1817 en su estudio titulado *An Essay on the shaking palsy* [2]. Se trata de un desorden neurodegenerativo, definido como un síndrome asociado a lesiones neuropatológicas muy específicas. La EP, como ya se ha indicado, es una de las enfermedades neurodegenerativas más comunes en la población mundial, que afecta a un 2% de la población mayor de 65 años diagnosticándose 5-24 casos por cada 100.000 habitantes [3].

Los primeros síntomas de la enfermedad suelen aparecer alrededor de los 60 años, llegando a la incapacidad en el transcurso de 5 ó 15 años [4]. La incidencia de este desorden neurodegenerativo se incrementa con la edad afectando a más de un 3% de la población mayor de 65 años, aunque en los últimos 40 años, la edad de inicio ha ido anticipándose siendo ya frecuente a partir de los 50. En Extremadura afecta a unas 266 personas por cada 100.000 habitantes, algo superior a la media de España (200 por cada 100.000 habitantes).

1.1.2. Origen

Las alteraciones motoras características de la EP son debidas a la destrucción, de al menos el 50%, de ciertas células nerviosas que residen en el troncoencéfalo y que comunican con una región situada por debajo de la corteza. Más específicamente las neuronas afectadas son las que presentan una pigmentación oscura, se encuentran en la sustancia negra del troncoencéfalo y envían proyecciones a un dominio superior denominado estriado en razón de su aspecto. Las neuronas afectadas son las que, en condiciones normales, colaboran con el control del movimiento mediante la liberación de un mensajero químico, el neurotransmisor dopamina (DA), en el estriado. Las células del estriado reconducen a su vez el mensaje de la DA a través de los centros cerebrales controladores del movimiento hasta la corteza, que se sirve de tal información para determinar cómo deben, en última instancia, comportarse los músculos.

En los pacientes con EP, la pérdida de neuronas dopaminérgicas en el mesencéfalo es selectiva, produciéndose particularmente en la sustancia negra *pars compacta* (SNpc) (80-90 %), menor en el área ventral tegmental (40-50 %) y mínima en la sustancia gris central (2-3 %). La ruta dopaminérgica nigroestriatal es la que contribuye al control de las funciones motoras, y su ruptura resulta en la clásica triada motora de la EP (aquinesia/hipoquinesia, bradiquinesia, rigidez y temblor en reposo) [5]. La pérdida de las células dopaminérgicas está asociada a la presencia de inclusiones eosinófilas intracelulares, denominadas cuerpos de Lewy (CL) [6], formadas por varias proteínas (SNCA, ubiquitina, neurofilamentos, proteínas oxidadas/nitradas) rodeados por melanina. La distribución de los CL en los cerebros con EP ha ido adquiriendo importancia para el diagnóstico de la enfermedad, ya que parece que se puede establecer una correlación entre la aparición y localización de este desorden con los distintos estadios de la enfermedad [7].

1.1.3. Síntomas y tratamientos

Clínicamente la EP es un desorden neurodegenerativo caracterizado por síntomas motores tales como hipoquinesia (disminución del movimiento), bradiquinesia, (lentitud en el desarrollo de los movimientos), rigidez de los miembros y temblor en reposo, y por otros síntomas no motores tales como deterioro cognitivo, alteraciones autonómicas (déficit olfativo, y alteración del tracto gastrointestinal), trastornos en el sueño (sonambulismo), y problemas afectivos y de comportamiento (psicosis) [8, 9]. Sin embargo, estos síntomas varían notablemente entre pacientes, y lo que es más, varían en el mismo paciente a lo largo del transcurso de la enfermedad, por lo que resulta muy difícil tipificar la clínica de esta patología, así como establecer subtipos [10]. Estos pacientes suelen responder bien a un tratamiento con L-DOPA. Siempre que es posible, una confirmación histopatológica postmortem, asegura el diagnóstico.

Para que la sintomatología aparezca, se deben perder hasta el 90 % de las neuronas dopaminérgicas como consecuencia de la reducción drástica de las concentraciones de dopamina estriatal. Esto podría justificar por qué los síntomas parkinsonianos se manifiestan en zonas restringidas del cuerpo al inicio de la patología, y luego se extienden bilateralmente a las partes restantes del mismo. En situación normal, estas neuronas colaboran en el control del movimiento a través de la liberación del neurotransmisor químico DA, al cuerpo estriado, para que a su vez, se transfiera la información hasta la corteza cerebral y ésta dirija el comportamiento de la musculatura. La vulnerabilidad de este grupo neuronal puede ser entre otros factores debida al metabolismo de la DA [11], ya que genera especies reactivas de oxígeno que oxidan lípidos y otros compuestos, incrementando el estrés oxidativo y dañando la función mitocondrial [12].

1.1.4. Etiología

En la actualidad, la etiología de la EP está por esclarecer. En la mayoría de los casos su aparición es esporádica, siendo un desorden idiopático con un origen multifactorial en el cual la susceptibilidad genética combinada con la exposición a ciertos factores medioambientales, pueden actuar como desencadenante para la aparición de la enfermedad. Hay un porcentaje muy pequeño de enfermos con la forma monogénica de la enfermedad, es decir, que su transmisión sigue un patrón puramente mendeliano, ya que en su mayoría los genes relacionados con la EP (genes *PARK*) no siguen este patrón. Se estima que un 15-20 % de los pacientes totales presentan antecedentes familiares [13, 14].

El descubrimiento de la toxina 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) [15], que produce una muerte selectiva de las neuronas de la sustancia negra en modelos humanos y experimentales [16], e induce síntomas similares a los observados en casos de parkinsonismo, abrió la puerta a la posibilidad de que los factores medioambientales pudieran estar relacionados con la enfermedad. Hoy en día una gran cantidad de pesticidas, herbicidas y productos químicos industriales se han relacionado con el desarrollo de la enfermedad. Entre los compuestos más estudiados encontrados destacan la rotenona, una sustancia de origen vegetal utilizado como insecticida y que actúa como un potente inhibidor del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial, 6-hidroxdopamina (6-OHDA), neurotoxina que induce estrés oxidativo [17], o compuestos biperidínicos, tales como el 1-metil 4-fenilpiridinio (MPP⁺), derivado del MPTP o el herbicida paraquat (PQ²⁺), estudiados ampliamente en su participación en procesos neurodegenerativos [18-22]. Por lo tanto, el conocimiento de los factores genéticos implicados en esta enfermedad es de suma importancia cuando se trata de aclarar las posibles causas y mecanismos que se producen durante el desarrollo de la enfermedad.

Existen datos suficientes en la literatura científica para poder afirmar que la edad es el principal factor de riesgo en el desarrollo de esta patología [1, 23], ya que durante la vejez, las células exhiben una mayor incapacidad y grado de disfunción que conducen de forma irrevocable al estrés celular y a una mayor demanda energética [24].

1.1.4.1. Factores medioambientales

El descubrimiento e identificación de la toxina MPTP a principios de 1980, reforzó aún más la teoría medioambiental [25]. Estudios más exhaustivos demostraron que el MPTP tiene la capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica y es convertido por la monoamina oxidasa B (MAO-B) en una molécula más reactiva, el ion MPP⁺, el cual se acumula en las células dopaminérgicas degenerándolas como resultado de la inhibición del complejo I mitocondrial, aumento de los niveles de estrés oxidativo y redistribución

de la DA desde las vesículas hacia el citosol [15, 26]. La exposición crónica a esta toxina en roedores (excluyendo a las ratas que muestran resistencia), primates y seres humanos conduce hacia un síndrome parkinsoniano, por lo que el MPTP y el MPP⁺ son ampliamente usados tanto *in vivo* como *in vitro* como herramientas de degeneración nigral [27]. En este sentido existen numerosos estudios que identifican a un amplio rango de sustancias tales como: metales (hierro, cobre, litio, vanadio) [28-30] o compuestos químicos industriales (cipermetrina, bifenilos policlorados) [31-35]. Particularmente, PQ²⁺, y la exposición a maneb ha sido en gran parte asociada con EP, promoviendo daño celular [20, 21, 34-36]. Otros plaguicidas, tales como la rotenona, dieldrín y diquat también se ha demostrado que reproducen algunas de las características de la EP en modelos animales.

1.1.4.2. Factores genéticos

Los antecedentes familiares con EP pueden predisponer al individuo a desarrollar la enfermedad. Los estudios realizados en familias con herencia mendeliana (5-10 %) han aportado importantes datos en cuanto al conocimiento de los mecanismos que subyacen a la patología. En 1997 se identificó una mutación de herencia autosómica dominante en el gen que codifica para la proteína SNCA (α -sinucleína) (gen *PARK1*) en una familia italiana [37]. Un año más tarde el grupo de Spillantini descubrió, en estudios en autopsias, que esta proteína era la principal componente de los CL [38]. Tras el descubrimiento de este gen, se han ido identificando en años sucesivos, otros genes implicados en la EP y que están recogidos en la **Tabla 1.1**. En la actualidad un total de 20 loci han sido descubiertos [39]. Entre los genes más relevantes y de los que más se conoce en la actualidad podemos destacar el gen que codifica la proteína de parkina, *PARK2* [40], que ha sido identificado en una forma juvenil de la enfermedad, con herencia autosómica recesiva [40]. Parkina es una ubiquitina ligasa E3 responsable de la adición de ubiquitina a sustratos específicos, dirigidos a ellos para la degradación por el proteasoma. La participación de parkina en la vía ubiquitina-proteasoma refuerza la hipótesis de que la degradación de proteínas y agregación son central en la patogénesis de la EP. La frecuencia de mutaciones en parkina disminuye al aumentar la edad de aparición de la enfermedad, y las mutaciones son poco frecuentes en pacientes con aparición tardía de la EP. Estudios posteriores identificaron nuevas mutaciones clave en la EP como en el caso de una mutación en la proteína DJ-1 en las familias holandesas e italianas [41-43], responsable de una variante autosómica recesiva de parkinsonismo de inicio temprano. DJ-1 es un oncogén localizado en el citoplasma y las mitocondrias de las neuronas, y participa en la respuesta al estrés oxidativo [22]. Por otra parte se ha descrito una mutación en el gen que codifica PINK1 (del inglés *PTEN-induced putative kinase 1*) que podría causar un fracaso metabólico y la muerte neuronal en la sustancia negra [44]. PINK1 es un supresor de tumor con una quinasa serina-treonina y un motivo con orientación mitocondrial. Se acumula en el espacio intermembranar de las mitocondrias. La función de PINK1 aún no se ha revelado plenamente, pero se ha

sugerido que tiene un efecto protector sobre las neuronas que sufren un estrés mitocondrial dependiente de calcio [45]. Por otra parte, se está investigando el papel que “leucine-rich repeat kinase 2” (LRRK2) puede tener sobre el desarrollo de la EP. LRRK2 es codificada por el gen *PARK8* y en los últimos años se ha postulado como una de las proteínas claves en el conocimiento y la comprensión de la EP [46-48]. Las mutaciones en este gen se asociado tanto con la forma familiar como esporádica de la EP y, hasta la fecha, constituye la causa más común de EP.

<i>Loci</i>	Cromosoma	Proteína	Herencia	Año de descubrimiento
<i>PARK1</i>	4q21-q23	SNCA	Dominante esporádica	1996
<i>PARK2</i>	6q25.2-q27	Parkina	Recesiva esporádica	1997
<i>PARK3</i>	2p13	¿?	Dominante	1998
<i>PARK4</i>	4p15	SNCA (triplina)	Dominante; esporádica	1998
<i>PARK5</i>	4p14	UCHL1	Dominante	1998
<i>PARK6</i>	1p35-36	PINK1	Recesiva	2001
<i>PARK7</i>	1p36.33- p36.12	DJ-1	Recesiva	2001
<i>PARK8</i>	12p11.23- q13.11	LRRK2	Dominante	2002
<i>PARK9</i>	1p36	ATP13A2	Recesiva	2001
<i>PARK10</i>	1p32	GIGYF2	Dominante	2002
<i>PARK11</i>	2q36-q37	HtrA2/Omi	¿?	2003
<i>PARK12</i>	Xq21-q25	¿?	¿?	2003
<i>PARK13</i>	2q12	¿?	¿?	2005
<i>PARK14</i>	22q13.1	PLA2G6	Recesiva	2006
<i>PARK15</i>	22q12-q13	FBXO7	Recesiva	2008
<i>PARK16</i>	1q32	RAB7L1?, NUCKS1?	¿?	2009
<i>PARK17</i>	16q11.2	VPS35	Dominante	2011
<i>PARK18</i>	3q27	EIF4G1	Dominante	2011
<i>PARK19</i>	1p31,3	DNAJC6	Recesiva	2012
<i>PARK20</i>	21q22,2	SYNJ1	Recesiva	2013

Tabla 1.1: Loci identificados en parkinsonismo familiar.

1.1.4.2.1. La proteína LRRK2

La proteína LRRK2 es una quinasa serina/treonina de 2527 aminoácidos que pertenece a la familia ROCO por su caracterización. Esta familia se caracteriza por dos dominios, un dominio Roc (del inglés *Ras of Complex*) que es una GTPasa, tiene una similitud con la proteína Ras y con otras pequeñas proteínas G. El último es el dominio COR (del inglés *C terminal of Roc*) por su cercanía al dominio Roc (**Figura 1.1**). Los dos dominios están siempre en tándem [49]. Así, LRRK2 tiene diferentes dominios conservados: un dominio ARM (del inglés *armadillo repeat*), un dominio ANK (del inglés *ankyrin repeat*), un dominio LRR (del inglés *leucine rich repeat*), un dominio Roc, un dominio COR, un dominio MAPKKK (del inglés *mitogen activated protein kinase kinase kinase*) y un dominio WD40 [50]. Los dominios GTPasa y MAPKKK son dominios catalíticos de la proteína, el resto (ARM, ANK, LRR y WD40) son dominios de interacción entre proteínas [51]. Todos estos dominios hacen que la proteína participe en muchas vías de señalización y de transducción y tiene innumerables sustratos. LRRK2 está clasificado como un miembro de la familia quinasa RIP (del inglés *receptor-interacting protein*) por homologías a su dominio quinasa, y representa la RIP7. La proteína está involucrada en vías de muerte celular por sus interacciones con receptores de muerte como FADD (del inglés *Fas-Associated protein with Death Domain*) ó TRADD (del inglés *Tumor necrosis factor receptor type 1-associated DEATH domain protein*), é interactúa con la proteína chaperona Hsp90 (del inglés *heat shock protein 90*) y con la tubulina- β [52] y con la proteína adaptadora 14-3-3. Su actividad quinasa está regulada por autofosforilación en su dominio GTPasa y una posible dimerización de la proteína [51].

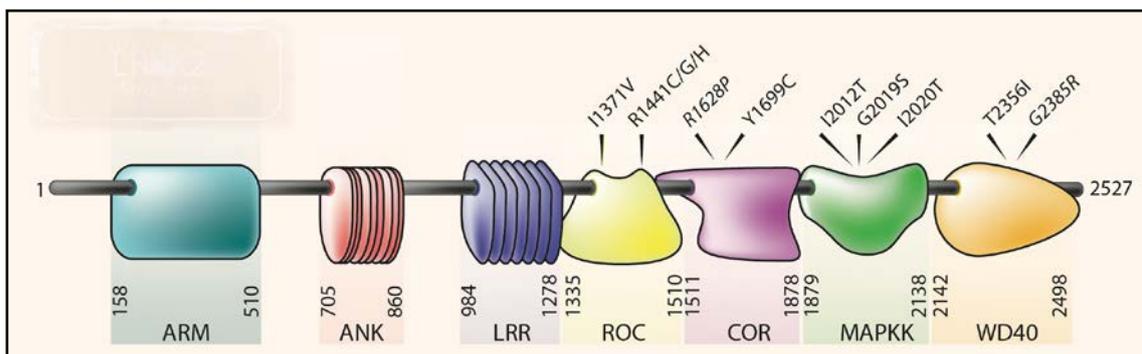


Figura 1.1: Estructura de la proteína LRRK2. Los diferentes dominios de la proteína del extremo N-terminal al C-terminal son ARM, ANK, LRR, ROC, COR, MAPKKK y WD40. Se especifica en los cuatro últimos dominios las diferentes mutaciones descubiertas y relacionadas con la EP [53].

Varias mutaciones producidas en los dominios de esta proteína están relacionadas con la EP. En su dominio GTPasa se encuentran las mutaciones R1441G y R1441C, en su dominio COR están Y1699C y N1437H, en su dominio quinasa están I2020T y G2019S [54], en su dominio ARM está E334K y en su dominio ANK están P755L y

R793M [55]. La mutación G2019S sustituye una glicina por una serina en la posición 2019; es la más prevalente en casos autosómicos dominante de la EP familiar, representando un 1 % de casos de EP esporádico y 5 % de casos de EP hereditario. Esta mutación produce una exacerbación de la actividad quinasa dos a tres veces más alta [47, 56] lo que produce una desregulación de las vías localizadas corriente abajo. Se postula que la neurotoxicidad de la proteína no es debida a la mutación en sí misma sino a las proteínas reguladas por debajo, a sus sustratos directos o indirectos [57].

Por otra parte, la mutación G2019S promueve la fragmentación mitocondrial en células neuronales y fibroblastos de pacientes. Esta fragmentación afecta al potencial de membrana mitocondrial, los niveles de especies reactivas del oxígeno (ERO), disminuye los niveles de ATP y activa la muerte celular [57]. Adicionalmente, las células con la mutación son susceptibles a factores medioambientales tales como rotenona [58] y otros como MPP⁺ [59], acelerando su citotoxicidad; toxicidad que está mediada por una alteración de la autofagia [47]. Con su actividad quinasa exacerbada, la proteína activa la ruta ERK1/2, fosforila Drp1 y Bcl-2 que son, respectivamente, reguladores positivos y negativos de la autofagia [47, 57, 60]. De todos los datos mostrados anteriormente se infiere que la autofagia tiene un papel crucial en la toxicidad inducida por la mutación G2019S LRRK2.

1.2. Autofagia

La autofagia es un proceso catabólico, altamente conservado durante la evolución, que está modulada en condiciones fisiológicas y patológicas. Su papel es aclarar y/o reciclar orgánulos dañados y proteínas no usadas en las células con el fin de regular constantemente la homeostasis celular [61]. Fisiológicamente, el ayuno es un inductor de la autofagia. Esta privación de nutrientes o energética inhibe el complejo mTORC1 (mTOR complex 1) que aloja la proteína mTOR (del inglés *mammalian target of rapamycin*). En condiciones de no privación, la vía de la clase I de la PI3K/AKT (del inglés *phosphatidylinositol 3-kinase/serine-threonine kinase*) está activada y fosforila mTOR (pmTOR). La fosforilación de mTOR inhibe ULK1 (del inglés *uncoordinated-51-like protein kinase*) por fosforilación y regula negativamente la autofagia. ULK1 es importante en la iniciación de la autofagia [62]. No obstante una activación de la autofagia puede ser mTOR-independiente. Al contrario de la clase I, la clase III de la PI3K activa la autofagia promoviendo la formación del fagóforo y la elongación del autofagosoma que es una vacuola de doble membrana que envuelve la carga citoplasmática que va a ser degradada. Durante la formación del autofagosoma, la isoforma citoplasmática de LC3 (del inglés *microtubule-associated protein 1 light chain 3*) (LC3-I) se asocia a la membrana del autofagosoma dando lugar a la isoforma II (LC3-II) que es una lipidación de LC3-I con la fosfatidil-etanolamina. Un incremento de LC3-II está vinculado a un aumento en el número de autofagosomas. La autofagia es activa y efectiva cuando los autofagosomas logran fusionarse con los lisosomas para formar autolisosomas y las enzimas lisosomales degradan el contenido intravacuolar

(Figura 1.2). Este tipo de autofagia (o de degradación en concreto) es la macroautofagia [62] que seguiremos llamando autofagia en nuestro trabajo.

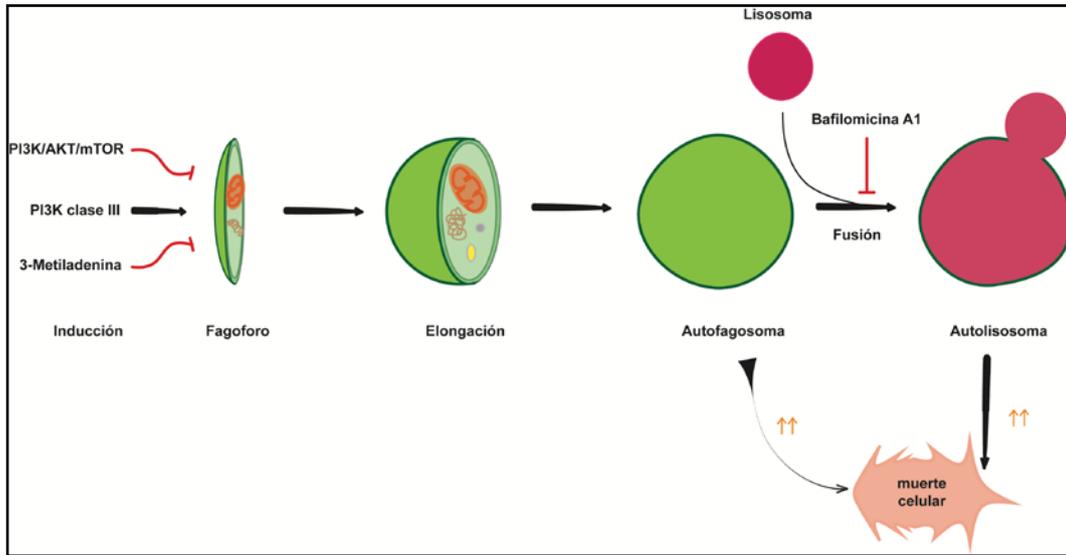


Figura 1.2: Las diferentes etapas de la macroautofagia (autofagia). La autofagia empieza con la formación de un fagóforo que se elonga para formar un autofagosoma maduro que envuelve los componentes celulares dañados. Estos últimos serán degradados a través de la fusión del autofagosoma con el lisosoma. Las vías PI3K/AKT/mTOR y PI3K clase III regulan, de manera respectiva, negativamente y positivamente la autofagia. La 3-metiladenina es un inhibidor de la inducción de la autofagia y es relativamente específica de la vía PI3K clase III. La Baf A1 impide la formación del autolisosoma. Una acumulación de autofagosomas o un incremento de autolisosomas son nocivos por las células.

Otras vías de señalización regulan la autofagia, AMPK (del inglés *AMP-activated protein kinase*) inhibe directamente o indirectamente mTORC1 [63] para impedir su interacción con ULK1. Ambas interacciones, tanto AMPK como mTORC1 con ULK1, activa o inhibe, respectivamente, la autofagia [64]. AMPK es sensible a los aumentos de calcio citosólico y puede ser activada por la CaMKK- β (del inglés *Calcium/calmodulin-dependent kinase kinase- β*) para inducir la autofagia [65]. Recientemente, un estudio sobre la inducción de la autofagia con taspigargina -aumenta los niveles de Calcio citoplasmáticos- mostró que esta activación puede ser independiente de ambas rutas (tanto la ruta de AMPK como la de mTOR) [66]. La acetilación/desacetilación modula también el flujo autofágico. La acetilación de varias proteínas Atg (autophagy-related genes), entre ellas LC3, por la acetiltransferasa p300 inhibe la autofagia [67]; SIRT1 es la desacetilasa que antagoniza p300. Durante la inducción de la autofagia, LC3 puede sufrir una desacetilación a través de SIRT1 [68] o por la histona desacetilasa 6 (HDAC6) [69]. Una deficiencia de SIRT1 impide la activación de la autofagia en condiciones de privación o con un tratamiento con la rapamicina. La ausencia de esta proteína está acompañada de una activación de AMPK y a pesar de eso exhibe una acumulación de mitocondrias dañadas *in vivo* y una letalidad precoz. En condiciones normales, las proteínas Atg están acetiladas y la privación de nutrientes disminuye este nivel [68]. Contrariamente a las Atg, la acetilación de la α -tubulina favorece el transporte de los autofagosomas sobre los microtúbulos hacia los lisosomas y está controlada por la proteína HDAC6. Su actividad

desacetilasa disminuye el nivel de acetilación de la tubulina y consecuentemente reduce la degradación de los autofagosomas (fusión autofagosoma-lisosoma) [70]. Durante la migración de las estructuras autofágicas, HDAC6 funciona como un adaptador (*un ubiquitin-binding protein*) que recluta las proteínas agregadas ubiquitinadas junto a la dineína y regula la formación del agresoma [71] y de los autolisosomas [72]. La participación de su actividad desacetilasa durante estos dos procesos es controvertida [70, 71]. Por su doble función, el papel de HDAC6 es muy complejo en la regulación de la autofagia. Varios estudios postulan que tiene un efecto neuroprotector en enfermedades neurodegenerativas (EA, EH) debido a que su inhibición provoca la eliminación de los orgánulos dañados y de las proteínas acumuladas [73-75] pero también puede ser perjudicial impidiendo la construcción del agresoma -proteína poliubiquitinadas y organulos dañados- provocando, por lo tanto, una muerte celular inducida por estrés [71, 76, 77].

La autofagia está basalmente desregulada en enfermedades neurodegenerativas las cuales se caracterizan por una acumulación de proteínas, de mitocondrias dañadas y una generación de ERO y finalmente una muerte celular. En estas condiciones de estrés celular, la modulación de la autofagia ayuda a las células a adaptarse promoviendo la supervivencia celular [61]. Sin embargo, la regulación de este proceso de reciclaje celular sigue siendo incomprendible. En varios estudios de modelos genéticos o de estrés oxidativos de la EP, la autofagia se ha mostrado deficiente [78, 79] o exacerbada [47, 80]. Es el ejemplo de la sobreexpresión de SNCA WT (del inglés "wild type") o A53T que inhibe la autofagia [78] tanto *in vivo* como *in vitro* o más bien la formación del autofagosoma, potenciando las características de la EP [81]. La sobreexpresión de beclina 1 (BECN1) restaura la autofagia deficiente y elimina la acumulación de SNCA [78]. En otro sentido, la rapamicina, que es un inductor de autofagia, se ha mostrado tóxica con la rotenona, sustancia que aumenta los niveles de expresión de LC3, el nivel de acetilación de la tubulina y reduce los niveles de la BECN1 [79]. Si SNCA inhibe la autofagia, la mutación G2019S de LRRK2 o la proteína PINK1 deficiente (PINK1^{-/-}) aumenta la autofagia de manera mTOR-independiente [47, 80]. La inhibición de la autofagia con la SNCA A53T está precedida de una inducción del proceso [78], lo que confirma que la inducción de la autofagia observada con la neurotoxina MPP⁺ es una respuesta adaptativa, frente a un estrés celular crónico, que no logra recuperar la homeostasis celular por el defecto de una aclaración exhaustiva [59] y/o ineficiente [79]. A día de hoy aunque estén muy determinadas las características de la EP, es difícil definir si la autofagia es la causa o la consecuencia de esta patogénesis. Está claro que la activación y/o la inhibición crónica de la autofagia en modelos de EP provocan una muerte celular por una disfunción mitocondrial, una disminución del $\Delta\Psi_m$ y un aumento de los niveles de ERO [59, 79].

1.3. Modificaciones epigenéticas

En los últimos años se están acumulando las evidencias que implican a las modificaciones epigenéticas con el desarrollo de muchas enfermedades neurodegenerativas por su cambio de fenotipo celular o de expresiones de genes. En la EA y en la EP, el nivel de metilación del ADN está alterado en cerebros de pacientes, lo que modifica la expresión génica. En el caso de la EP se ha atribuido el cambio al tratamiento con L-Dopa. La hipometilación aumenta la expresión de los genes, lo que favorece la acumulación de las proteínas [82]. Los genes PARK y sus promotores sufren también una modificación epigenéticas [83, 84]. La más conocida es la metilación del gen de la SNCA que modula el nivel de expresión de la proteína, además en la forma idiopática de la EP, los cerebros post-mortem de pacientes exhiben un menor nivel de metilación del gen [85] involucrando los factores medioambientales en la modificaciones epigenéticas.

Con respecto a la acetilación, su nivel se ha mostrado modificado en varios modelos de EP aunque con resultados no concluyentes y dispares. A día de hoy no se ha definido muy bien si es la hipo-o la hiper-acetilación la que acelera la EP. Diferentes estudios se han realizado en modelos animales y en cultivos celulares pero con resultados diferentes. *In vivo*, la SNCA se transloca al núcleo [86] e inhibe la acetilación de las histonas promoviendo la muerte celular [87]. En base a estos niveles de acetilación bajos, muchos inhibidores de HDACs se han mostrado como agentes neuroprotectores [88, 89].

Sin embargo, en otros modelos de Parkinson, la acetilación de proteínas se ve incrementada. En células dopaminérgicas, el PQ²⁺, un herbicida que aumenta el estrés celular, aumenta la acetilación de la histona 3 y no de la histona 4 y el dieldrin ambas histonas. Paradójicamente el PQ²⁺ inhibe la actividad de las HDACs [90] mientras que el dieldrin aumenta el nivel de la histona acetiltransferasa (HAT) CBP (del inglés “*CREB-binding protein*”) [90]. HATs/HDACs participan en la patogénesis de la EP porque regulan la supervivencia celular y/o la muerte frente a un estímulo. Por ahora no queda claro cómo se modula ese desequilibrio; entre otros aspectos sería interesante considerar estudios post-mortem tanto de las formas esporádicas como genéticas para poner de manifiesto estas modificaciones.

En realidad la EP es un proceso multifactorial donde los factores genéticos y medioambientales interactúan en un mismo individuo. Esta interacción modifica el mecanismo genético y controla la progresión de la EP. Esta modificación es continua a lo largo de la vida de un individuo generando en cada uno lo que se denomina epigenoma [91]. El epigenoma es un fenotipo flexible existente tras la interacción de la expresión de un gen y sus productos [92], cambios hereditarios de la expresión génica que no afecta la secuencia del gen o la remodelación de la cromatina que activa o reprima la transcripción como respuesta a los factores ambientales.

La subunidad principal de la cromatina es el nucleosoma, el cual está constituido por un octámero de proteínas compuesto de 4 pares de histonas: histona 2A (H2A), histona 2B (H2B), histona 3 (H3) e histona 4 (H4) [93]. Una quinta proteína, la histona 1 (H1) estabiliza la estructura del nucleosoma [94]. El ADN se envuelve en el nucleosoma dejando sobresalir los extremos N-terminales de las histonas destinadas posteriormente a una modificación post-traducciona. La condensación o la relajación del ADN (modelación de la estructura de la cromatina) depende de los complejos enzimáticos ATP-dependientes Swi/Snf (del inglés *switch/Sucrose-non fermentable*) [95] que controlan los enlaces ADN-histonas y/o de las modificaciones post-traduccionales de las histonas en residuos específicos [96]. Esas modificaciones representan el código epigenético de las histonas cuya existencia modula la expresión de los genes. Entre otras modificaciones podemos citar: la metilación, la fosforilación, la ubiquitinilación y la acetilación (**Figura 1.3**) [93]. Las histonas pueden sufrir secuencialmente varias modificaciones mostrando frecuentemente influencias mutuas entre ellas. Es el ejemplo de la fosforilación de la H3 en la serina 10 que facilita y aumenta su acetilación en la lisina 14. La fosforilación precede la acetilación de las histonas y entonces facilita el reclutamiento de las HATs y la activación de la transcripción de los genes. Mientras que la metilación de la H3 en la lisina 9 impide la fosforilación de la serina 10 y viceversa [93]. Esas modificaciones modifican la estructura de la cromatina [97] para el reclutamiento de complejos protéicos necesarios y la regulación de la expresión de los genes.

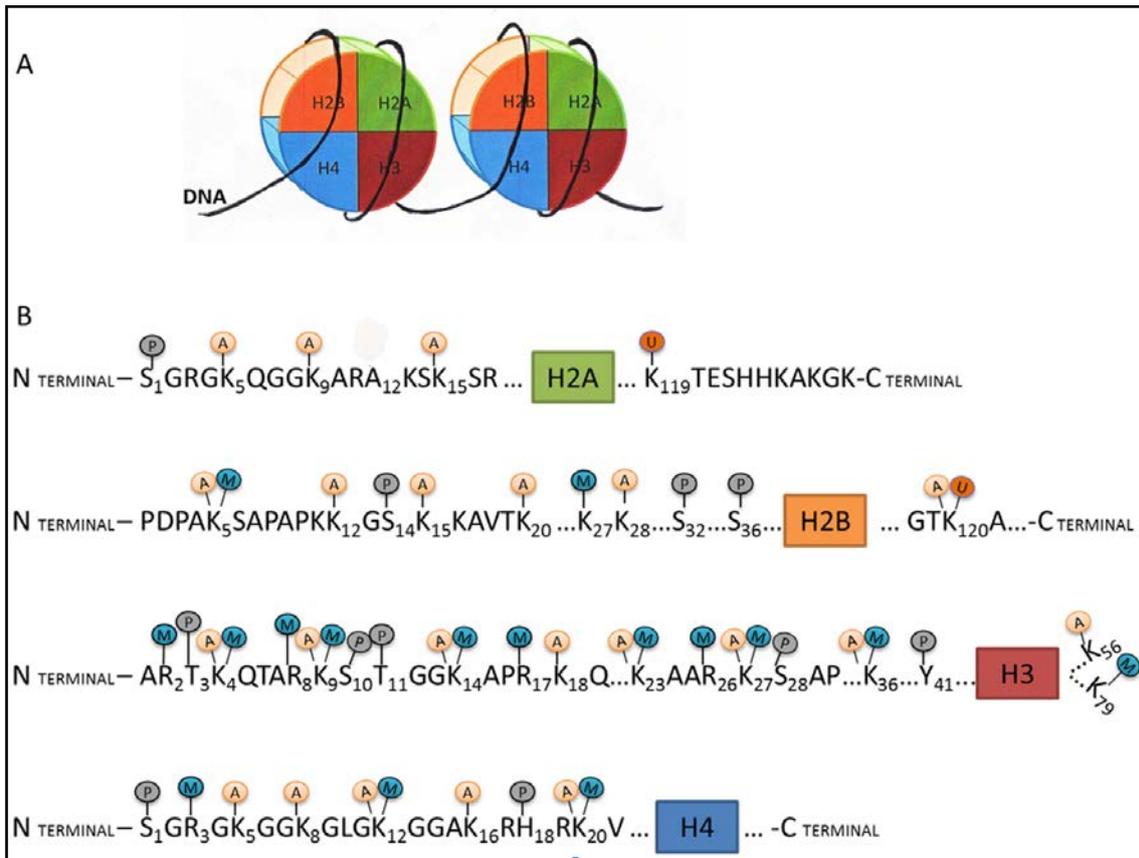


Figura 1.3: Código epigenético de las histonas. (A) Representación esquemática del nucleosoma constituida de un octamero de histonas: histona 2A (H2A), histona 2B (H2B), histona 3 (H3), histona 4 (H4). (B) Las diferentes modificaciones post-traduccionales de las histonas como la fosforilación (P), la ubiquitinilación (U), la metilación (M) y la acetilación (A) en residuos de lisina K, de serina S, de treonina T de arginina R [98].

1.3.1. La acetilación de histonas

La acetilación fue la primera modificación post-traduccionales descrita en las histonas [93]. Durante muchos años las enzimas responsables de esas modificaciones, las HATs y HDACs fueron clasificadas respectivamente como co-activadores [99] y co-represores [100] de la transcripción. Las HATs son capaces de formar un puente entre proteínas activadoras y factores de transcripción alrededor del promotor de genes específicos [93, 101] mientras que las HDACs interactúan con proteínas represoras de la transcripción.

Junto a los complejos Swi/Snf que regulan el acceso al ADN nucleosomal [96, 102], las HATs/HDACs son enzimas que actúan como parte de un complejo de múltiples subunidades necesarias para la transcripción de genes específicos [96]. HATs [103] y HDACs constituyen las subunidades catalíticas de complejos multienzimáticos HATs (SAGA (del inglés *Spt-Ada-Gcn5-Acetyltransferase*), NuA3 (del inglés *nucleosomal acetyltransferase of histone H3*), NuA4 (del inglés *nucleosomal acetyltransferase of*

histone H4...)) y complejos HDACs (Sin3 (del inglés *SWI (switch)-independent 3*), NuRD (del inglés *Nucleosome-remodeling HDAC*), Sir2 (del inglés *Silencing information regulator gene 2*)), respectivamente, diferentes en composición de subunidades y en preferencia de sustratos. La actividad HAT puede ser modulada dentro de un complejo; hasta llegar a funcionar como activador y/o acetiltransferasa. Un ejemplo sería el de la HAT GCN5 (del inglés *General control nonderepressible-5*) que no actúa necesariamente como acetiltransferasa dentro del complejo SAGA durante la activación de la transcripción de Gal4 [104] o Esa1 (del inglés *Essential Sas family acetyltransferase 1*) cuya actividad HAT es importante en el complejo NuA4 en levadura y la de su homólogo MOF (del inglés *males absent on the first*) en *Drosophila melanogaster* [97]. Cada subunidad de un complejo tiene su función y sus sustratos específicos y actúa de manera sinérgica con las actividades HAT/HDAC. Activadores y represores de la transcripción reclutan respectivamente HAT y HDAC en los promotores específicos de los genes; induciendo la activación o la represión de la expresión génica [103, 105].

Las histonas se acetilan en sus extremidades N-terminales [96] en el grupo ϵ -amino de los residuos conservados de la lisina. Las HATs transfieren el grupo acetilo desde el acetil-coenzima A (acetil-CoA) hacia el grupo ϵ -amino de la lisina [97]. La acetilación es una modificación específica para algunos residuos mientras que otras pueden sufrir tanto una acetilación como una metilación (**Figura 1.3**). La acetilación es la más implicada en la activación de la transcripción de los genes. Más de 13 residuos de lisina sobre 30 están acetilados en el nucleosoma [97]. Además de las histonas, se acetilan factores de transcripción como p53 [106-108], HAT como ACTR (del inglés “*activated thyroid and retinoid receptor*”) y proteínas no-histonas (tubulina [70], LC3 [109]). Sus actividades no se limitan a acetilar o desacetilar los extremos N-terminales de las histonas sino que también tienen a las proteínas no-histonas como sustratos y que el residuo común entre sustratos es el grupo ϵ -amino de la lisina. Por este motivo se las denomina lisina acetiltransferasa y lisina desacetilasa (KAT y KDAC). En nuestro trabajo las llamaremos HATs y HDACs por no crear confusiones. El nivel de acetilación de las histonas está mantenido gracias al balance entre las actividades enzimáticas de las HATs y de las HDACs.

1.3.1.1. Histonas acetiltransferasas

Existen dos clases principales de HATs: las de clase A (HAT A) que son nucleares y las de clase B (HAT B) que son citoplasmáticas. Las de clase B acetilan las histonas H3 y H4 libres halladas en el citoplasma que se translocan al núcleo en forma de tetrámero para la formación de nuevos nucleosomas durante la replicación del ADN [110]. La Hat1 (histona acetiltransferasa 1), un miembro de la HAT B conservado durante la evolución, acetila la histona 4 en las lisinas 5 y 12 [97, 110, 111]. En cuanto a la histona 3 se ha demostrado por primera vez que puede ser acetilada por la acetiltransferasa HatB3.1 en la estirpe Gcn5 de levaduras [110]. La incorporación de las

histonas H2A y H2B al tetrámero finaliza la formación del nucleosoma [110], consecutivamente, H3 y H4 se desacetilan facilitando la maduración de la cromatina. La acetilación de las histonas H3 y/o H4 es imprescindible para el ensamblaje de la cromatina *in vivo* e *in vitro*, sus mutaciones en ambos extremos N-terminales inducen muerte celular en levadura [112]. Aunque solo acetila las histonas solubles en el citoplasma, la Hat1 se puede localizar en el núcleo durante la fase de síntesis del ciclo celular [111] lo que no excluye un posible papel nuclear de las HAT B.

La clase A se puede dividir en 3 familias: p300/CBP, MYST (MOZ, Ybf2/Sas3, Sas2, y Tip60) y GNAT (del inglés *GCN5-related N-acetyltransferasas*). Se caracterizan por la conservación de 4 regiones llamadas C, D, A, B del extremo N-terminal al extremo C-terminal. Una de ellas, la A es la región más conservada y es crucial para la unión del acetil-CoA [96] en todas las familias. La región A tiene unas secuencias Arg/Gln-X-X-Gly-X-Gly/Ala que son esenciales para el reconocimiento y a la acetilación [97, 113]. El dominio catalítico HAT engloba las regiones D, A, B mencionadas más arriba en la familia GNAT y p300/CBP y solo la región A en la familia MYST (**Figura 1.4**). Si las familias tienen el dominio catalítico en común muestran una diferencia en la presencia de otros dominios como el bromo (p300/CBP y GNAT) y el cromo (MYST) (**Figura 1.4**) [97] etc.

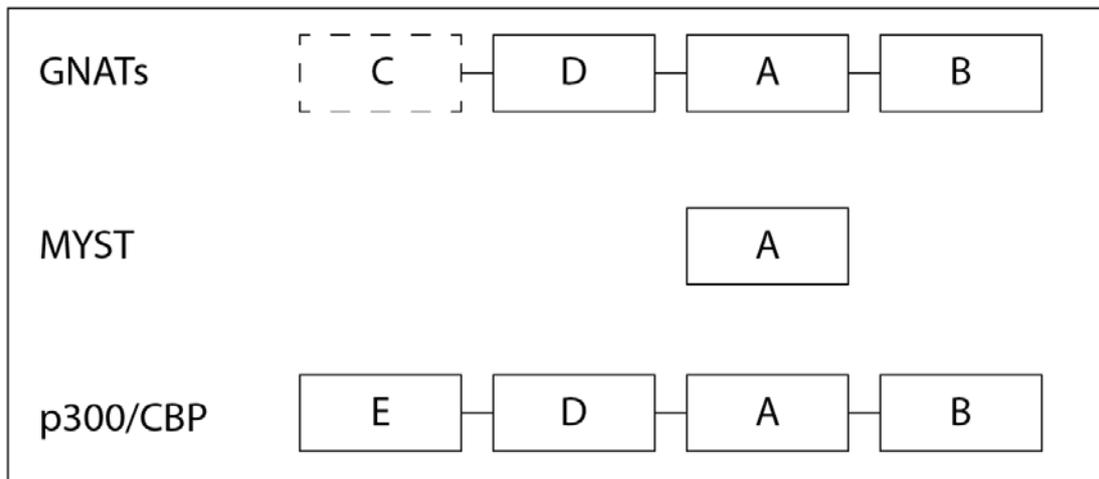


Figura 1.4: Regiones conservadas en las tres familias HATs. Las regiones D, A y B, constituyen el dominio catalítico de las HATs. La región A es la más conservada y es el sitio de unión del Acetil-coA (Roth, Denu et al. 2001).

1.3.1.1.1. Familia p300/CBP

Además de tener actividades acetiltransferasas, tanto CBP como p300 son co-activadores que modulan la transcripción de numerosos genes. Estas dos proteínas son muy similares y con funciones celulares parecidas. p300/CBP tienen varios dominios: 2 regiones de dedos de zinc (“zinc finger” que son ZZ, TAZ), un dominio bromo, un dominio HAT y 2 dominios independientes de interacción con varios factores de

transcripción (**Figura 1.5**). Estos últimos reclutan p300/CBP a los promotores específicos lo que le otorga un rol de co-activador en la transcripción [97]. La proteína p270 es también un miembro de la familia p300/CBP; p270 es un complejo Swi/Snf capaz de cambiar la estructura de la cromatina gracias a su actividad ATPasa [114]. Muchos factores interactúan con p300/CBP tal como la proteína E1A, c-Fos, p53 [108, 115]... lo que puede perturbar diferentes vías de señalización [97]. *In vivo*, su interacción con MAPK/ERK1/2 (del inglés “*mitogen-activated protein kinase*”/*extracellular signal-regulated kinase 1/2*”) aumenta su actividad acetiltransferasa por la fosforilación de su extremo C-terminal [116, 117]. p300 acetila H3K14, H3K18 y H4K5, H4K12 preferentemente (**Tabla 1.2**) [118]. La actividad de p300/CBP es crucial durante las primeras etapas del desarrollo embrionario; su actividad regula la diferenciación y la proliferación celular [114].

Familias	Miembros	Sustratos
p300/CBP	p300 CBP	H3K14, H3K8, H4K5, H4K12, p53K373
MYST	Tip60 hMOF	H4K16, p53K120
GNAT	PCAF GCN5	H3K14, H4K8, H4K16, H3K9, p53K320

Tabla 1.2: Resumen de las diferentes familias HATs y sus sustratos. Para más especificidades consultar manuscrito.

1.3.1.1.2. Familia MYST

Su nombre surge de las iniciales de los primeros miembros HATs descubiertos, MYST por MOZ, Ybf2/Sas3, Sas2, y Tip60 [97]. MOZ (del inglés *Monocytic leukemia zinc finger protein*) es el oncogén humano homólogo de la proteína Sas3 (del inglés *Something about silencing 3*) de la levadura. Sas3 constituye la subunidad catalítica del complejo HAT NuaA3 (del inglés *Nucleosomal acetyltransferase of histone H3*). Sas2 (del inglés *Something about silencing 2*) y Sas3 son también conocidos como Ybf2. La proteína Esa1 (levadura) es un nuevo miembro de la familia MYST, tiene una actividad catalítica en el complejo HAT NuA4 (del inglés *Nucleosomal acetyltransferase of histone H4*) acetilando la H4. Además es el homólogo de la proteína MOF de la *Drosophila* (dMOF) que es miembro de un complejo de cinco proteínas (dMOF, dMSL1, dMSL2, dMSL3 et dMLE) llamado DCC (del inglés *dosage compensation complex*) [119]. Los miembros de la familia MYST tienen la particularidad de controlar el mecanismo de la transcripción, impidiendo la accesibilidad del ADN en la heterocromatina es el *transcriptional silencing* observado en *Saccharomyces cerevisiae* [113] o duplicando el nivel de la transcripción gracias al complejo DCC es la compensación de dosis mencionada en *Drosophila melanogaster* [119]. Otros como Tip60 (del inglés *TAT-interacting protein 60*) y hMOF (del inglés *human MOF*) modulan la respuesta al daño del ADN [107]. Tip60 es la primera proteína humana clasificada como miembro de la familia MYST; con una actividad HAT en el complejo NuA4. Se comporta como un co-activador transcripcional de algunos factores como p53

y NF- κ B (del inglés *nuclear factor- κ B*) y receptores nucleares. De manera interesante, tiene un rol crucial en la reparación del ADN y la inducción de la apoptosis; por eso se considera que la proteína Tip60 puede estar implicada en muchas enfermedades sobre todo en cáncer. Sin embargo, su papel es mucho más complicado porque, como co-activador y acetiltransferasa, actúa dentro de un complejo multi-proteico que le puede involucrar en vías de muerte o supervivencia celular [120]. Después hMOF, un ortólogo humano de la dMOF [121] que es activa tanto *in vitro* como *in vivo* aumenta el nivel de acetilación de la H4K16 y acetila algunas proteínas DCC (dMSL1 y dMSL3). Aunque tenga una preferencia a H4, hMOF puede acetilar H3 y H2A *in vitro* y en el nucleosoma [119]. Los miembros de esa familia prefieren la H4 como sustrato y tienen un dominio PhD (del inglés *Plant homeo domains*) (hMOZ y MORF), un dominio dedo de zinc (todos excepto Esa1) y un dominio cromo (Esa1 y dMOF), que son ambos dominios de interacción proteína-proteína (**Figura 1.5**) y se unen a las proteínas asociadas a la heterocromatina [97] y también al ARN [119]. Tip60 y hMOF interactúan con p53 y lo acetilan en su residuo lisina 120 lo que induce la transcripción de los genes apoptóticos [107].

1.3.1.1.3. Familia GNAT

Los miembros de la familia GNAT del inglés “*GCN5-related N-acetyltransferasas*” están agrupados por sus similitudes de homología en varias regiones y cuenta con Gcn5, PCAF (p300/CREB-binding protein-associated factor), Hat1, Elp3 y Hpa2 [97]. La proteína Gcn5 fue la primera HAT A descubierta en el modelo *Tetrahymena thermophila*. Sus homólogos se han encontrado en levadura (yGCN5), *Drosophila* (dGCN5) y mamíferos (hGCN5) [113].

En mamíferos, esta familia la componen dos miembros GCN5 y PCAF, ambos comparten el 80 % de homología (**Figura 1.5**). Tienen un dominio bromo en su parte C-terminal, un dominio HAT y un dominio PCAF-HD que aloja el dominio ubiquitin E3 ligasa [122]. Son proteínas co-activadoras dotadas de una actividad acetiltransferasa que acetilan la histona 3 en su lisina 14 (H3K14); por otro parte GCN5 acetila la histona 4 en las lisinas 8 y 16 (H4K8 y H4K16) y la H3K9 (**Tabla 1.2**) [123]. Su dominio bromo en su extremo C-terminal reconocen los residuos de lisina acetilada [97, 113] e interaccionan con otros dominios bromo dando lugar a una dimerización de proteínas HATs (PCAF/GCN5, PCAF/PCAF) o aumentado la asociación nucleosoma-HATs [123]. PCAF compete con E1A para unirse con p300/CBP y formar un complejo HAT funcional tanto *in vivo* como *in vitro* [118]. Aunque se asocian, PCAF y p300 intervienen en sitios diferentes y ejercen un efecto sinérgico. Sin embargo, el complejo PCAF/p300 induce una parada del ciclo celular por ser co-activadores del factor de transcripción p53. La acetilación de p53 por p300 [108] y PCAF en sus residuos de lisina 373 (p53K373) y 320 (p53K320), respectivamente, incrementa la actividad de la proteína y su unión a los promotores de genes específicos [115]. Esa actividad de p53 HAT-dependiente aumenta en respuesta al daño del ADN durante un efecto citotóxico.

PCAF no solamente modula la actividad de p53, también regula su nivel endógeno vía su actividad ubiquitina ligasa E3 [122].

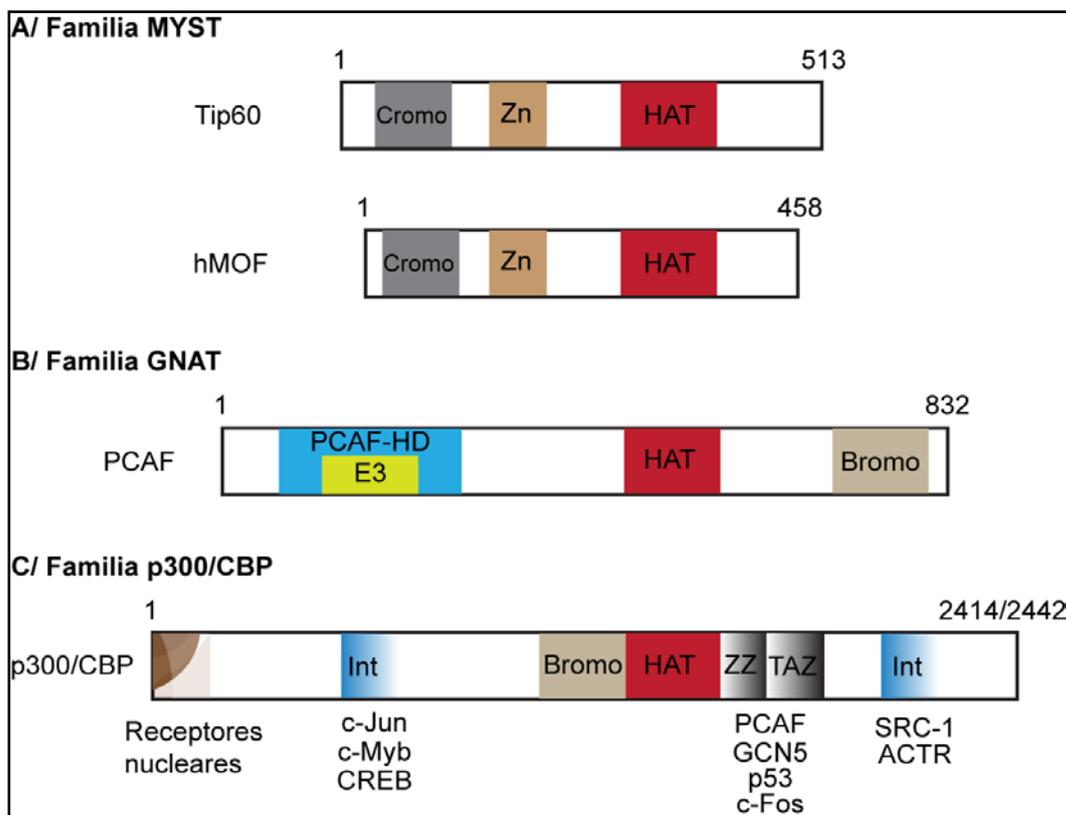


Figura 1.5: Estructura de p300/CBP, Tip60, hMOF y PCAF. Se representan gráficamente las estructuras y los dominios de las 4 HATs humanas de las 3 familias estudiadas. **(A)** Representa la familia MYST con Tip60 y hMOF. Están caracterizadas por un dominio cromo (Cromo), un dominio dedo de zinc (Zn) y un dominio histona acetiltransferasa (HAT). **(B)** representa la familia GNAT con PCAF que tiene un dominio bromo (Bromo), un dominio PCAF *homology domain* (PCAF-HD) dentro del cual está el dominio ubiquitina E3 ligasa (E3) y un dominio HAT [122]. **(C)** Es la familia p300/CBP donde se agrupan ambas proteínas (CBP y p300) por su homología. Las proteínas tienen un dominio de interacción con proteínas (Int), un dominio bromo (Bromo), dos dedos de zinc (ZZ y TAZ) para interactuar con factores de transcripciones y proteínas HATs.

1.3.1.2. Histonas desacetilasas

Las HDACs son las enzimas antagonistas de las HATs. Mientras que las HATs transfieren el grupo acetil-CoA a los residuos lisina, las HDACs quitan el grupo acetil-CoA añadido [124]. El enlace ADN-histona se vuelve más fuerte y compacto formando una heterocromatina que impide el acceso de los factores de transcripción al ADN y entonces la transcripción de los genes [124]. No obstante se ha mostrado que proteínas HDACs pueden comportarse como activadores en la transcripción de genes modulado por el receptor de glucocorticoides [125]. La desacetilación de las proteínas no histonas participa en la regulación de varios procesos celulares incluyendo la expresión de genes implicados en muerte y supervivencia celular [126]. Varias HDACs (18 proteínas) participan en esas modificaciones post-traduccionales reversibles. Están clasificadas en

4 clases en función de sus estructuras y homologías compartidas con las proteínas de la levadura [124]. Así, existen las clases I, II, III, IV (**Tabla 1.3**). Las clases I, II y IV tienen una actividad desacetilasa Zn^{2+} - dependiente y la clase III necesita el cofactor NAD^+ .

Clases	Miembros	Localización
Clase I	HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC8	Nuclear
Clase II a	HDAC4, HDAC5, HDAC7, HDAC9	Nuclear y Citoplasmática
Clase II b	HDAC6, HDAC10	Nuclear y Citoplasmática
Clase III	SIRT1, SIRT2, SIRT3, SIRT4, SIRT5, SIRT6, SIRT7	Nuclear y Citoplasmática
Clase IV	HDAC11	Nuclear

Tabla 1.3: Las diferentes clases de HDACs y sus distintos miembros y localización celular. Las clase I, II y IV tienen una actividad desacetilasa Zn^{2+} - dependiente. La clase III representa las SIRTs y tienen una actividad NAD^+ -dependiente.

1.3.1.2.1. Clase I, II y IV

La clase I cuenta con las enzimas HDAC1, HDAC2, HDAC3 y HDAC8. Son muy similares a la histona desacetilasa RPD3 (del inglés *reduced potassium dependency 3*) de la levadura [127]. Todos los miembros de esta clase son nucleares y forman parte de complejos multiproteicos, excepto la proteína HDAC8 [124]. HDAC3 tiene una localización nuclear y citoplasmática, aunque este más presente en el núcleo [128]. La clase I está implicada en la proliferación y la supervivencia celular. HDAC1 y HDAC2 tienen un 85% de homología en humano, sin embargo tienen funciones específicas y diferentes [129]. Una supresión de HDAC1 incrementa la expresión de la p21, que es un inhibidor del ciclo celular. Un déficit global de los genes HDAC1 o HDAC2 en ratones induce una letalidad precoz o tardía, respectivamente [130]. Ambos actúan dentro de un complejo co-repressor multiproteico, tal como NuRD, Sin3 o CoREST (del inglés *corepressor REST (repressor element 1 silencing transcription factor)*), reclutando a los promotores de los genes necesitados. La formación del complejo corepressor y la fosforilación de HDAC1/HDAC2 son imprescindibles para la actividad desacetilasa de las dos proteínas [128]. En el complejo, HDAC1 y HDAC2 pueden asociarse en un dímero o un hetero-dímero en sus extremos N-terminal catalíticos (**Figura 1.6**) [125, 131]. En ciertas células, las dos proteínas están expresadas diferentemente. En células neuronales por ejemplo, HDAC2 está más expresada que HDAC1 y se asocia con el complejo CoREST para la regulación de la sinaptogénesis [129]; en células de cáncer de mama, HDAC1/HDAC2 forman un heterodímero en el núcleo [131]. HDAC3 también se oligomeriza y puede formar heterodímeros con HDAC4, 5, 7 a través de los corepresores SMRT (del inglés *silencing mediator for retinoid and thyroid receptors*) y N-CoR (del inglés *nuclear receptor corepressor*) [132], que son diferentes de lo que suelen usar los miembros de la clase I. Estos 2 complejos son necesarios para la

actividad desacetilasa de HDAC3 [128]. La acetilación de HDAC1 en su parte C-terminal por p300 regula negativamente la actividad desacetilasa de la proteína e indirectamente la del complejo corepresor NuRD, Sin3 o CoREST que lo engloba. HDAC1 acetilado en K432 inhibe su propia actividad desacetilasa y la actividad de HDAC2 [125]. La clase IV cuenta con una proteína nuclear, que es la HDAC11. Tiene más homología con las proteínas HDAC3 y HDAC8. Está clasificada clase IV por su cercanía a las clases I y II. Sin embargo HDAC11 no se asocia con ningún complejo corepresor.

La clase II está dividida en dos subclases (IIa y Iib) (**Tabla 1.3**). Son homólogos de la proteína HDA1 (histona desacetilasa-1) de la levadura [127]. Contrariamente a la clase I, las proteínas de la clase II tienen una expresión limitada y están más presentes en células neuronales y musculares [130, 132]. Las proteínas de clase II son nucleares y citoplásmicas, sus distribuciones dependen de sus interacciones proteicas. De manera intrigante, HDAC7 no tiene de NES (del inglés *nuclear export signal*) y durante la diferenciación muscular se encuentra secuestrado en el citoplasma. Los miembros de la clase II regulan la diferenciación celular y el desarrollo.

La subclase IIa está compuesta por HDAC4, HDAC5, HDAC7 y HDAC9. HDAC4 y HDAC5 tienen un 70 % de homología mientras que HDAC7 comparte un 58 % de similitud con ellas. Esas proteínas presentan sus dominios catalíticos en una parte no muy lejana de la región C-terminal de la proteína [127]. Además, HDAC4 (**Figura I.6**), HDAC5 y HDAC7 conservan distintos dominios de interacción de CtBP (del inglés *C-terminal binding protein*), de MEF2 (del inglés *myocyte enhancer factor 2*) y de 14-3-3 en su extremo N-terminal [128, 133]. La actividad desacetilasa de esas proteínas está modulada en función de sus participaciones en los complejos SMRT, N-CoR, BCOR (del inglés *Bcl-6-interacting corepressor*) [132] y por una modificación post-traducciona [128]. A través de los complejos SMRT o N-CoR, HDAC4, HDAC5 se asocian con HDAC3 exclusivamente en el núcleo. HDAC3 y HDAC4 forman un complejo funcional con sus dominios catalíticos [132]. No obstante, CaMKK fosforila y regula negativamente la actividad de HDAC4, 5 y 7. Las proteínas fosforiladas se translocan al citoplasma y son secuestradas por la proteína 14-3-3 [128]. En el citoplasma, HDAC4 es inactiva e incapaz de interactuar con HDAC3, además una disminución de HDAC3 endógena reduce la actividad desacetilasa de HDAC4 [132]. HDAC9 puede estar tanto en el núcleo como en el citoplasma dependiendo de la recombinación alternativa del ARN. Así se puede citar hasta tres variantes de la proteína: HDAC9a, HDAC9b, HDAC9c/HRDP. La variante HDRP tiene la habilidad de interactuar igualmente con HDAC3. Las proteínas HDAC4, HDAC5, HDAC7 [133] y HDAC9 [128] modulan la diferenciación muscular por sus interacciones con el factor de transcripción MEF2.

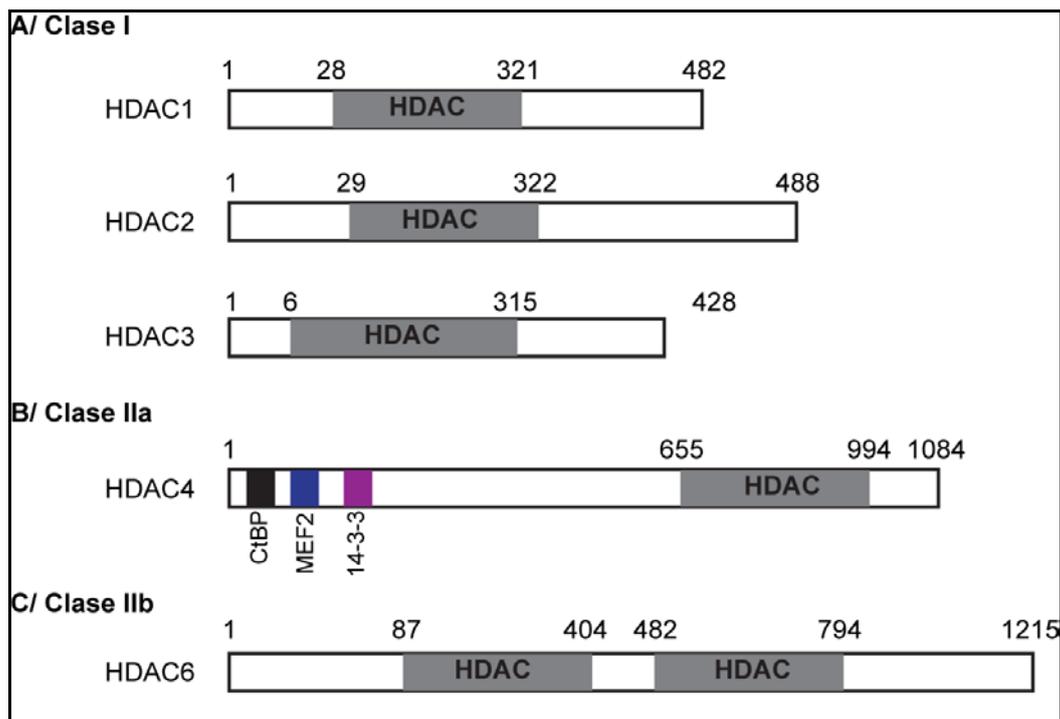


Figura 1.6: Estructuras de las HDACs de clase I y II [127, 128, 133]. Se representa un esquema de las proteínas HDAC estudiadas en este trabajo. A/ Representa las HDAC1, HDAC2 y HDAC3 de la clase I. Tienen el dominio catalítico HDAC (histona desacetilasa) en el extremo N-terminal. Las 3 son nucleares y tienen un dominio NES (nuclear export signal) no representado. B/ y C/ Representan la clase II. HDAC4 pertenece a la clase Iia tiene un dominio HDAC en su parte C-terminal y tres dominios de interacción de proteínas y factores de transcripción en su parte N-terminal. CtBP (c-terminal binding protein), MEF2 (myocyte enhancer factor 2) y la proteína 14-3-3. HDAC4 es nuclear y citoplásmico. HDAC6 es de la clase Iib, tiene dos dominios catalíticos HDAC en tándem en sus extremos N-terminal y C-terminal. HDAC6 está localizado en el citoplasma.

La subclase Iib se compone de HDAC6 y de HDAC10. HDAC6 está localizado en el citoplasma y tiene 2 dominios catalíticos en conjunto (**Figura I.6**) [128, 133]. A diferencia de las demás HDACs, HDAC6 tiene en su extremo C-terminal un dominio dedo de zinc, HUB (del inglés *HDAC6-USP3-Brp2-related zinc finger*) que predispone la proteína a una ubiquitinación y a una eventual degradación [128, 133]. HDAC6 es una tubulina desacetilasa que puede formar un complejo con HDAC11 en el núcleo [128] aunque su actividad desacetilasa no parece ser dependiente de la asociación de complejos corepresores [133]. En cuanto a HDAC10 se conocen dos variantes. La variante1 (HDAC10v1 o HDAC10 α) es nuclear y presenta dos dominios catalíticos, uno en su extremo N-terminal y otro en su extremo C-terminal. HDAC10 tiene hasta un 37% de homología con HDAC6 [127], sin embargo puede formar complejos con las HDACs de clase I (HDAC1, HDAC2) [127] y de clase Iia (HDAC4, HDAC5, HDAC7) y además interactuar con el corepresor SMRT [127, 128]. HDAC10 es la enzima más reciente hallada y todavía su nomenclatura no está completamente fijada [127, 134].

1.3.1.2.2. Clase III

La clase III consta de siete miembros denominadas sirtuinas: SIRT1, SIRT2, SIRT3, SIRT4, SIRT5, SIRT6 y SIRT7. Estas últimas tienen una homología con la proteína Sir2 de la levadura [132] que está involucrada en la represión de la transcripción ejerciendo una actividad desacetilasa o ADP-ribosiltransferasa [135, 136], aunque se ha mostrado que su actividad principal es la desacetilación. Las sirtuinas que no tienen una actividad desacetilasa, suelen tener una actividad ADP-ribosil transferasa, tal como SIRT4 y SIRT6. Para ser funcional, las sirtuinas necesitan imperativamente el cofactor NAD^+ , exhibiendo una actividad desacetilasa NAD^+ -dependiente [137]. Por cada lisina desacetilada, una molécula de NAD^+ se hidroliza para dar lugar a la nicotinamida y a la 2'-O-acetil-ADP -ribosa (**Figura 1.7**).

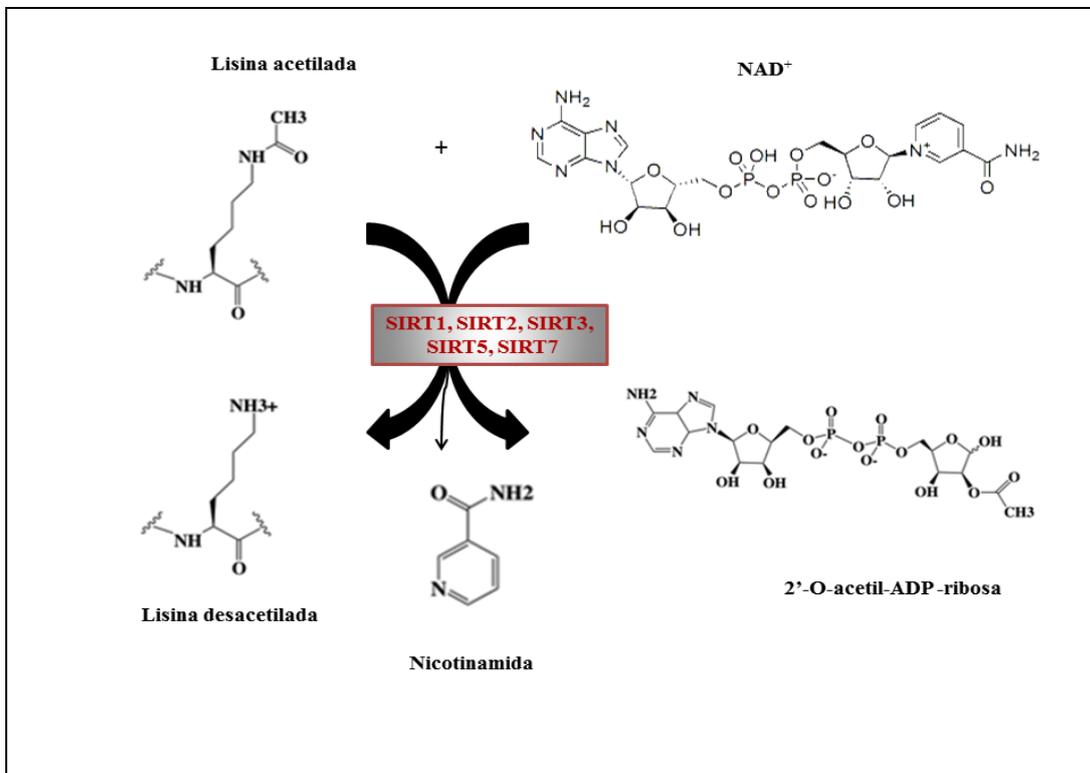


Figura 1.7: Reacción de desacetilación con las sirtuinas. En presencia de NAD^+ , las sirtuinas desacetilan las lisinas de las proteínas produciendo nicotinamida y 2'-O-acetil-ADP-ribosa. Las SIRT4 y SIRT6 tienen una actividad ADP-ribosiltransferasa que es también NAD^+ -dependiente.

Las homólogas humanas de Sir2 tienen un dominio catalítico conservado y cambios en los extremos N- y C-terminales [138]. Se encuentran ampliamente distribuidas aunque con una marcada especialización celular [136]. SIRT1 puede tener una localización nuclear y/o citosólica en función del tipo celular. Además, la proteína puede cambiar de localización durante el desarrollo alternando su localización nuclear y citoplasmática. SIRT1 posee 2 NLS (del inglés “*nuclear localization signal*”) y 2 NES (del inglés “*nuclear export signal*”). La translocación de SIRT1 está regulada por una

modificación post-traducciona inherente a la ruta PI3K clase I [139]. La proteína es capaz de interactuar con PCAF y desacetilarla, también desacetila las histonas H3 (K9 Y K14), H4 (K16) y p53 (K382) [135, 136] en el núcleo [139]. Su actividad desacetilasa sobre p53 regula negativamente la transcripción y la apoptosis dependiendo de esa vía; SIRT1 protege frente al estrés oxidativo [139, 140]. Sin embargo su localización citoplásmica aumenta la muerte opoptótica de manera caspasa dependiente [141]. El estudio de ratones deficientes en SIRT1 demuestra la importancia de esta proteína en el desarrollo celular [142]. SIRT1 y p300 [136] regulan BCL6 que es un factor de transcripción cuya actividad reprime los genes relacionados. La acetilación de BCL6 por p300 inhibe su efecto represor; no obstante, SIRT1 desacetila la proteína y aumenta la supervivencia celular. SIRT2 está localizada en el citoplasma, interactúa con HDAC6 y tienen a la tubulina como sustrato principal en la lisina 40 (K40) [135]. Durante la mitosis, SIRT2 se transloca al núcleo y desacetila la H4 en K16 [136] así tiene la capacidad de controlar la división celular. SIRT3, SIRT4 y SIRT5 tienen una localización mitocondrial donde se encuentran implicadas en la acetilación del 20% de proteínas mitocondriales. La mayoría están involucradas en el metabolismo y el estrés oxidativo [136]. Todavía no se conocen los sustratos específicos de SIRT5, sin embargo su homóloga bacteriana, CobB (del inglés “*Cobalamin, vitamin B12*”) desacetila la proteína acetil-CoA sintetasa [135]. SIRT6 es nuclear e interviene en la reparación del ADN. SIRT7 no está dotada de una actividad desacetilasa ni de una actividad ADP-ribosiltransferasa. No obstante tiene un papel crucial en la supervivencia celular; regula activamente la transcripción de los genes del ARN ribosomal en el nucléolo. Su nivel de expresión está incrementado en células tumorales. La depleción de SIRT7 induce la apoptosis [136].

Una desregulación de HATs y HDACs está implicada en la progresión de varias patologías. La acetilación de las histonas o de las proteínas no histonas por las HATs se produce a partir del acetil-CoA. Este es un regulador del metabolismo energético de las células. En mamíferos, el acetil-CoA es generado durante el ciclo de Krebs por la ATP citrato liasa (ACLY) o a partir del acetato por la enzima acetil-CoA sintasa 1 (AceCS1) en el citosol y la AceCS2 en la mitocondria [143]. Mientras que las HATs son moduladas por la producción de acetil-CoA, las sirtuinas dependen del estado energético celular. Su actividad desacetilasa está relacionada con el ratio $NAD^+/NADH$ producido durante el metabolismo energético. De hecho, las modificaciones epigenéticas o la desregulación de los procesos celulares no se limitan solamente a las actividades enzimáticas HATs/HDACs sino que también dependen del metabolismo celular y de la presencia del acetil-CoA.

1.4. Fuentes y destinos del acetil-CoA

El acetil-CoA es un precursor intermediario de la producción de energía en las células. Su producción tiene lugar en la mitocondria que es la fuente principal de producción de energía celular. La síntesis de acetil-CoA se produce en diferentes puntos como la glicolisis o la oxidación de ácidos grasos, entre otros. Durante la glicolisis, una molécula de glucosa da lugar a dos moléculas de piruvato. El piruvato se transporta a la matriz mitocondrial donde será oxidado en presencia de coenzima A (CoA) produciendo CO_2 y acetil-CoA por la enzima piruvato deshidrogenasa (PDH). Durante esta reacción, el NAD^+ que es el cofactor de las sirtuinas se reduce a NADH. La glicolisis genera 30-32 moléculas de ATP en la mitocondria. La glucosa es el sustrato energético más usado por las neuronas y las células eucarióticas en general. Una inhibición de la PDH disminuye el nivel de acetil-CoA en neuronas. En cuanto a la oxidación de los ácidos grasos, produce entre 3 a 4 veces más energía que la glicolisis. Los ácidos grasos libres se unen con el CoA en el citosol para formar acil-CoA, empleando para ello la energía liberada por la hidrólisis de ATP. Por medio de un transportador, el acil-CoA atraviesa la membrana mitocondrial y allí se oxida completamente a acetil-CoA, sufriendo ciclos de acortamiento en los cuales se libera una molécula del mismo por cada ciclo. Es decir un ácido graso de 16 átomos de carbonos dará lugar a 8 moléculas de acetil-CoA en la matriz mitocondrial.

Independientemente de su origen, el acetil-CoA se condensa con el oxaloacetato en la mitocondria durante el ciclo de Krebs facilitando la formación del citrato y la producción de dos moléculas de CO_2 , 3 NADH y 1 FADH_2 . El ratio NAD^+/NADH durante el ciclo de Krebs modula la actividad de las sirtuinas. Una parte del acetil-CoA no usado en la mitocondria se transloca al citoplasma en forma de citrato dado que la membrana interna es impermeable al acetil-CoA. En el citosol, ACLY transforma el citrato hasta oxaloacetato y acetil-CoA [144] el cual se destina a la síntesis de ácidos grasos [145], acetilación de proteínas (incluidas histonas) (**Figuras 1.8**) [146] y para la biosíntesis de acetilcolina [147]. Esta producción de acetil-CoA ocurre en el citoplasma y en el núcleo pues ACLY se localiza en ambos compartimentos [143]. No obstante ACLY no es la única fuente de acetil-CoA en el citosol, AceCS1 genera acetil-CoA a partir del acetato y del CoA [147]. La actividad de AceCS1 es regulada negativamente por acetilación, SIRT1 incrementa su actividad. Su homóloga mitocondrial, AceCS2 genera acetil-CoA por el ciclo de Krebs; SIRT3 desacetila la proteína en su K642 lo que aumenta la producción de acetil-CoA [136]. Dependiendo del tipo celular, AceCS1 puede tener una localización nuclear o citoplásmica. En ratones, la expresión de la proteína es predominantemente nuclear en el sistema nervioso central. Sin embargo esta expresión es mayor durante el periodo postnatal que en el adulto [148].

1.4.1. Síntesis de ácidos grasos y acetil-CoA

La actividad de ACLY está involucrada en el crecimiento y la diferenciación celular. Su nivel de expresión aumenta en las células cancerígenas así como la síntesis de nuevos ácidos grasos. Su actividad es regulada por varias modificaciones post-traduccionales, una fosforilación por la vía PI3K/AKT [144] y una acetilación en tres residuos lisina K540 K546 K554 por PCAF [145] además glicolisis-dependiente. Estas modificaciones aumentan la actividad y la estabilidad de la proteína. Aunque en otros estudios no se han relacionado la actividad y la fosforilación de ACLY [149]. A pesar de todo, la inhibición de ACLY induce la apoptosis en células primarias de páncreas; impide la lipogénesis y la proliferación en células cancerígenas pero no la acumulación de lípidos en el citosol [144]. ACLY es necesaria para la síntesis de nuevos lípidos y la diferenciación celular constituyendo además el vínculo entre glicolisis y lipogénesis. No obstante no es la única enzima involucrada en la síntesis de los ácidos grasos. Desde el metabolismo del acetato, AceCS1 induce la lipogénesis en el citosol y asegura la mielinización [148]; es una vía alternativa a ACLY y está modulada por la actividad desacetilasa de SIRT1 [150].

Por otra parte, SREBP-1 (del inglés “*sterol regulatory element binding protein-1*”), un factor de transcripción implicado en la regulación de la síntesis de las enzimas lipogénicas regula la transcripción de ACLY, de AceCS1, de acetil-CoA carboxilasa (ACC) y de ácido graso sintetasa (AGS) [150]. ACLY se localiza en el mismo brazo del cromosoma 17 junto con ACC y AGS [144]. Todas son enzimas lipogénicas aunque ACC y AGS se localizan corriente abajo de ACLY (**Figura 1.8**).

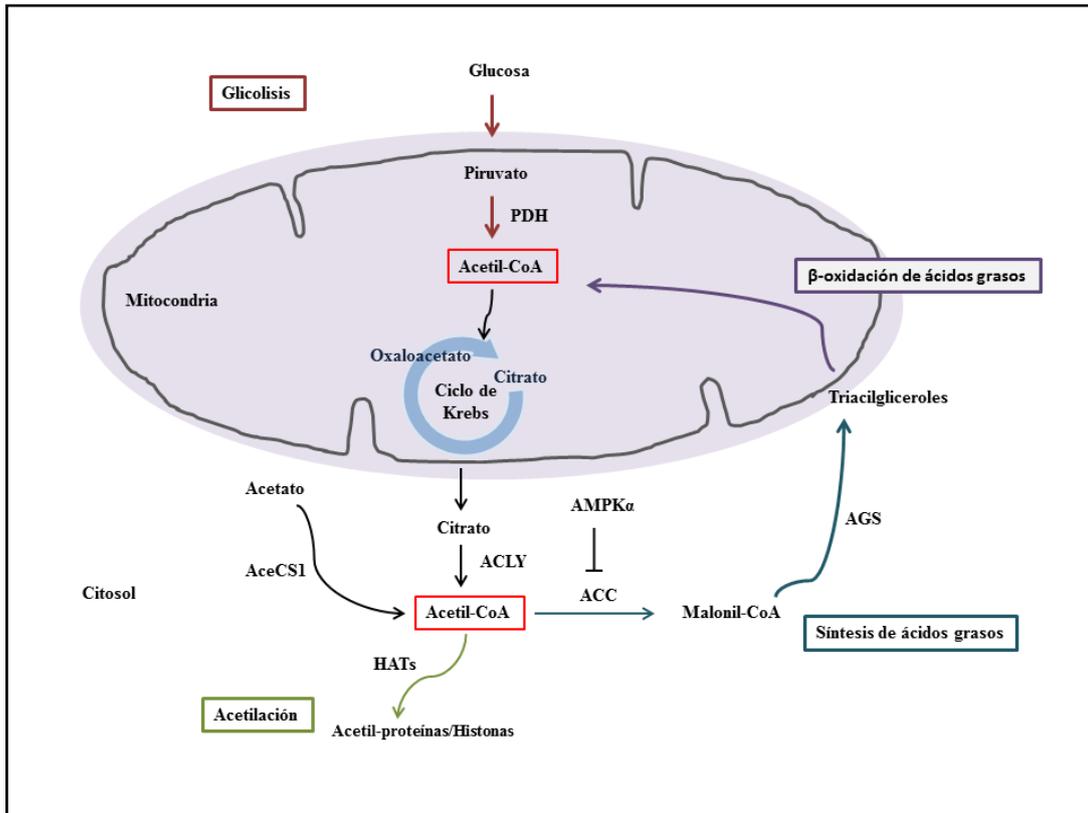


Figura 1.8: Síntesis y oxidación de acetil-CoA. La glicólisis y la β -oxidación de los ácidos grasos regulan la producción de acetil-CoA en la mitocondria. Este último está oxidado durante el ciclo de Krebs y/o destinado a través de ACLY o AceCS1 a otras vías citosólicas bajo las actividades de las HATs y de las enzimas lipogénicas tales como ACC y AGS.

AGS es la enzima implicada en la síntesis de ácidos grasos de cadena larga mediante la condensación del acetil-CoA y del malonil-CoA. El malonil-CoA está generado por el ACC. La síntesis de los ácidos grasos se acopla a la formación de triacilgliceroles como principal molécula de almacenamiento de energía [151]. En un ayuno o ejercicio físico, los ácidos grasos de cadena larga almacenados en forma de triacilgliceroles se oxidan en la β -oxidación para la producción de ATP en la mitocondria. Distintas enzimas modulan esos procesos. CPT-1 (del inglés *carnitine palmitoyltransferase*) participa en la β -oxidación favoreciendo el transporte de los acil-CoA grasos de cadena larga a través de la mitocondria sin embargo el malonil-CoA regula negativamente CPT-1. La expresión de AGS es muy pequeña en muchas células de mamíferos y es regulada en función del balance energético celular. En células cancerígenas, su actividad y su expresión se incrementan y no se ven moduladas por presencia de ácidos grasos libres o por el estatus nutricional. Su inhibición con inhibidores específicos o no inducen la apoptosis en células tumorales [151, 152]. AMPK es un sensor de equilibrio del estado energético de las células. Posee una subunidad α catalítica y dos subunidades reguladoras β y γ . AMPK está regulada por los niveles de AMP y ATP. Cuando el ratio AMP/ATP es elevado la proteína está activa por su unión con el AMP, acoplada a una fosforilación [153]. AMPK está fosforilada en su subunidad α por la quinasa AMPKK

(AMPK Kinase) en la treonina 172 [154]. Del mismo modo puede estar regulada por el estrés metabólico o la respuesta inflamatoria [155]. La activación de AMPK inhibe la actividad de ACC por fosforilación en la serina 79 [154] lo que aumenta los niveles de acetil-CoA. Al contrario, la actividad de ACC cataliza la síntesis del malonil-CoA para la síntesis de los ácidos grasos (**Figura 1.8**). Así, AMPK modula el metabolismo de los lípidos controlando el equilibrio energético. Además participa en la regulación del sistema de reciclaje celular. AMPK activada fosforila mTORC1 que es un inhibidor de la autofagia. De hecho, AMPK interactúa con ULK1, que es una proteína crucial por la inducción de la autofagia, fosforilandola [64].

1.4.2. Acetilación y Acetil-CoA

La acetilación de las histonas y de las proteínas es mayoritariamente dependiente de la producción de acetil-CoA de ACLY pero no es imprescindible. Su supresión disminuye el nivel de acetilación de las histonas. Sin embargo en caso de estrés y de daño del ADN, la célula se abastece de otras fuentes de acetil-CoA en ausencia de ACLY. La AceCS1 tiene un papel compensatorio en la modificación epigenética siempre y cuando ACLY no funciona y que haya acetato [143]. Durante el desarrollo cerebral o durante una lesión, AceCS1 está altamente más expresada en el núcleo que en el citoplasma, promoviendo la acetilación de las histonas, la expresión de los genes, y la diferenciación celular [148].

2. HIPÓTESIS

HIPÓTESIS

La mutación G2019S LRRK2 es la mutación más prevalente en casos de EP de origen genético y está involucrado en casos de origen esporádicos. La neurotoxicidad de la proteína en la EP está asociada a una alteración de la autofagia en diferentes estudios con la proteína LRRK2 endógeno o exógeno [47, 57, 60]. Estudios previos revelan que la inducción de autofagia está regulada por la acetilación [156, 157], además en enfermedades neurodegenerativas los niveles de acetilación de histonas son relativamente bajos [84]. La hipótesis principal de este trabajo plantea la relación directa o indirecta entre acetilación de proteínas y desarrollo de la enfermedad de Parkinson basándonos en estudios previos en modelos celulares o animales de EP tras la exposición a toxinas parkinsonianas o sobreexpresión de proteínas relacionadas con la enfermedad [87, 90]. En nuestro modelo de fibroblastos humanos procedentes de individuos portadores de la mutación G2019S de LRRK2, hemos podido comprobar que la autofagia está exacerbada [47]; lo cual abre un camino interesante para comprobar si existen también en este modelo cambios de niveles de acetilación. El propósito será esclarecer si estos cambios son debidos a la mutación o bien a la propia enfermedad.

3. OBJETIVOS

OBJETIVOS

1. Caracterizar los niveles de acetilación de proteínas en fibroblastos humanos porcedentes de individuos portadores o no de la mutación G2019S de LRRK2.
2. Estudiar el nivel de expresión de las HATs y su actividad enzimática en fibroblastos humanos porcedentes de individuos portadores o no de la mutación G2019S de LRRK2.
3. Estudiar el nivel de expresión las HDACs y su actividad enzimática en fibroblastos humanos porcedentes de individuos portadores o no de la mutación G2019S de LRRK2.
4. Evaluar los niveles de acetyl-CoA y las vías metabólicas asociadas en fibroblastos humanos porcedentes de individuos portadores o no de la mutación G2019S de LRRK2.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Materiales

En ese apartado, especificamos los materiales y los reactivos usados durante este trabajo

4.1.1. Aparatos

- ⊙ Agitador balanceo Rocker 25 Labnet
- ⊙ Agitador magnético con calefacción Raypa AG-2
- ⊙ Agitador magnético P Selecta Agimatic-S 7000242
- ⊙ Agitador de microplacas PSU-2T BIOSAN
- ⊙ Agitador Vórtex AGT-9 1100 Bunsen
- ⊙ Autoclave Raypa Steam Sterilizer
- ⊙ Balanza analítica ADAM modelo PW 124
- ⊙ Balanza electrónica AND modelo GF 300
- ⊙ Baño maría termostático Raypa
- ⊙ Baño seco Bunsen TMR
- ⊙ Benchtop UV transilluminator UVP M-20
- ⊙ Bidestilador MILLIPORE modelo Direct Q 5 Ultrapure Water Systems
- ⊙ Campana de flujo laminar nüve LN 090
- ⊙ Campana de gases Flores Valles
- ⊙ Campana DNA/RNA UV-Cleaner UVC/T-AR Biosan
- ⊙ Centrifuga refrigerada de mesa Heraeus Megafuge 1.0R
- ⊙ Centrifuga refrigerada de mesa HERMLE Z 36 HK
- ⊙ Centrifuga refrigerada Thermo Scientific Sorvall ST 8R
- ⊙ Citometro de flujo Beckman Coulter FC500-MPL
- ⊙ Congelador a -20 °C Edesa Practica
- ⊙ Congelador a -80 °C Heraeus modelo HERA freeze
- ⊙ Contador celular Automated Cell Counter TC10TM Bio-Rad
- ⊙ DynaMag spin Invitrogen 123-20D
- ⊙ Equipo de electroforesis Mini-Protean® III Cell Bio-Rad
- ⊙ Equipo de transferencia Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell Bio-Rad
- ⊙ Frigoríficos a 4°C y -20°C Daewoo
- ⊙ Fuentes de alimentación PowerPac™ 200 y PowerPac™ 300 Bio-Rad
- ⊙ Incubador de CO2 Thermo Scientific™ HEPA Class 100
- ⊙ Incubadora de CO2 con camisa agua Thermo Scientific™ serie 8000
- ⊙ Lectro de placas ELISA TECAN modelo SUNRISE
- ⊙ Lector de placas TECAN-PC modelo Infinite
- ⊙ Máquina de hielo granizado Scotsman modelo AF 80
- ⊙ Microcentrifuga Qualitron modelo DW 41
- ⊙ Microcentrifuga MIKRO 20 Hettich zentrifugen D-78532
- ⊙ Microscopio óptico Olympus TOKYO CK
- ⊙ Mini plate spinner MPS 1000 Labnet
- ⊙ Nanodrop 2000 Spectrophotometer

- ⊙ PCR 7500 Applied-Biosystems
- ⊙ pH-metro CRISON modelo GLP 21
- ⊙ Rotator Rotamix RM1
- ⊙ Thermal Cycler Bio-Rad T100
- ⊙ Vacusafe Integra Biosciences 158 3xx

4.1.2. Reactivos

➤ **Laboratorios Bio-Rad**

- ⊙ Anticuerpo anti-mouse IgG conjugado con HRP
- ⊙ Anticuerpo anti-rabbit IgG conjugado con HRP
- ⊙ CoomassieR Brilliant Blue R-250
- ⊙ Dodecil sulfato sodico (SDS)
- ⊙ Gel de poliacrilamida 4-20 % Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Gel
- ⊙ Gel de poliacrilamida 12 % Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Gel
- ⊙ Marcador de peso molecular para electroforesis de proteínas (Precision Plus Protein™ Dual Color Standars)
- ⊙ Tris/Boric acid/EDTA 10X (TBE) 161-0741
- ⊙ Certified Low Range Ultra agarose
- ⊙ 20 bp, 100 bp, 500 bp, 1 Kb molecular ruler.

➤ **Laboratorios BioVision**

- ⊙ Kit colorimétrico HAT
- ⊙ Kit colorimétrico HDAC
- ⊙ Deproteinizing Sample Preparation
- ⊙ Kit fluorimétrico de acetyl-CoA

➤ **Laboratorios Calbiochem**

- ⊙ Anticuerpo Tip60 policlonal (DR1041)

➤ **Laboratorios Cultek**

- ⊙ Kappa SYBR Fast Master Mix Universal (2x) B4KK4601

➤ **Laboratorios Fluka Chemika**

- ⊙ Paraformaldehido (PFA)
- ⊙

➤ **Laboratorios Fermentas:**

- ⊙ Enzima de Restricción BamH1 (SfcI).

➤ **Laboratorios Favorgen**

- ⊙ 6x loading dye

➤ **Laboratorios GIBCO**

- ⊙ Aminoácidos no esenciales
- ⊙ Medio de cultivo DMEM/F-12 con Glutamax 1X
- ⊙ Medio de cultivo Opti-MEMR I Reduced Serum Medium
- ⊙ Tripsina 10X 2,5 %

➤ **Laboratorios GE Healthcare**

- ⊙ Membranas de PVDF Hybond-P
- ⊙ Papel fotográfico Hyperfilm™ ECL

➤ **Laboratorios HyClone**

- ⊙ Estreptomina/penicilina (10 mg/ml de estreptomina y 10.000 U/ml de penicilina)
- ⊙ Suero fetal bovino (FBS)

➤ **Laboratorios IDT**

- ⊙ Oligonucleótidos sintéticos de ADN complementario para ACC
- ⊙ Oligonucleótidos sintéticos de ADN complementario para ACLY
- ⊙ Oligonucleótidos sintéticos de ADN complementario para AGS
- ⊙ Oligonucleótidos sintéticos de ADN complementario para GAPDH
- ⊙ Oligonucleótidos sintéticos de ADN complementario para HDAC1
- ⊙ Oligonucleótidos sintéticos de ADN complementario para HDAC2
- ⊙ Oligonucleótidos sintéticos de ADN complementario para HDAC3
- ⊙ Oligonucleótidos sintéticos de ADN complementario para HDAC4
- ⊙ Oligonucleótidos sintéticos de ADN complementario para HDAC6
- ⊙ Oligonucleótidos sintéticos de ADN complementario para HDAC7
- ⊙ Oligonucleótidos sintéticos de ADN complementario para hMOF
- ⊙ Oligonucleótidos sintéticos de ADN complementario para SIRT1
- ⊙ Oligonucleótidos sintéticos de ADN complementario para SIRT2
- ⊙ Oligonucleótidos sintéticos de ADN complementario para SIRT3
- ⊙ Oligonucleótidos sintéticos de ADN complementario para SIRT5
- ⊙ Oligonucleótidos sintéticos de ADN complementario para SIRT6
- ⊙ Oligonucleótidos sintéticos de ADN complementario para p300
- ⊙ Oligonucleótidos sintéticos de ADN complementario para PCAF
- ⊙ Oligonucleótidos sintéticos de ADN complementario para Tip60

➤ **Laboratorios intrón**

- ⊙ *RedSafe Nucleic Acid Staining Solution.*

➤ **Laboratorios Invitrogen**

- ⊙ Anticuerpo Alexa Fluor® 488 anti-rabbit IgG
- ⊙ Anticuerpo Alexa Fluor® 568 anti-mouse IgG
- ⊙ Hidroetidio D399

- **Laboratorios KODAK**
 - ⊙ Solución fijadora para película fotográfica
 - ⊙ Solución reveladora para película fotográfica

- ⊙ **Laboratorios life-technologies**
 - ⊙ *3,3'-dihexyloxycarbocyanine iodide* (DiOC₆(3))

- **Laboratorios Millipore**
 - ⊙ Anticuerpo GAPDH monoclonal (NG1740950)

- **Laboratorios Macherey Nagel**
 - ⊙ kit de extracción de Macherey-Nagel (740952.50)
 - ⊙ *Nucleospin Gel and PCR clean-up*.

- **Laboratorios Panreac**
 - ⊙ Ácido acético glacial
 - ⊙ Ácido clorhídrico (HCl) 37%
 - ⊙ Cloruro cálcico (CaCl₂)
 - ⊙ Cloruro magnésico (MgCl₂)
 - ⊙ Cloruro potásico (KCl)
 - ⊙ Cloruro sódico (NaCl)
 - ⊙ Etanol absoluto
 - ⊙ Fluoruro sódico (NaF)
 - ⊙ Fosfato disódico (Na₂HPO₄)
 - ⊙ Fosfato potásico (KH₂PO₄)
 - ⊙ Glicerina
 - ⊙ Glicina
 - ⊙ Metanol

- **Laboratorios Pierce**
 - ⊙ *ECL Plus Western Blotting Substrate*

- **Laboratorios QIAGEN**
 - ⊙ *HiPerfect Transfection Reagent (HiP)*
 - ⊙ *QuantiTect Reverse Transcription Kit*
 - ⊙ *RNeasy Mini Kit*

- **Laboratorios Roche**
 - ⊙ Nonidet P40 (NP40)
 - ⊙ *PhosSTOP phosphatase inhibitor cocktail tablets*
 - ⊙ *cOmplete mini EDTA free*

➤ **Laboratorios Santa Cruz Biotechnology**

- ⊙ Anticuerpo α -tubulina monoclonal (sc-8035)
- ⊙ Anticuerpo HDAC6 policlonal (sc-11420)
- ⊙ Anticuerpo acetil-Histona 4 Ser1K5K8K12 monoclonal (sc-393472)
- ⊙ Coctel Inhibidor de HDAC (sc-362323)

➤ **Laboratorios Sigma-Aldrich**

- ⊙ Ácido anacárdico
- ⊙ Ácido bicinchonínico (BCA)
- ⊙ Ácido linoleico
- ⊙ Albumina sérica bovina (BSA)
- ⊙ β -mercaptoetanol
- ⊙ Bromophenol Blue Solution
- ⊙ Dimetilsulfoxido (DMSO)
- ⊙ *DEPC-treated and sterile filtered, water for molecular biology*
- ⊙ Hoechst 33342
- ⊙ Nicotinamida
- ⊙ *Nile red*
- ⊙ Ortovanadato sódico (Na₃VO₄)
- ⊙ Rojo ponceau
- ⊙ RNasa ZAP C2284
- ⊙ Sulfato de cobre (II)
- ⊙ Sodio piruvato
- ⊙ Tricostatina A
- ⊙ Triclosan
- ⊙ Triton X-100
- ⊙ *Trypan blue solution (0,4 %)*
- ⊙ Tween 20
- ⊙ Yoduro de propidio (IP)

➤ **Laboratorios Thermofisher**

- ⊙ Placa negra poliestireno de 96 pocillos Cat. No.: 437869/ 437958
- ⊙ *Silencer negative control #1* AM4611

4.2. Métodos

4.2.1. Líneas celulares

En este estudio, hemos trabajado con cultivos primarios de fibroblastos humanos procedentes de biopsias de piel de individuos sanos o con la EP. Estas células fueron cedidas amablemente por el Dr. Adolfo López de Munaín del Hospital Donostia en San Sebastián. Tuvimos a nuestra disposición células procedentes de tres grupos de individuos (**Tabla 4.1**) en base a los cuales hemos realizado los siguientes grupos experimentales:

- Co: individuos control, sin ningún síntoma propio de la EP.
- Co α : individuos con la EP, pero de origen idiopático.
- GS: individuos con la EP y que poseen la mutación G2019S en el gen *PARK8* que codifica la proteína LRRK2.

Grupos	Nombres	Fecha de Nacimiento	Genotipo	Sexo
Co	Co1	1959	LRRK2 WT	Hombre
	Co2	1956	LRRK2 WT	Mujer
	Co3	1977	LRRK2 WT	Mujer
	Co4	1961	LRRK2 WT	Mujer
Co α	Co α 1	1928	LRRK2 WT	Mujer
	Co α 2	1932	LRRK2 WT	Hombre
	Co α 3	1954	LRRK2 WT	Mujer
GS	GS1	1945	G2019S Hetero	Hombre
	GS2	1949	G2019S Hetero	Hombre
	GS3	1949	G2019S Hetero	Hombre

Tabla 4.1: Presentación de los tres grupos de individuos. El grupo control se compone de 4 individuos y los grupos Co α y GS de 3 individuos cada uno. Exponemos en esta tabla, la edad, el sexo y el genotipo de cada individuo sano o con la enfermedad.

Hemos trabajado con líneas agrupadas. En estudios previos en nuestro laboratorio se caracterizó la autofagia en ellas. Los controles se comportan igual y los GS tienen una autofagia aumentada y se modulan de la misma manera entre ellas [47]. En base a esta similitud dentro del grupo Co y dentro del grupo GS, hemos hecho una caracterización de los niveles de acetilación dado que es el tema principal de nuestro trabajo. Las líneas de cada grupo tienen niveles de acetilación similares (**Figura 4.1**). Debido a este hecho, decidimos trabajar con acervos de cada una de los grupos, que denominaremos Co, Co α y GS.

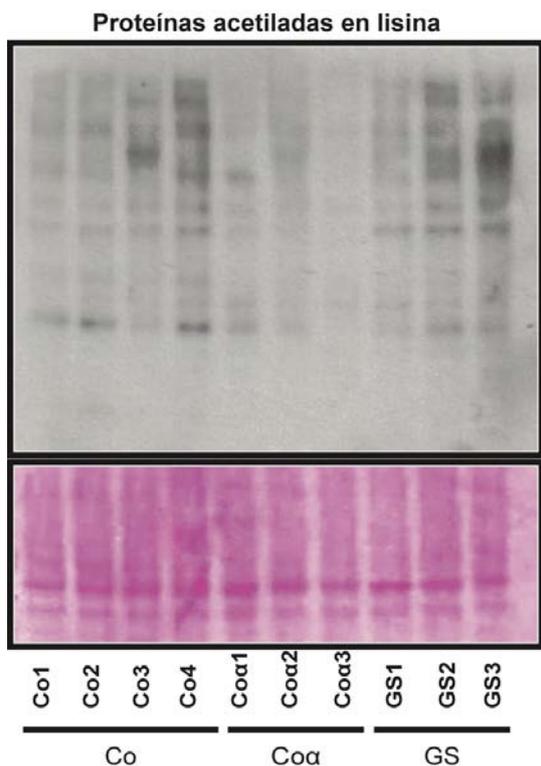


Figura 4.1: Niveles de acetilación en cultivos primarios de fibroblastos humanos. El rojo “ponceau” representa el control de carga del experimento

En paralelo, y para verificar nuestros resultados hemos usado células neuronales SH-SY5Y, que tienen una sobreexpresión estable del plásmido pET-DEST51 que contiene el ADN complementario entero de LRRK2 WT o de LRRK2 G2019S [158]. Son células de neuroblastoma humano y fueron cedidas amablemente por el Dr. Mark Cooper de Londres. Las denominaremos en el manuscrito como SH WT y SH G20.

4.2.2. Mantenimiento celular

El mantenimiento es un proceso de vital importancia a la hora de trabajar con cultivos celulares. Nos permite, a lo largo de nuestros experimentos, descongelar viales de células para poder amplificar, sembrar y tratar; pero también congelar nuevos viales que nos asegurarán el seguimiento de nuestro trabajo en el futuro.

4.2.2.1. Descongelación y congelación

Las células se congelan en una solución de 50% de suero fetal bovino (FBS; del inglés *foetal bovine serum*) y 10 % de dimetilsulfóxido (DMSO). Aunque tóxico a temperatura ambiente, el DMSO es un crioprotector que protege las células de los cristales de hielo, impidiendo la muerte de las células a temperaturas extremas. Sin embargo, el DMSO no es siempre apropiado porque puede inducir diferenciación en ciertas líneas celulares, en tal caso es mejor acudir al glicerol. Generalmente, congelamos una densidad celular de 1 millón aproximadamente en 1 mL de

FBS/DMSO en un tubo de criocongelación y lo guardamos en un congelador de -80°C. Lo ideal de una congelación es que sea lenta y progresiva. En cuanto a la descongelación, ha de ser rápida y a 37°C con el fin de eliminar el contacto de las células con el DMSO lo antes posible.

4.2.2.2. Cultivos celulares

Una vez descongelados, los fibroblastos humanos se mantienen en un medio de DMEM (del inglés *Dulbecco's modified eagle medium*) suplementado con 2 mM de L-glutamina, 10 U/mL de penicilina/estreptomicina, 10 % de FBS; las células neuronales en un medio DMEM/F12 (del inglés *Dulbecco's modified eagle médium/Nutrient mixture F-12*) suplementado con 2 mM de L-glutamina, 10 U/mL de penicilina/estreptomicina, 10 % de FBS, 1 % de aminoácidos no esenciales, 1 % de piruvato de sodio y ambos se incuban a 37°C en una atmósfera húmeda al 5% de CO₂. En los siguientes experimentos, los fibroblastos están sembrados a una densidad de 40.000 células/mL y las células neuronales a 150.000 células/mL. Y ambos tratados según el diseño de cada experimento.

4.2.3. Extracción del ADN genómico

Antes de procesar cualquier experimento con las células, comprobamos la falta o la presencia de la mutación G2019S LRRK2 en las diferentes líneas. Por ello, realizamos una extracción de ADN genómico [159]. Usamos el kit de extracción de Macherey-Nagel (740952.50). El kit está constituido de:

- ✚ Tampón de pre-lisis T1
- ✚ Tampón B1
- ✚ Reactivo B2
- ✚ Tampón de lisis B3 que es la mezcla del tampón B1 y del reactivo B2
- ✚ Tampón de lavado B5 al cual se añade etanol 100 %
- ✚ Tampón de lavado BW
- ✚ Tampón de elución BE (5 mM de Tris-HCl pH 8.5) sin EDTA
- ✚ Tampón proteinasa para disolver la proteinasa K liofilizada hasta 20 mg/mL
- ✚ Columnas de membrana de sílice
- ✚ Tubos de colección

Las células están pre-lisadas en 180 µL de tampón T1 complementado con 25 µL de proteinasa K. La proteinasa K favorece la digestión de las proteínas. Después, añadimos a la mezcla 200 µL de tampón de lisis B3. El lisado celular muy bien homogenizado se incubaba durante 10 min a 70°C. Añadimos a la muestra 210 µL de etanol 100 %. El ADN se recupera en una columna tras una centrifugación de 1 min a 11.000 x g. La columna

se lava dos veces con 500 μL de tampón BW (1 min a 11.000 x g) y 600 μL de tampón B5 (1 min a 11.000 x g), respectivamente. Una centrifugación adicional de 1 min a 11.000 x g después de los lavados permite secar la columna y eliminar los restos de etanol. Entre centrifugaciones, el sobrenadante recuperado en los tubos de colección es descartado minuciosamente con el fin de evitar una contaminación. El ADN se eluye (1 min a 11.000 x g) con el tampón BE previamente calentado a 70°C. El calentamiento del tampón BE mejora la elución del ADN en un 20 %, y estabiliza su composición. La pureza y la cantidad de ADN extraído están determinadas por el espectrofotómetro Nanodrop 2000. El ADN es puro cuando el ratio de la absorbancia a 260 nm y de la absorbancia a 280 nm (A_{260}/A_{280}) es de 1,8.

4.2.3.1. Amplificación del exón 41 del gen *LRRK2* por PCR

Trabajamos con una concentración de 10 ng/ μL del ADN extraído para amplificar el exón 41 del gen *LRRK2* donde se encuentra la mutación G2019S [159]. El exón está amplificado por PCR convencional usando el DreamTaq PCR Master Mix (2X) de ThermoFisher (#K1071) y los oligonucleótidos específicos siguientes (sentido: GAGCACAGAATTTTTGATGCTTG y anti-sentido: TTTATCCCCATTCCACAGCAGTAC. La Máster Mix contiene la mayoría de los componentes indispensables en la amplificación del exón (ADN polimerasa DreamTaq, tampón 2X DreamTaq, dNTPs y 4 mM MgCl_2). Para la reacción, mezclamos la Máster Mix con los oligonucleótidos, el ADN (**Tabla 4.2**) y efectuamos la PCR con los ciclos térmicos siguientes (**Tabla 4.3**).

	ADN (10 ng/ μL)	Máster Mix (μL)	Sentido (μL)	Anti-sentido (μL)	DEPC (μL)	Volumen total
Muestra (μL)	2	12,5	0,5	0,5	9,5	25

Tabla 4.2: Componentes de la reacción de PCR convencional

Etapas	1	2	3	4	5	6
Temperatura	95°C	94°C	60°C	72°C	72°C	4°C
Tiempo	4 min	45 s	45 s	1 min	5 min	-
Ciclos	1		35		1	-

Tabla 4.3: Condiciones de amplificación de la reacción de PCR para *LRRK2*.

4.2.3.2. Análisis de restricción

A continuación, el exón amplificado es sometido a una digestión con la enzima de restricción. En presencia de la mutación G2019S, la enzima Bfm I (Sfc I) hidroliza un sitio específico del exón 41 en dos bandas (**Figura IV.2**), gracias a su actividad endonucleasa. La reacción se realiza mezclando 10 μL del producto de PCR, obtenido en la **sección 3.1**, con la enzima de restricción (**Tabla IV.4**).

	Producto de PCR (μL)	Tampón 10X (μL)	Enzima de Restricción (μL)	DEPC (μL)	Volumen total
Muestra (μL)	10	3	1	16	30
Incubación	<i>15 min a 37°C</i>				

Tabla 4.4: Reacción de la enzima de restricción

La digestión se confirma con una separación de las bandas por electroforesis en gel de agarosa al 2 %. La agarosa (0,4 g) está disuelta en 20 mL de Tris/ácido bórico/EDTA (TBE) 10X al 5 %. La solución se calienta a ebullición y se la añade 1 μL de “red safe” antes de que se polimerice. El “red safe” es un intercalante de ADN que permite observar el ADN bajo luz ultravioleta (UV).

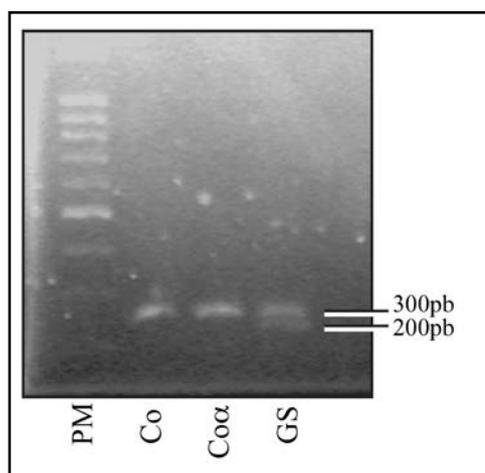


Figura 4.2:

Determinación de la mutación G2019S LRRK2 en los fibroblastos. La enzima de restricción Bfm I (Sfc I) hidroliza el exón 41 que tiene la mutación G2019S. Se observan dos bandas de 300 y 200 pares de bases que confirman que la mutación es heterocigoto.

4.2.4. Tratamientos

A lo largo de este trabajo hemos usado diferentes tratamientos (**Tabla IV.5**) para entender mejor el papel de ciertas vías de señalización o las interacciones entre ellas. Casi todos son inhibidores específicos o inespecíficos que detallaremos en el apartado de resultados.

Drogas	Disolvente	[Uso]	Diana	Fórmula química/P.M	Casa Comercial
3-Metiladenina	DMEM	10 mM	PI3K	C ₆ H ₇ N ₅ 149.15 g/mol	Sigma M9281
Ácido anacárdico	DMSO	10 μM	HATs	C ₂₂ H ₃₆ O ₃ 348.52 g/mol	Sigma A7236
Dorsomorfina	DMSO	10 μM	AMPKα	C ₂₄ H ₂₅ N ₅ O 399.49 g/mol	Sigma P5499
Nicotinamida	H ₂ O	1-100 mM	SIRTs	C ₆ H ₆ N ₂ O 122.12 g/mol	Sigma N0636
Ácido linoleico	Etanol	200 μM	-	C ₁₈ H ₃₂ O ₂ 300.45 g/mol	Sigma L1376
Triclosan	Etanol	1 μg/mL	FASN	C ₁₂ H ₇ Cl ₃ O ₂ 289.54 g/mol	Sigma PHR1338
Tricostatina A (TSA)	DMSO	1-100 μM	HDACs	C ₁₇ H ₂₂ N ₂ O ₃ 302.37 g/mol	Sigma T8552

Tabla 4.5: Inhibidores utilizados para bloquear diferentes vías de señalización. Se especifica, para cada uno de ellos, la concentración final de uso, la diana, el peso molecular y la fórmula química.

4.2.5. Detección de los niveles de expresión de proteínas

Los niveles de expresión de proteínas fueron determinados por la técnica de western-blotting. Para ello, las células previamente cultivadas y tratadas son despegadas con tripsina y recogidas. El pellet de células obtenido, tras una centrifugación de 700 x g durante 4 minutos a 4°C se resuspende en 1 mL de PBS frío y se traslada a un tubo de microcentrifugación donde sufrirá una segunda centrifugación de 4700 x g durante 4 minutos a 4°C. El sobrenadante se descarta y el pellet de células se guarda a -80° C. Dicho pellet fue lisado en el momento oportuno con el tampón NP40 al 0,5% complementado con inhibidores de fosfatasa, de proteasas, de desacetilasas y de acetilasas (**Tabla 4.6**).

Tampón de lisis NP40 usado en western-blotting			
<i>Compuestos</i>	<i>Concentración</i>	<i>Casa comercial</i>	<i>Referencia</i>
NP40 (v/v)	0,5 %	Roche	11754599001
Tris-HCl	100 mM	Sigma	T6066
NaCl	300 mM	Panreac	141659
Inhibidor de fosfatasas	1 pastilla	Roche	04906837001
Inhibidor de Proteasas	1 pastilla	Roche	11836170001
Inhibidor de HDAC (v/v)	10 %	Santa Cruz	sc-362323
Inhibidor de HAT (v/v)	1 %	Sigma	A72336

Tabla 4.6: Composición del tampón NP40. El pH (7,4) se ajusta con HCl. Una pastilla se disuelve en 10 mL de tampón.

Una vez el tampón de lisis se ha añadido, las muestras se incuban en hielo durante 10 minutos y posteriormente se centrifugan a 15115 g durante 15 min. El sobrenadante se recupera y se cuantifica mediante el método del ácido bicinchonínico.

4.2.5.1. Cuantificación de proteínas

El método del ácido bicinchonínico (BCA) es un ensayo colorimétrico que permite medir la concentración de proteínas disponibles en un extracto a una longitud de onda (λ) de 540-590 nm. La absorbancia es proporcional a la concentración proteica. La albumina sérica bovina (BSA; del inglés “*bovine serum albumin*”) es usada como proteína de referencia, realizando una recta de calibrado que varía de 0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ a 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de concentración. El BCA está mezclado con 2 % de sulfato de cobre. Un volumen de 200 μL de la mezcla será añadido a 5 μL de muestra en una placa de 96 pocillos (**Tabla 4.7**).

	Recta patrón					Muestra
	0	0.25	0.5	1	2	
BSA ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	0	0.25	0.5	1	2	-
H ₂ O (μL)	5	4.375	3.75	2.5	0	-
BSA(μL)	0	0.625	1.25	2.5	5	-
BSA(μg)	0	1.25	2.5	5	10	-
Muestra(μL)	-	-	-	-	-	5
BCA(μL)	200	200	200	200	200	200

Tabla 4.7: Preparación de la recta de calibración y de las muestras a cuantificar proteínas en un extracto proteico.

La placa se incubaba a 37°C durante 30 min. Las proteínas reducen los iones Cu^{2+} del sulfato de cobre en iones Cu^+ . Esos últimos tienen una afinidad con el ácido bicinchonínico que dará lugar a un complejo violáceo. Enseguida, la placa fue leída a

una $\lambda = 570$ nm con un lector de absorbancia de microplaca (TECAN Sunrise). Dependiendo de la cantidad de proteínas que cuantifiquemos, las muestras son preparadas y sometidas a una separación electroforética según el peso molecular de las proteínas.

4.2.5.2. Electroforesis

A las muestras minuciosamente preparadas se añade un tampón de desnaturalización (o de carga) 5X. Este tampón, por su composición, (**Tabla 4.8**) favorece la desnaturalización de las proteínas, la escisión de puentes bisulfuro, dando lugar a una buena migración.

Tampón de carga 5X			
<i>Compuestos</i>	<i>Concentración</i>	<i>Casa comercial</i>	<i>Referencia</i>
Tris-HCl	250 mM	Sigma	T6066
SDS (p/v)	10 %	Bio-Rad	161-0301
β -mercaptoetanol (v/v)	5 %	Sigma	M-7522
Glicerol (v/v)	50 %	Panreac	211339
Azul de bromofenol	0,025 %	Sigma	318744

Tabla 4.8: Composición del tampón de carga o de desnaturalización. El pH (6,8) ha sido ajustado con el HCl.

Las muestras previamente calentadas a 95°C durante 5 min (potenciando la desnaturalización de las proteínas) se cargan en un gel precast de poliacrilamida. En paralelo, se carga un marcador de peso molecular para situar la altura de las proteínas de interés. El tampón de electroforesis usado es el Laemli (**Tabla 4.9**).

Tampón de electroforesis (Laemli) Tris/Glicina/SDS Buffer 1X				
<i>Compuestos</i>	<i>Concentración</i>	<i>Volumen</i>	<i>Casa comercial</i>	<i>Referencia</i>
Tris	25 mM			
Glicina	192 mM	100 mL*	Bio-rad	161-0772
SDS (p/v)	0,1%			
H ₂ O	-	900 mL	Milli-Q	-

Tabla 4.9: Composición del tampón de electroforesis Laemli 1X. El pH final de dicho tampón es de 8,3.

*Dilución de 100 mL de Laemli 10X hasta 1L

4.2.5.3. Transferencia

Después de la electroforesis, las proteínas son transferidas del gel a una membrana de PVDF. Esta última es hidrófoba por lo tanto necesita ser activada con metanol durante un minuto. Durante este trabajo hemos preferido la transferencia en semi-seco mediante el tampón tris/glicina/metanol (**Tabla 4.10**).

Tampón de transferencia Tris/Glicina/Metanol 1X				
<i>Compuestos</i>	<i>Concentración</i>	<i>Volumen</i>	<i>Casa comercial</i>	<i>Referencia</i>
Tris	25 mM	100 mL*	Bio-rad	161-0771
Glicina	192 mM			
Metanol	-	200 mL	Panreac	131091
H ₂ O	-	700 mL	Milli-Q	-

Tabla 4.10: Composición del tampón de transferencia tris/glicina/metanol 1X. El pH final de este tampón es 8,3. *Dilución de 100 mL de Tris/Glicina 10X hasta 1L

Tras la transferencia, la membrana es incubada en una solución de 10 % (p/v) de leche durante 1h. El propósito es bloquear todos los sitios inespecíficos que podrán limitar el papel de los anticuerpos posteriormente usados. La leche se disuelve en una solución de Tampón salino Tris Tween (por TTBS del inglés *tween tris buffer saline*) (**Tabla 4.11**). Durante el bloqueo, teñimos el gel con azul de coomassie con el fin de asegurarnos del estado de la migración y de la transferencia [160].

Tampón salino Tris Tween (TTBS)			
<i>Compuestos</i>	<i>Concentración</i>	<i>Casa comercial</i>	<i>Referencia</i>
Tris-HCl	10 mM	Panreac	T6066
NaCl	50 mM	Panreac	141659
Tween (v/v)	0,2%	Sigma	P1379
H ₂ O	1L	Milli-Q	-

Tabla 4.11: Composición de la solución de lavado et de dilución de los anticuerpos. El pH de la solución es de 7,4.

Posteriormente, se realizan dos lavados de 10 minutos en TTBS y se incuba toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario de la proteína de interés. A continuación la membrana se lava 3 veces durante 5 min en TTBS, luego se incuba con el anticuerpo secundario conjugado a la peroxidasa del rábano picante (HRP del inglés "*horseradish peroxidase*") durante 1 hora a temperatura ambiente. La membrana será de nuevo lavada como se ha descrito previamente. El anticuerpo secundario se diluye de 1:5000 a 1:10.000 en 10 % de leche desnatada en una solución de TTBS. La elección del anticuerpo secundario entre monoclonal o policlonal depende siempre del anticuerpo primario (**Tabla 4.12**).

Materiales y métodos

Anticuerpos	P. M (kDa)*	Dilución	Solución TTBS	Isotipo IgG	Casa comercial y Referencia
ACC (C83B10)	280	1/1000	5 % BSA	Policlonal	Cell signaling #3676
p-ACC (Ser79) (D7D11)	280	1/1000	5 % BSA	Policlonal	Cell signaling #11818
Acetil-lisina (Ac-K)	un smear ^f	1/1000	5 % BSA	Policlonal	Cell signaling #9441
AceCS1 (D19C6)	78	1/1000	5 % BSA	Policlonal	Cell signaling #3658
ACLY	125	1/1000	5 % BSA	Policlonal	Cell signaling #4332
p-ACLY (Ser455)	125	1/1000	5 % BSA	Policlonal	Cell signaling #4331
AGS (C20G5)	273	1/1000	5 % BSA	Policlonal	Cell signaling #3180
AMPK (D5A2)	62	1/1000	5 % BSA	Policlonal	Cell signaling #5831
p-AMPK (Thr172) (40H9)	62	1/1000	5 % BSA	Policlonal	Cell signaling #2535
AKT	60	1/1000	5 % BSA	Policlonal	Cell signaling
GAPDH	37	1:5000	10 % Leche	Monoclonal	Milipore NG1740950
Ac-H3 (K14)	17	1/1000	5 % BSA	Policlonal	Cell signaling #4318
Histona 3	17	1/1000	5 % BSA	Policlonal	Cell signaling #9715
Ac-H4 (G-2) (Ser1K5K8K12)	11	1/200	10 % Leche	Monoclonal	Santa Cruz 393472
HDAC6 (H-300)	160	1/200	10 % Leche	Policlonal	Santa Cruz 11420
LC3	16, 18	1/5000	10 % Leche	Policlonal	Sigma M7522
mTOR	289	1/1000	5 % BSA	Policlonal	Cell signaling #2972
p-mTOR (Ser2448)	289	1/1000	5 % BSA	Policlonal	Cell signaling #2971
PCAF (C14G9)	93	1/1000	5 % BSA	Policlonal	Cell signaling #3378
SIRT1 (D1D7)	120	1/1000	5 % BSA	Policlonal	Cell signaling #9475
pSIRT1 (Ser47)	120	1/2000	5 % BSA	Policlonal	Cell signaling #2314
SIRT2 (D4050)	39, 43	1/1000	5 % BSA	Policlonal	Cell signaling #12650

SIRT3 (D22A3)	28	1/1000	5 % BSA	Policlonal	Cell signaling #5490
SIRT5 (D8C3)	30	1/1000	5 % BSA	Policlonal	Cell signaling #8782
SIRT6 (D8D12)	36, 42	1/1000	5 % BSA	Policlonal	Cell signaling #12486
TIP60	60	1/5000	10 % Leche	Policlonal	Calbiochem DR1041
α -tubulina	52	1/1000	10 % Leche	Monoclonal	Santa Cruz sc-8035
Ac-Tubulina (K40)	52	1/1000	5 % BSA	Policlonal	Cell signaling #3971

Tabla 4.12: Características y diluciones de los anticuerpos primarios específicos para cada proteína estudiada. *P.M es el peso molecular de la proteína en kilodaltons (kDa) [†]smear hace referencia a todas las proteínas acetiladas en una lisina

4.2.5.4. Revelado

La membrana se expone durante 5 minutos a una solución de ECL (del inglés “*Enhanced chemiluminescent by luminol*”), sustrato de la HRP. El ECL (Pierce) permite detectar la señal de las proteínas objeto de estudio debido a la oxidación del luminol en presencia de la HRP. Una película fotográfica detecta e impregna esta señal que será apreciable después de su inmersión en un líquido de revelador (KODAK) y fijado con un segundo líquido fijador (KODAK). Cada señal obtenida será cuantificada con el software Imagen J.

4.2.6. Actividad colorimétrica de las HDACs

Medimos la actividad total de las HDACs con un kit colorimétrico de BioVision (#K331-100). El kit contiene los componentes siguientes:

- ✚ 500 μ l de sustrato de HDAC
- ✚ 1 ml de tampón 10X de HDAC
- ✚ 1 ml de revelador de lisina (*Lysin developer* en inglés)
- ✚ 10 μ l de tricostatina A (TSA, 10mM), inhibidor de HDAC
- ✚ 50 μ l de extracto nuclear de células HeLa (5mg/ml)
- ✚ 20 μ l de estándar deacetilado (Ac-Lys-pNA, 10mM)

Para medir la actividad HDACs de muestras con este kit hay que tener una cantidad suficiente de proteínas, entre 50 y 200 μ g. En nuestro caso hemos decidido usar 130 μ g de proteínas por muestra que será diluída en agua bidestilada (ddH₂O) hasta un volumen final de 85 μ l. El extracto nuclear nos sirve de control positivo, y la TSA (tricostatina A) de control negativo. El propósito de este ensayo es detectar la cantidad de lisina desacetilada por las muestras testadas. Para ello, mezclamos en primer lugar las muestras con el sustrato de las HDAC y lo incubamos una hora a 37°C. A continuación añadimos una solución reveladora de esas lisinas y lo volvemos a incubar 30 minutos a

37°C (**Tabla 4.13**). Se forma un cromóforo cuya absorbancia fue leída a una $\lambda = 405$ nm en un lector de placas Asys UVM 340.

Condiciones	Muestra	ddH ₂ O	Tampón 10X	Substrato HDAC	Lysine developer	Volumen final
Muestra 130ug (μL)	Y*	85- Y	10	5	10	110
NE (μL)	10	75	10	5	10	110
TSA (μL)	2	83	10	5	10	110
Incubación	<i>1 hora a 37°C</i>				<i>30 minutos a 37°C</i>	

Tabla 4.13: Preparación e incubación de las muestras en una placa de 96 pocillos de fondo en U a 37°C. La absorbancia de la placa se lee a una $\lambda = 405$ nm. *Y es el volumen en μl de muestra correspondiente a 130 μg de proteínas

La actividad HDACs se representa como el valor de la absorbancia relativa por microgramo de proteína de la muestra. Además con el Ac-Lys-pNA podemos realizar una recta de calibrado creciente de 10-100 μM en el tampón 10X de HDAC (**Tabla IV.14**). La ecuación de la recta patrón nos permitirá determinar la cantidad absoluta de lisina desacetilada en las muestras. Este último paso no es necesariamente obligatorio.

<i>Recta de calibrado con la estándar desacetilada (Ac-Lys-pNA)</i>					
[Ac-Lys-pNA] μM	Volumen Ac-Lys-pNA (μL)	Tampón 10X (μL)	ddH ₂ O (μL)	Lysine developer (μL)	Volumen final
0	0	10	90	10	110
10	90	10	-	10	110
20	90	10	-	10	110
50	90	10	-	10	110
100	90	10	-	10	110
Incubación	<i>1 hora a 37°C</i>				<i>30 minutos a 37°C</i>

Tabla 4.14: Preparación de la recta de calibrado y su incubación a 37°C en las mismas condiciones que las muestras y en placa de 96 pocillos de fondo U. La absorbancia de la placa se lee a una $\lambda = 405$ nm. Su realización es opcional.

4.2.7. Actividad colorimétrica de las HATs

Hemos medido la actividad total de HATs con el kit de BioVision (#K332-100). Es un kit colorimétrico compuesto de:

- ✚ 2X de tampón HAT
- ✚ Substrato I de HAT (que es el acetil-CoA)
- ✚ Substrato II de HAT (que es el péptido substrato con tetrazolium)
- ✚ Enzima generador de NADH

- ✚ Extracto nuclear (NE, 4 mg/mL) (es un control positivo por el ensayo)
- ✚ Tampón HAT de reconstitución (para disolver los sustratos I y II de HAT)

En este ensayo, hemos usado 50 µg de proteínas de extracto total de lisis celular. Las muestras se diluyen en agua ddH₂O hasta un volumen final de 40 µL en una placa de 96 pocillos. Después, se prepara una mezcla de 68 µL (constituida por 50 µL de 2X de tampón HAT, 5 µL de sustrato I de HAT, 5 µL de sustrato II de HAT y 8 µL de la enzima generadora de NADH) que se añade a la muestra. Enseguida, se incuba la placa a 37°C entre 1 y 4 horas (**Tabla 4.15**).

Muestra		Mezcla					
<i>Condiciones</i>	<i>Muestras</i>	<i>ddH₂O</i>	<i>Tampón</i> <i>2X</i>	<i>Sustrato</i> <i>I</i>	<i>Sustrato</i> <i>II</i>	<i>NADH</i>	<i>Volumen</i> <i>final</i>
Muestra (µL)	Z	40-Z	50	5	5	8	108
BG (µL)	-	40	50	5	5	8	108
NE (µL)	10	30	50	5	5	8	108
Incubación				3 horas a 37°C			

Tabla 4.15: Preparación de las muestras en una placa de 96 pocillos de fondo llano para impedir la sobrestimación de la lectura de 40 %. La placa se incuba a 37°C durante 3 horas. La absorbancia se lee a una $\lambda = 440$ nm. *Z es el volumen en µl de muestra correspondiente a 50 µg de proteínas.

Durante la reacción se forma una coloración amarilla cuya absorbancia se lee a una $\lambda = 440$ nm. En realidad, las HATs de las muestras testadas usan el acetil-CoA como un cofactor para acetilar el péptido sustrato. Así, el CoA se libera y se reutiliza como coenzima por la enzima generadora de NADH. El NADH producido será detectado, por espectrofotometría a una $\lambda = 440$ nm, tras su reacción con el tetrazolio. De esta absorbancia se resta la absorbancia del ruido de fondo que tiene un valor muy relevante. La actividad HATs se representa como el valor de la absorbancia relativa por microgramo de proteína de la muestra.

4.2.8. Determinación de acetil-CoA por fluorimetría

Medimos basalmente la cantidad de acetil-CoA en cada muestra celular. Para realizar este experimento, necesitamos al menos $2 \cdot 10^6$ células/muestra. Las células están lisadas en 500 µL de tampón (1% Triton X-100, 20 mM Tris (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 2.5 mM pirofosfato de sodio, 1 mM β-Glicerol fosfato, 1 mM Na₃VO₄, 1 µg/mL Leupeptina, 1 mM PMSF). Las muestras se incuban en hielo durante 10 min y después se centrifugan durante 10 min a 13000 rpm a 4°C.

4.2.8.1. Desproteínización de las muestras

Después de la centrifugación, el sobrenadante es recuperado y desproteínizado para quitar todas las proteínas (92-98 %) que pueden interferir con la medición de los niveles de acetil-CoA. Así, añadimos al volumen inicial de muestra (500 μ L) 100 μ L de ácido perclórico (PCA) e incubamos durante 5 min en hielo. A continuación, centrifugamos las muestras a 13.000 x g durante 2 min a 4°C. Recuperamos en un nuevo tubo de microcentrifugación 380 μ L de muestra al cual añadimos 20 μ L de hidróxido de potasio (KOH). El KOH permite neutralizar las muestras y precipitar el exceso de PCA. Después de 5 min de incubación en hielo, valoramos el pH de cada muestra que ha de estar entre 6.5-8. Centrifugamos de nuevo las muestras a 13.000 x g durante 2 min para recuperar el sobrenadante y proceder a la medición del acetil-CoA. Para la realización de la desproteínización hemos usado el kit *Deproteinizing Sample Preparation* de BioVision (#K808-200).

4.2.8.2. Cantidad de acetil-CoA

En la siguiente etapa, usamos el kit fluorimétrico de BioVision (#K317-100) para determinar la concentración de acetil-CoA en cada línea celular. El kit contiene:

- ✚ Tampón de ensayo acetil-CoA
- ✚ *PicoProbe*
- ✚ Enzima de conversión
- ✚ Mezcla de enzima acetil-CoA
- ✚ Mezcla de sustrato acetil-CoA que se disuelve en 220 μ L de tampón de ensayo acetil-CoA
- ✚ *CoA quencher*
- ✚ *Quencher remover* que se disuelve en 220 μ L de dH₂O
- ✚ Acetil-CoA *standard* (1 μ M) que se disuelve en 100 μ L de dH₂O para generar 10 nmol/ μ L de acetil-CoA

En primer lugar realizamos una recta de calibrado de acetil-CoA con el acetil-CoA standard. Preparamos una solución de acetil-CoA de 2 pmol/ μ L a partir de la solución madre haciendo dos diluciones en serie de 1/100 y de 1/50, respectivamente. Esa última solución permite conseguir cantidades crecientes de acetil-CoA de 20, 60, 80, 100 pmol/pocillo (**Tabla 4.16**). En paralelo, tomamos 10 μ l de la muestra desproteínizada que mezclamos con los diferentes constituyentes del Kit fluorimétrico (**Tabla 4.16**). El conjunto se incuba en una placa negra de fondo llana (Thermo-fisher 437869). La fluorescencia se mide con el lector de placas TECAN-PC Infinite a una Excitación/Emisión de 535/589 nm.

	Recta patrón de acetil-CoA standard						Muestra	BG
Acetil-CoA 2 pmol/ μ L (μ L)	0	10	20	30	40	50	-	-
dH ₂ O (μ L)	50	40	30	20	10	0	-	-
Muestra (μ L)	-	-	-	-	-	-	10	-
BG(μ L)	-	-	-	-	-	-	-	0
Tampón de ensayo (μ L)	-	-	-	-	-	-	40	50
CoA quencher (μ L)	10	10	10	10	10	10	10	10
<i>Incubación 5 min a Temperatura ambiente</i>								
Quencher remover (μ L)	2	2	2	2	2	2	2	2
<i>Incubación 5 min a Temperatura ambiente</i>								
Mezcla* de reacción (μ L)	50	50	50	50	50	50	50	50
<i>Incubación 10 min a 37°C</i>								

Tabla 4.16: Preparación y tiempo de incubación de la recta de acetil-CoA standard y de la muestra desproteínizada para medir la cantidad de acetil-CoA por reacción fluorimétrica. *La mezcla de reacción lleva 41.8 μ L de tampón de ensayo + 2 μ L de mezcla de sustrato + 1 μ L de enzima de conversión + 5 μ L de mezcla de enzima + 0.2 μ L de PicoProbe. El BG no lleva enzima de conversión.

Después de la medición, los valores del BG se restan de los de las muestras. El BG está generado por el CoASH libre en las muestras. Para ello se usa el CoA quencher, para extinguir el CoA libre. Es oportuno recordar que tras la desproteínización, las muestras están diluidas al 0.8 %. Gracias a la ecuación de la recta patrón deducimos la cantidad de acetil-CoA en pmol.

4.2.9. Expresión de los niveles de ARN mensajeros (ARNm) por PCR

Para estudiar los niveles de expresión de ARNm, efectuamos una extracción total de ARN con el RNeasy mini kit de QIAGEN (#CAT 74104) en una cantidad de células entre $2\text{-}3 \cdot 10^6$. El kit consiste en: columnas mini spin, tubos de microcentrifugación de 1,5 mL, tubos de colección de 2 mL, tampón RLT, tampón RW1, tampón RPE, Agua libre de ribonucleasas (RNasas).

Antes de empezar la extracción, añadimos 1 % de β -mercaptoetanol de concentración 14,3 M al tampón de lisis RLT. El β -mercaptoetanol inactiva las RNasas para limitar la degradación del ARN. Se añaden también 4 volúmenes de etanol absoluto a un volumen de tampón RPE. Además, preparamos una solución de 70% de etanol absoluto en agua.

El etanol mejora la unión del ARN a la membrana de la columna, mientras los contaminantes se eliminan tras los lavados con los tampones RW1 y RPE respectivamente. De hecho, el 15-20 % del ARN total se elimina durante los lavados. Al final se queda mayoritariamente en la membrana el ARNm cuyo tamaño es superior a 200 bases.

4.2.9.1. Extracción del ARN total

Las células se lisan con 350 μL de tampón RLT, luego se añade al lisado homogeneizado un volumen de etanol al 70% (350 μL). Toda la mezcla bien homogeneizada se traslada a una columna colocada en un tubo colector. A continuación, la muestra se centrifuga a 8000 x g durante 15 s. Para evitar toda contaminación, el líquido se descarta y la columna se lava. Efectuamos un primer lavado con 700 μL de tampón RW1 durante 15 s a 8000 x g, posteriormente se realiza un segundo lavado con 500 μL de tampón RPE durante 15 s a 8000 x g y un tercer y último lavado con 500 μL de tampón RPE durante 2 min a 8000 x g. El resto de etanol se elimina con una centrifugación en vacío durante 1 min a 8000 x g. El ARN unido a la membrana de la columna se eluye con 30-50 μL de agua libre de RNasas a 8000 x g durante 1 min.

4.2.9.2. Calidad del ARN

La calidad del ARN se basa en su integridad y su pureza. Para determinarla, se realiza una electroforesis de las muestras a 100 V durante 20 min para poder detectar por UV las dos bandas 18S y 28S de ARN ribosomal (ARNr). La observación nítida de estas dos bandas asegura que el ARN está bien extraído y que no sufrió degradación. Por otra parte, se mide su concentración y su absorbancia con un espectrofotómetro, el Nanodrop. Si el ratio de la absorbancia (A) a una $\lambda = 260 \text{ nm}$ y a una $\lambda = 280 \text{ nm}$ se sitúa entre 1,9-2,1 ($A_{260}/A_{280} = 1,9-2,1$), el ARN es puro.

4.2.9.3. Síntesis del ADN complementario (ADNc)

Para la síntesis del ADNc a partir del ARNm, usamos el Kit “QuantiTect reverse transcription” de Qiagen (205311). La síntesis se lleva a cabo en dos etapas:

- Eliminación del ADN genómico (ADNg) colado en la muestra de ARN. Para ello el kit contiene un tampón *wipeout* (del español eliminar) de ADNg. Mezclamos 2 μL de ese tampón con 500 ng de ARN. La mezcla se completa con agua libre de RNasas hasta un volumen de 14 μL . La muestra se incuba en un termociclador durante 2 min a 45°C.
- Transcripción inversa del ARN limpio en ADNc. En esta segunda etapa, preparamos una mezcla compuesta de 1 μL de la enzima transcriptasa inversa, 4 μL del tampón de la enzima y 1 μL de “primer”. Este volumen de 6 μL se añade al volumen anterior de 14 μL . La mezcla total se incuba durante 15 min a 42°C y luego durante 3 min a 95°C para inactivar la enzima. El producto de la reacción se guarda en hielo entre las dos etapas y después de la síntesis.

Es también imprescindible controlar la calidad, la pureza y la concentración del ADNc con el Nanodrop. El ADNc es puro si el ratio A_{260}/A_{230} está entre 1,8-2,2 y de buena calidad cuando el ratio A_{260}/A_{280} está alrededor de 2. A continuación, se estudia la expresión de los genes de interés con la PCR cuantitativa a tiempo real.

4.2.9.4. PCR cuantitativa a tiempo real

Esta técnica permite medir a tiempo real la cantidad de genes amplificados mediante fluorescencia con el marcaje SYBR Green. SYBR Green es un intercalante cuya emisión aumenta cuando el marcaje se incorpora durante la polimerización del ADN de doble cadena. Su emisión de fluorescencia es proporcional a la cantidad de productos amplificados y se mide al fin de cada ciclo de amplificación. La fluorescencia es significativa en el momento que supera un valor umbral (*threshold* en inglés) de ciclo (Ct del inglés *threshold cycle*). El Ct disminuye cuando el gen en cuestión está muy expresado. Los genes de interés estudiados se amplifican con dos oligonucleótidos sintéticos (sentido y antisentido) (Tabla 4.17) específicos para la secuencia a amplificar.

Genes		Nucleótidos sintéticos	Casa IDT
ACC	Sentido	5'-CTGTAGAAACCCGGACAGTAGAAC-3'	65776067
	Antisentido	5'-GGTCAGCATAACATCTCCATGTG-3'	65776068
ACL	Sentido	5'-TGCTCGATTATGCACTGGAAGT-3'	65776069
	Antisentido	5'-ATGAACCCATACTCCTTCCCAG-3'	65776070
AGS	Sentido	5'-TCGTGGGCTACAGCATGGT-3'	65776065
	Antisentido	5'-GCCCTCTGAAGTCGAAGAAGAA-3'	65776066
GAPDH	Sentido	5'-AGCCACATCGCTGAGACA-3'	68815248
	Antisentido	5'-GCCCAATACGACCAAATC-3'	68815249
HDAC1	Sentido	5'-GTCCAGATAACATGTCCGGAGTACAGC-3'	65776039
	Antisentido	5'-CGATGTCCGTCTGCTGCTTATTAAG-3'	65776040
HDAC2	Sentido	5'-CCTCATAGAATCCGCATGACCCATAAC-3'	65776041
	Antisentido	5'-AGACATGTTATCTGGTCTTATTGACCGTAG-3'	65776042
HDAC3	Sentido	5'-CAAGCCATACCAGGCCTCCCAGC-3'	65776043
	Antisentido	5'-GAGATGCGCCTGTGTAACGCGAG-3'	65776044
HDAC4	Sentido	5'-CCTGCACAGACACGGGGAAGGTG-3'	65776045
	Antisentido	5'-GAGCTGCTCTTCAGACAGCAAGC-3'	65776046
HDAC6	Sentido	5'-TGCTGGGCCAGACCACCTCAGAG-3'	65776047
	Antisentido	5'-TGACGTAGTCTGGTCCAGTGTGGCTC-3'	65776048
HDAC7	Sentido	5'-CGGGCCAGGTGGTGGACGATGG-3'	65776049
	Antisentido	5'-GCCAGAGGAAGCAGCACAGTGTC-3'	65776050
hMOF	Sentido	5'-AGTACCCTGCAATCCCTCAAT-3'	65776071
	Antisentido	5'-GAGAGCTTGACTTGCTTGTGC-3'	65776072
p300	Sentido	5'-AGCCAAAGAAAAGATTTTCA-3'	65776061
	Antisentido	5'-ACATCACTGGGTCAATTTCTT-3'	65776062
PCAF	Sentido	5'-GCCCTAGCTGCTCATGTTTC-3'	65776063
	Antisentido	5'-GGTTTTTCAAATGGGGGTTT-3'	65776064
TIP60	Sentido	5'-TCCAGGCAATGAGATTTACCG-3'	65776073
	Antisentido	5'-TCTTATGGTCAAGGAAACACTTGG-3'	65776075
SIRT1	Sentido	5'-TGCGGGAATCCAAAGGATAATTCAGTGTC-3'	65776051

Materiales y métodos

	Antisentido	5'-CTTCATCTTTGTCATACTTCATGGCTCTATG-3'	65776052
SIRT2	Sentido	5'-CAGAACATAGATACCCTGGAGCGAA-3'	65776053
	Antisentido	5'-AAGGTCCTCCAGCTCCTTCTTC-3'	65776054
SIRT3	Sentido	5'-GTCCGGGCATCCCTGCCTCAAAGC-3'	65776055
	Antisentido	5'-GGAACCCTGTCTGCCATCACGTCAG-3'	65776056
SIRT5	Sentido	5'-CGAGTCGTGGTCATCACCCAGAACATC-3'	65776057
	Antisentido	5'-ACTCTTGTAATTCTCAGCCACAACCTCCAC-3'	65776058
SIRT6	Sentido	5'-GAGGAGCTGGAGCGGAAGGTGTG-3'	65776059
	Antisentido	5'-GGCCAGACCTCGCTCCTCCATGG-3'	65776060

Tabla 4.17: Oligonucleótidos de sentido y anti-sentido de los genes a amplificar. Los oligonucleótidos se disuelven en un tampón de Tris-HCl 10 mM de pH 8.

Además el ADNc está mezclado con reactivos, imprescindibles para la reacción de PCR, del kit de SYBR Green. De este modo, las muestras preparadas (**Tabla IV.18**) se incuban en condiciones adecuadas de desnaturalización, de hibridación y de polimerización (**Tabla 4.19**) en el termociclador modelo 7500 de Applied-Biosystems.

	Kit de SYBR Green		Oligonucleótidos		Agua	Volumen total	
	ADNc (10ng/ μL)	SYBR Green (μL)	ROX low (μL)	Sentido (μL)	Antisentido (μL)	DEPC (μL)	
Muestra (μL)	1,5	10	0,4	0,4	0,4	7,3	20

Tabla 4.18: Los componentes de la reacción de PCR a tiempo real

Etapas	1	2	3	4	5	6
Temperatura	50°C	95°C	95°C	56°C	95°C	72°C
Tiempo	2 min	10 min	15 s	1 min	15 s	15 min
Ciclos	1	1	35		1	1

Tabla 4.19: Ciclos térmicos y tiempo de amplificación de la reacción de la PCR cuantitativa a tiempo real

El nivel de expresión génica se cuantifica por la diferencia de Ct entre el gen de interés y el gen de referencia en nuestro caso el gen de la *GAPDH* ($\Delta Ct - \Delta Ct_{GAPDH} = \Delta \Delta Ct$). Así el valor relativo de la expresión génica se presenta como $2^{-\Delta \Delta Ct}$.

4.2.10. Viabilidad celular

Los estudios de viabilidad celular proporcionan información sobre los efectos citotóxicos/protectores de los tratamientos sobre las células y/o para encontrar las dosis que reducen el porcentaje de células vivas. Para analizar la viabilidad celular hemos recurrido a la técnica del MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide), al ensayo de anexina V-FITC/Yoduro de propidio (IP) y a la evaluación del potencial de la membrana mitocondrial y los niveles de producción de ROS.

4.2.10.1. Método del MTT

El ensayo del MTT es un test colorimétrico, que permite, tras un tratamiento, evaluar de manera relativa el número de células viables a través de sus actividades metabólicas. El MTT es una sal de tetrazolio que es reducida en un precipitado de cristales de formazán dentro de las células vivas. Una concentración final (0,45 mg/mL) de MTT se incuba con las células en cultivo a 37°C durante 2 h. El precipitado de formazán de color púrpura se disuelve en isopropanol ácido al 100 %. Su absorbancia se lee a una $\lambda = 570$ nm con el espectrofotómetro TECAN Sunrise.

4.2.10.2. Anexina V-FITC / Yoduro de propidio (IP)

El estudio de la viabilidad celular con los marcajes anexina V-FITC (anexina 5-isotiocianato de fluoresceína) y/o IP es mucho más específico porque informa sobre el tipo de muerte celular inducido por un tratamiento o no. La anexina V-FITC tiene afinidad por la fosfatidilserina, que es un fosfolípido situado en la parte interna de la membrana citoplasmática. En caso de muerte celular por apoptosis, la fosfatidilserina se externaliza a la superficie de la membrana celular facilitando entonces su unión con la anexina V-FITC. En paralelo, las células pueden sufrir una muerte necrótica que se consolida con un marcaje al IP. El IP se intercala en los núcleos de las células cuando las membranas celulares están alteradas o dañadas. La apoptosis y la necrosis pueden ser estudiadas juntas o por separado; gracias a que la anexina V está acoplada a la fluoresceína (FITC) y que el IP emite en el rojo. Los marcajes de las células con anexina V y IP desvelan 3 tipos de poblaciones celulares: viable, apoptótica y necrótica (**Tabla 4.20**)

Marcaje de las células con la anexina V y con el IP			
Poblaciones	Viable	Apoptosis	Necrosis y/o apoptosis secundaria
Anexina	-	+	+
IP	-	-	+

Tabla 4.20: Clasificación de la muerte celular con los marcajes de anexina V e IP. Las células apoptóticas son positivas a la anexina (+) y negativo al IP (-); las células necróticas son anexina V⁺/IP⁺ y las células viables son anexina V/IP⁻.

Trabajamos con tres pocillos por condición en una placa de 6 pocillos. Cada pocillo fue recogido individualmente en un tubo de citometría. Las muestras se centrifugan durante 5 min a 1200 rpm. El pellet conseguido por tubo se resuspende en 200 μ L de una mezcla de: 1/40 de anexina V-FITC + 1/10 del tampón de anexina V-FITC + PBS 1X hasta alcanzar dicho volumen. Los tubos se incuban durante 15 min a 37°C. Enseguida se añaden 10 μ L de IP (0,1 mg/mL) en cada tubo. Los resultados se consiguen con el citómetro de flujo donde se recogen 5.000 eventos por tubo.

4.2.10.3. Potencial de membrana mitocondrial:

El potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) es un signo anunciador de muerte celular y también del estado de la integridad de la membrana mitocondrial. Su variación se evalúa con una sonda fluorescente verde, el (DiOC₆(3)) (del inglés “3,3'-dihexyloxacarbocyanine iodide”) (Life technologies , D273). El DiOC₆(3) es un fluorocromo catiónico y lipófilo que queda retenido en las membranas internas de las mitocondrias de las células vivas. La escala de emisión del marcaje se desplaza del verde al rojo cuando se acumula en la matriz mitocondrial. En caso de muerte celular apoptótica o necrótica, las mitocondrias no retienen el marcaje o lo retienen con menos eficiencia: hablamos entonces de células DiOC₆(3) bajo. El $\Delta\Psi_m$ se disipa en las células muertas y se ve acompañado con un aumento de los niveles de producción de ERO.

4.2.10.4. Niveles de ROS

Hemos evaluado los niveles de ROS detectando la acumulación del anión superóxido intracelular con un marcaje azul fluorescente, el hidroetidio (HE) [161]. En presencia de O₂⁻, el HE está oxidado en etidio, el cual se intercala en el ADN y emite una fluorescencia en rojo [162-164]. Las células se incuban a una concentración de 4 nM de DiOC₆(3) y de 5 μ M de HE a 37°C. El porcentaje de células DiOC₆(3) bajo y etidio positivo se determina por citómetro de flujo analizando 5.000 células por tubo.

4.2.11. Inmunofluorescencia

Esta técnica permite determinar la distribución y la intensidad de las proteínas endógenas mediante una reacción antígeno-anticuerpo visualizando un marcaje fluorescente. De este modo, las células se siembran en una placa de 96 pocillos a un volumen de 100 μL /pocillo. Después de un tratamiento, se retira el medio y las células fijadas con paraformaldehído (PFA) al 4 % durante 20 min a temperatura ambiente para conservar todas las estructuras celulares. A continuación, la placa es incubada con una solución de BSA (1 mg/mL) en PBS 1X durante 1 h a temperatura ambiente para bloquear las reacciones inespecíficas. Posteriormente, procedemos a la incubación de los anticuerpos primarios específicos toda la noche a 4°C. Después de 3 lavados de 5 min cada uno con PBS 1X, la placa se reincuba con el anticuerpo secundario conjugado a un fluorocromo durante 1 h a temperatura ambiente. Los anticuerpos primarios y secundarios (**Tabla 4.21**) se diluyen en la solución de BSA (1 mg/mL). Entre incubaciones, la placa se lava con PBS 1X tres veces en agitación para eliminar el exceso de anticuerpos primarios y secundarios y también disminuir el ruido de fondo procedente de la fijación.

Anticuerpos primarios	Dilución	Casa comercial	Anticuerpos secundarios	Dilución	Casa comercial
Ac-K (AKL5C1)	1:50	Santa Cruz sc-32268	Alexa fluor 568	1:100	Invitrogen

Tabla 4.21: Relación de anticuerpos primarios y secundarios usados en inmunofluorescencia. El anticuerpo acetil-lisina (Ac-K) es monoclonal y se visualiza en rojo con el Alexa fluor 568. La acetil-tubulina 40 (Ac-Tub K40) es policlonal y se observa en verde.

Con esa misma técnica, hemos realizado un marcaje de vacuolas de lípidos (conocido como *lipid droplets* en inglés) usando un fluorocromo hidrofóbico que es el “Nile red” (Sigma, 19123). El marcaje está diluido en acetona a una concentración de 1 mg/mL. De una dilución intermedia de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, preparamos una concentración final de 100 ng/mL [165] en PBS 1X. Las células fijadas se incuban con dicha concentración al menos 10 min a temperatura ambiente y en la oscuridad. Por hidrofobicidad, el “Nile red” se incorpora directamente en el corazón de las vacuolas de lípidos y se une a los triacilglicérols, colesterol etc. El marcaje tiene un rango de excitación y de emisión muy amplio y varía según los tipos de lípidos [166]. Sin embargo lo hemos observado a una longitud de excitación/emisión 490/525. Con el programa Ifdotmeter® [167], medimos el número de puntas de vacuolas de lípidos. Las imágenes se visualizan con el microscopio invertido (Olympus IX51) equipado de una cámara fotográfica. La intensidad de las proteínas endógenas se analiza con el programa “CellProfiler”.

4.2.12. Silenciamiento de genes por siARN

El silenciamiento de un gen a través de su ARNm reduce su nivel de expresión un 70 %. El propósito es entender la implicación de ese gen en el desarrollo de una enfermedad y/o su papel en vías de señalización celular. Usamos un *small interfering* ARN (siARN) que impide la síntesis de proteínas provocando la degradación del ARNm correspondiente. El siARN se une a una región específica del ARNm complementario para cortarlo. El siARN es aniónico, necesita un transportador puesto que no puede atravesar la membrana plasmática [168, 169]. Así, usamos un reactivo, el Hiperfect (Qiagen, 301704) que es una mezcla de lípidos neutros y catiónicos que facilita el transporte y la liberación del siARN en las células.

La reacción se desarrolla en una placa de 6 pocillos. Mezclamos 10 nM de siARN y 2 μ L de Hiperfect en 250 μ L de medio Optimem; la mezcla se incuba 5 min a temperatura ambiente para favorecer la formación del complejo. Además, es importante elaborar la misma mezcla con siARN para el control negativo (scrambled). En paralelo, preparamos las células a una densidad de 40.000 células/mL. Posteriormente, mezclamos el complejo con las células y lo repartimos en la placa tras homogeneizar suavemente. Las células se mantienen en el incubador entre 24-72 h después de ser transfectadas; el tratamiento está incluido en este periodo. Hemos usado el siARN de AMPK α 1/2 Santa Cruz (sc-45312).

5. RESULTADOS

5.1. Variación de los niveles de proteínas acetiladas en modelos celulares de EP

El origen de la EP es multifactorial. Los factores medioambientales y genéticos pueden interactuar entre ellos y acelerar su progresión. Estos factores provocan modificaciones epigenéticas que regulan a nivel transcripcional y/o traduccional los fenotipos de la EP. Varios estudios han mencionado el papel crucial de la acetilación de las histonas [90] y de las proteínas en la progresión de esa enfermedad. Estudios realizados sobre células neuronales dopaminérgicas han mostrado que los factores medioambientales pueden aumentar el nivel de acetilación de las histonas [90].

Uno de los objetivos de este trabajo es de estudiar las diferencias de modificaciones epigenéticas que podría ocurrir en un modelo de fibroblastos procedentes de enfermos de Parkinson, entre grupos de origen genético (GS) y/o esporádico (Co α). Los niveles de proteínas totales acetiladas fueron analizados por western-blotting usando un anticuerpo anti acetil-lisina. Podemos observar que el modelo celular de fibroblasto humano presenta una variación en los niveles de proteínas acetiladas y que las proteínas con un peso molecular entre 15-25 kDa están menos acetiladas en las tres líneas. Sin embargo, las que están entre 37-250 kDa lo están mayoritariamente. Además, la línea GS parece tener mayor número de proteínas acetiladas entre 100-250 kDa y la línea Co α menos en ese rango. El control (Co) está más homogéneo, respecto a su nivel de acetilación, con respecto a las dos líneas con la EP (**Figura 5.1**).

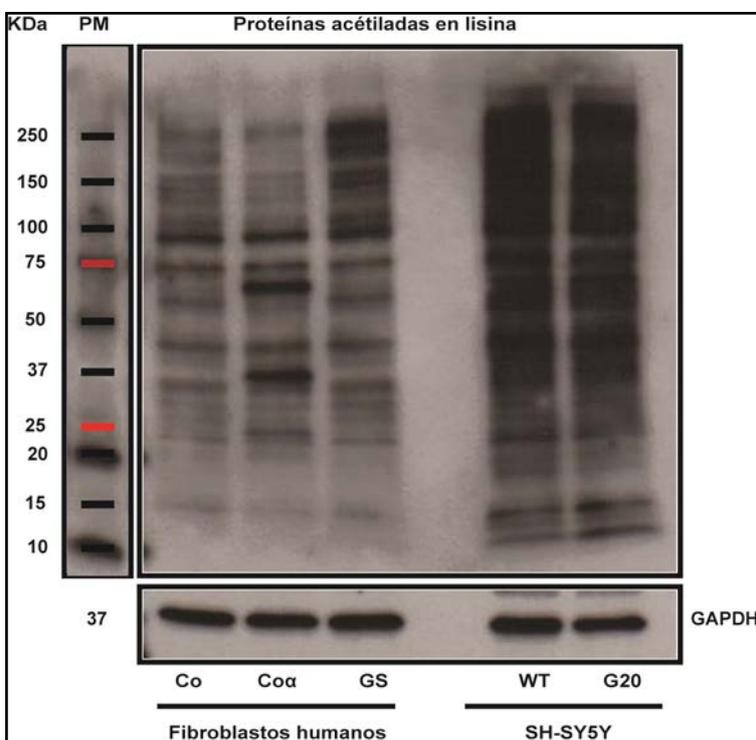


Figura 5.1: Acetilación de proteínas en modelos celulares de la EP. Las células han sido lisadas en un 80 % de confluencia sin exposición previa a ningún tratamiento. Los extractos celulares totales se analizan por Western-blotting con el anticuerpo anti acetil-lisina que reconoce todas las proteínas acetiladas en un residuo lisina en su extremo N-terminal. Tras el reconocimiento se detecta un "smear" de proteínas a distintos pesos moleculares (PM) expresado en kilodalton (kDa). Se utiliza GAPDH como control de carga. Se muestra el resultado representativo de 3 experimentos independientes.

En la misma figura hemos analizado las proteínas acetiladas en la línea SH-SY5Y, células neuronales dopaminérgicas sobreexpresando la proteína conteniendo la mutación G2019S LRRK2 (G20) o bien la forma silvestre LRRK2 (WT). Como podemos observar, existe una variación casi similar a la de los fibroblastos GS en la región de 15-25 kDa. Además entre 25-100 kDa muchas proteínas parecen estar acetiladas con el mismo patrón que en los fibroblastos GS, aunque las SH-SY5Y G20 tienen una señal más intensa (**Figura 5.1**). A pesar de que haya una diferencia de señal entre células neuronales y fibroblastos, ambos modelos con la mutación G2019S LRRK2 muestran proteínas acetiladas a la misma altura. Sin embargo, se observa una diferencia de proteínas acetiladas entre fibroblastos de individuos idiopáticos y de individuos con la mutación G2019S de la proteína LRRK2 (**Figura 5.1**). Sin embargo mediante inmunofluorescencia, no hemos notado una diferencia significativa en los niveles de acetilación entre las tres líneas (**Figura 5.2A, B**), aunque los GS muestran un ligero incremento y el marcaje parece perinuclear.

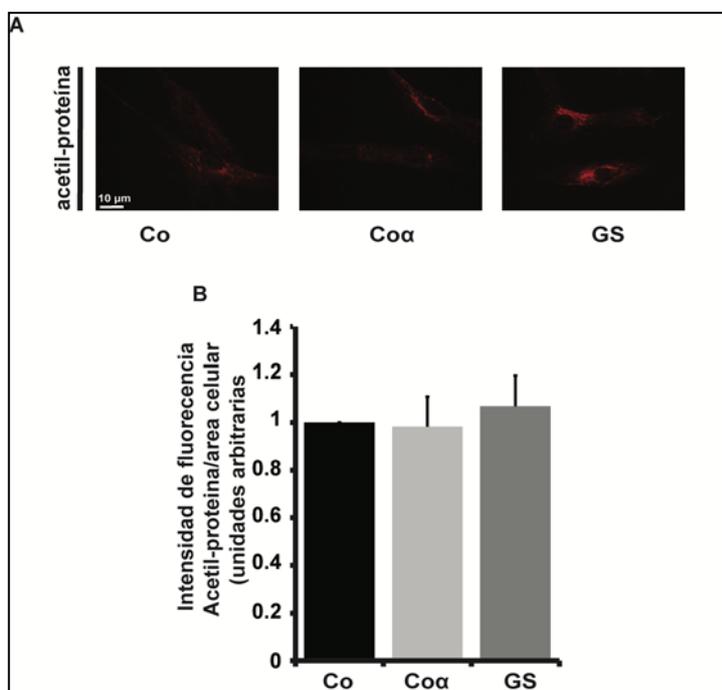


Figura 5.2: Inmunofluorescencia de los niveles de proteínas totales acetiladas en modelos de EP. Las células son sembradas, fijadas e incubadas con el anticuerpo primario anti acetil-lisina y su correspondiente anticuerpo secundario conjugado con Alexa Fluor (rojo) para ser visualizadas mediante microscopía de fluorescencia. (A) Microfotografías representativas de inmunofluorescencia. (B) Intensidad de fluorescencia por área celular (en unidades arbitrarias). La barra de escala se corresponde con 10 μm de longitud. Los datos son expresados como la media \pm error estándar de 3 experimentos independientes ($p > 0.05$).

5.2. Actividad de las histonas acetiltransferasas

La actividad de las HATs afectan los niveles de acetilación de proteínas. Sus actividades se encuentran modificadas en varios modelos de enfermedades neurodegenerativas [90, 170], incluyendo las enfermedades de Parkinson y Alzheimer. En un modelo de estrés oxidativo de la EP *in vivo* e *in vitro*, los niveles de la proteína CBP están incrementados con la toxina dieldrin induciendo una hiperacetilación de las histonas 3 y 4 [90]. Mientras que en un modelo genético de SNCA A30P, A53T o de la forma nativa sobreexpresada se observa una disminución del nivel de acetilación de

histonas debido a una interacción nuclear de la proteína con las histonas [87]. Ambos fenotipos, hiperacetilación o hipo-acetilación de las histonas, promueven una muerte celular por apoptosis en esos modelos de estudios promoviendo la neurodegeneración. Sin embargo en presencia de MPP⁺, la SNCA citosólica reduce el nivel de la acetiltransferasa p300 exhibiendo a la vez una hipo-acetilación con un efecto neuroprotector [171].

Dado que hemos observado muchas variaciones de proteínas acetiladas entre células control y de enfermos (idiopáticos y mutantes), y también entre estos dos grupos, consideramos necesario analizar la actividad de las HATs. Por ello usamos un kit colorimétrico aunque, y dado que no hemos realizado un fraccionamiento subcelular, no distinguimos las HATs nucleares de las citoplásmicas. En la **figura 5.3** podemos observar como no existen diferencias significativas en la actividad total HAT en ninguno de los grupos estudiados, aunque existe una cierta tendencia a presentar mayor actividad en los grupos Co α y GS sobre el control. Estos resultados se confirman con las células neuronales que sobreexpresan las formas silvestre y mutante G2019S de LRRK2. Las células SH-5Y5Y G20 presentan una mayor actividad aunque, como en el caso de los fibroblastos, ésta no es estadísticamente significativa.

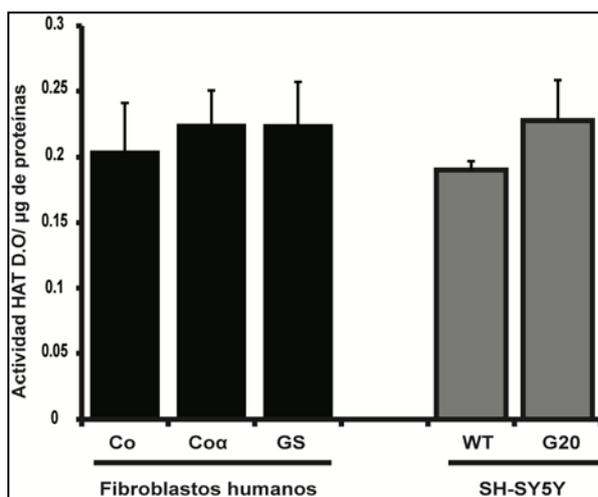


Figura 5.3: Actividad global de las HATs en fibroblastos y neuronas. La actividad de las HATs se ha evaluada con 50 μ g de proteínas a partir de un extracto total de lisados celulares. La actividad se determina con la medida de la densidad óptica (D.O), de la coloración amarilla de la reacción NADH-tetrazolinium, por espectrofotometría a una λ de 440 nm. Los resultados están presentados en D.O/ μ g de proteínas ($p > 0.05$). Los datos son expresados como la media \pm error estándar de 3 experimentos independientes.

5.3. Niveles de expresión de las HATs

Aunque la actividad total de las HATs no ha variado de manera significativa, este resultado no implica que individualmente alguna o algunas de ellas pudieran ver incrementada su expresión (**Figura 5.1**). Para probar esta hipótesis realizamos un estudio de expresión génica de tres familias de HATs mediante la técnica de PCR cuantitativa a tiempo real. Sorprendentemente, ninguno de los cuatro genes de HATs testados (*p300*, *Pcaf*, *Tip60* y *hMOF*) ha mostrado un incremento de su nivel de expresión (**Figura 5.4**).

Resultados

En los fibroblastos, no hay una variación significativa del nivel de expresión de p300 en ninguna de las líneas (**Figura 5.4A**). En cuanto a PCAF (**Figura 5.4B**) y Tip60 (**Figura 5.4D**), se observa una reducción significativa en los G2019S y en los idiopáticos, respectivamente. Sin embargo, el nivel de transcripción de estas tres HATs no varía en las células neuronales. Hay que destacar que la HAT hMOF disminuye significativamente en ambos modelos (**Figura 5.4C**).

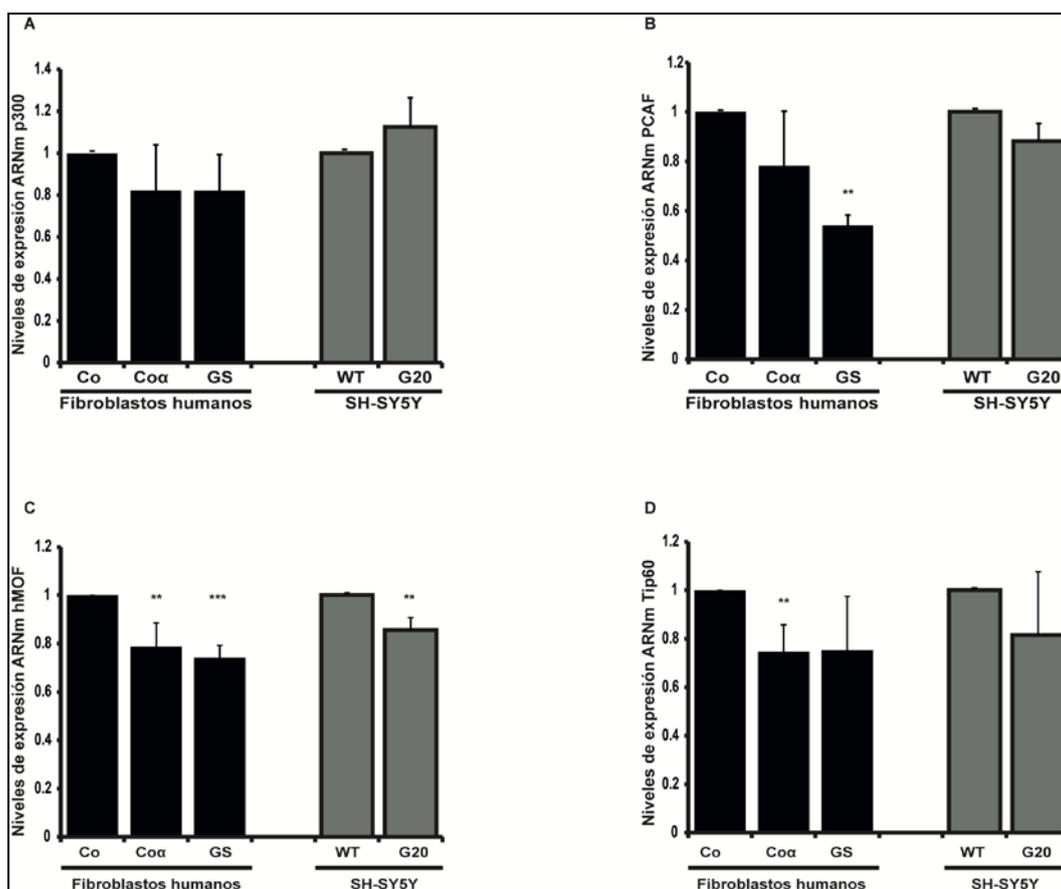


Figura 5.4: Expresión de ARNm de tres familias distintas de HATs. Niveles de expresión génica de los diferentes genes *p300* de la familia p300/CBP (A), *PCAF* de la familia GNAT (B), *hMOF* (C) y *Tip60* (D) de la familia MYST se han determinado sin exponer las células a ningún tratamiento por PCR cuantitativa. El nivel de expresión del ARNm de cada gen se ha evaluado utilizando el GAPDH como gen de referencia (** $p \leq 0.01$ y *** $p \leq 0.001$). Los datos representan la media \pm error estándar de 3 experimentos independientes.

Poco se sabe acerca de los niveles de transcripción de las HATs p300, PCAF, Tip60 y hMOF en la EP. Las HATs más destacadas en neurodegeneración siguen siendo las de la familia CBP/p300. En modelos de ALS y de Alzheimer, el nivel de expresión génica de *CBP* no se modifica aunque a nivel de proteína se observa una reducción de su concentración de manera caspasa-dependiente provocando una bajada del nivel de acetilación de las histonas [170]; tampoco cambia el nivel de ARNm de p300 en modelos celulares y ratones transgénicos de la SNCA [171]. Ambos estudios

Resultados

relacionan distintas enfermedades neurodegenerativas con la hipo-acetilación a través de la degradación de las proteínas acetiltransferasas. No obstante, la hipo-acetilación puede resultar tóxica o neuroprotectora según la patología estudiada.

PCAF está involucrada en las enfermedades crónicas y modula la respuesta neuroinflamatoria [172] y la respuesta al estrés [173]. En un modelo celular de la EA, su actividad HAT acelera la toxicidad inducida por la β -amiloide acetilando y activando NF- κ B. Así, su silenciamiento protege frente a la neurotoxicidad, tanto *in vitro* [172] como *in vivo* [174], provocada por la β -amiloide. Sin embargo, en ratones PCAF KO no se observa una hipo-acetilación de los sustratos de la acetiltransferasa tal y como la H3K14 y la H4K16 [173]. En las células GS, la disminución significativa del nivel de transcripción de *Pcaf* no afecta su nivel de proteína en western-blotting (**Figura 5.5A, B**). Resultados similares fueron obtenidos con un modelo de *Drosophila* transgénica de la EH donde una pérdida parcial del gene *Pcaf* no estaba acompañada de una disminución de la proteína [175].

Tip60 controla la muerte celular por apoptosis regulando la transcripción de genes implicados (calpain, AliX, p53 vía TRAF4 y CG9418) en diferentes vías apoptóticas. La reducción de su actividad acetiltransferasa desregula la transcripción de 15 genes relacionados con la apoptosis que está asociada con la EP. Dependiendo de la actividad reducida o exacerbada de Tip60 y también de su capacidad de interactuar con proteínas, la regulación transcripcional de ciertos genes puede ser hipo- o hiperegulada [176]. Tip60 controla la apoptosis siempre y cuando su actividad no esté alterada. En las líneas de fibroblastos, el nivel de expresión de la proteína es diferente entre mutante e idiopático (**Figura 5.5C, D**) aunque de manera no significativa.

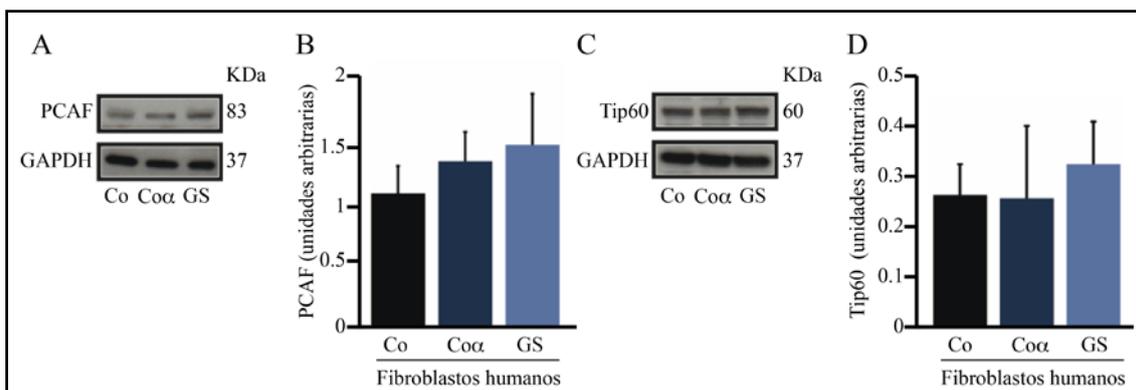


Figura 5.5: Expresión proteínica de PCAF y Tip60 en modelos idiopático y genético de Parkinson. Las células son sembradas y lisadas con un 80 % de confluencia sin exposición previa a ningún tratamiento. Los extractos celulares totales se analizan por western-blotting con el anticuerpo anti-PCAF y anti-Tip60. (A y C) Muestran los blot representativos de PCAF y Tip60, respectivamente. (B y D) Representan la densitometría de cada banda en unidades arbitrarias. La masa molecular está expresada en kilodaltons (kDa). Se utiliza GAPDH como control de carga. Los datos representan la media \pm error de 3 experimentos independientes ($p > 0.05$).

5.4. Modificaciones epigenéticas de histonas en fibroblastos de enfermos portadores de la mutación G2019S de LRRK2

A pesar de no haber observado una diferencia significativa de actividad HATs total entre las distintas líneas, hemos podido comprobar que las histonas 3 y 4 están hiperacetiladas en las GS e hipo-acetiladas en los Co α (**Figura 5.6, 5.7**). En ese experimento, hemos usado un anticuerpo H4Ser1K5K8K12 que reconoce la histona 4 fosforilada en la serina 1 y acetilada en las lisina 5, 8 y 12. Cuando H4 está muy hiperacetilada presenta un peso molecular aparente de 35 kDa, sin embargo la detectamos alrededor de 11 kDa junto a otra banda de 17 kDa inespecífica al anticuerpo o a la proteína H3 (**Figura 5.6A, B**). Este resultado evidencia que solo uno de los residuos de la H4 se encuentra acetilado. De la misma manera la H3K14 (**Figura 5.7**) se encuentra también más acetilada en el grupo GS que en los idiopáticos. H4K8/H4K12 y H3K14 son sustratos de p300 y/o CBP [177] y PCAF [178]. Esos resultados señalan que en el grupo GS la actividad CBP/p300 y GNAT puede estar incrementada sin estar este efecto mediado por un cambio en su nivel de expresión.

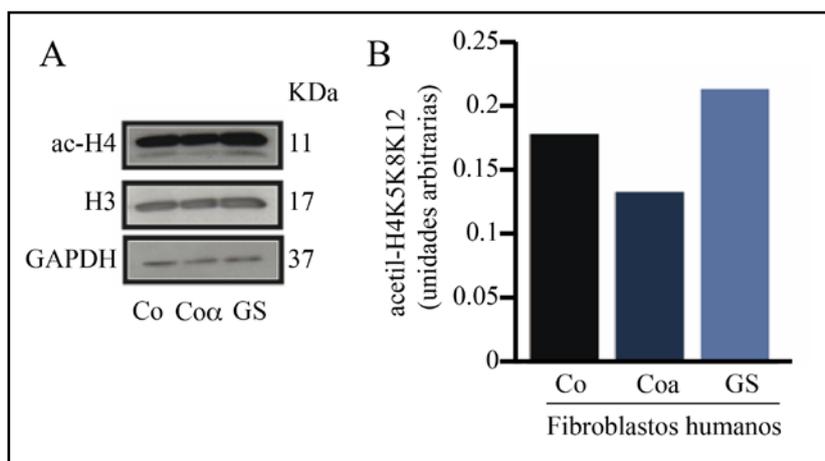


Figure 5.6: Hiperacetilación de Histona 4 en fibroblastos G2019S. Las células son sembradas y lisadas con un 80 % de confluencia. Los niveles de histona acetilada y total son determinados por Western-blotting con los anticuerpos anti acetil-H4K5K8K12, anti-H3. (A) Representa el blot representativo de acetil-H4 y H3, utilizando GAPDH como control de carga. La masa molecular está expresada en kilodaltons (kDa). (B) Muestra la densitometría del ratio acetil-H4/H3 en unidades arbitrarias.

Para confirmar nuestra hipótesis, decidimos entonces tratar las células con un inhibidor de HATs, el ácido anacárdico (A.A), el cual es un potente inhibidor de PCAF, p300 [179] y Tip60 [90]. Las células fueron incubadas durante 1h con 10 μ M de A.A para analizar por western-blotting las relaciones entre actividades de HATs y la acetilación de las histonas. Observamos una disminución de los niveles de acetilación de la H3K14 en todas las líneas excepto en GS (**Figura 5.7 A, B**), aunque no es

Resultados

significativa. De manera interesante la modulación basal de los niveles de acetilación de la H3 entre líneas se repite con el A.A con variaciones significativas entre ellas. Así el grupo GS presenta un mayor nivel de acetilación de H3K14 que el grupo Co α .

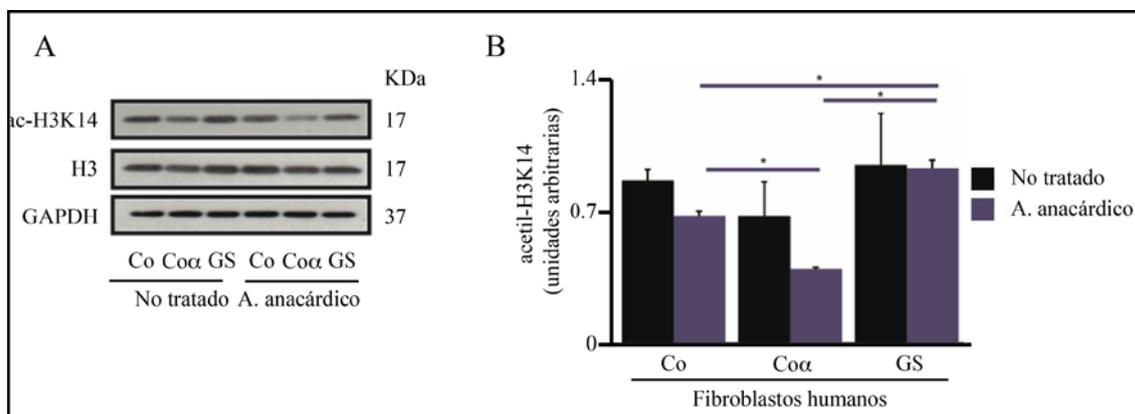


Figura 5.7: Efecto del ácido anacárdico sobre la acetilación de las histonas. Las células son sembradas y expuestas a 10 μ M de ácido anacárdico (A. anacárdico) durante 1 hora. El extracto celular total se analizó por western-blotting con el anticuerpo anti acetil-H3K14. (A) Muestra el blot representativo de acetil-H3K14 y H3, GAPDH se ha utilizado como control de carga. (B) Representa la densitometría del ratio acetil-H3K14/H3 en unidades arbitrarias. Los resultados son la media \pm error estándar de dos experimentos independientes (* p \leq 0.05). La masa molecular está expresada en kilodaltons (kDa).

Posteriormente, analizamos el efecto del A.A. sobre la viabilidad celular, y para ello incubamos las células con 10 μ M de A.A. durante 15 h y analizamos por citometría de flujo las células IP positivas (IP⁺). En la **figura 5.8**, se observa que los dos grupos (Co α y GS) de células procedentes de enfermos de Parkinson presentan un porcentaje de células IP⁺ mayor que la células control evidenciando un porcentaje de muerte celular basal mayor en ese grupos, siendo especialmente significativo en el grupo Co α . Este tratamiento con 10 μ M de ácido anacárdico presenta un efecto protector en los grupos Co α y GS aunque, sin embargo, resulta tóxico para las células control. Este hecho evidenciaría que existe una actividad acetiltransferasa importante para la supervivencia celular que se encontraría exacerbado en los grupos de células procedentes de enfermos, participando de la sensibilización de las mismas. De tal manera que la inhibición de las mismas en el grupo control las hace más vulnerables mientras que la inhibición de las mismas en el grupo Co α produce un efecto citoprotector.

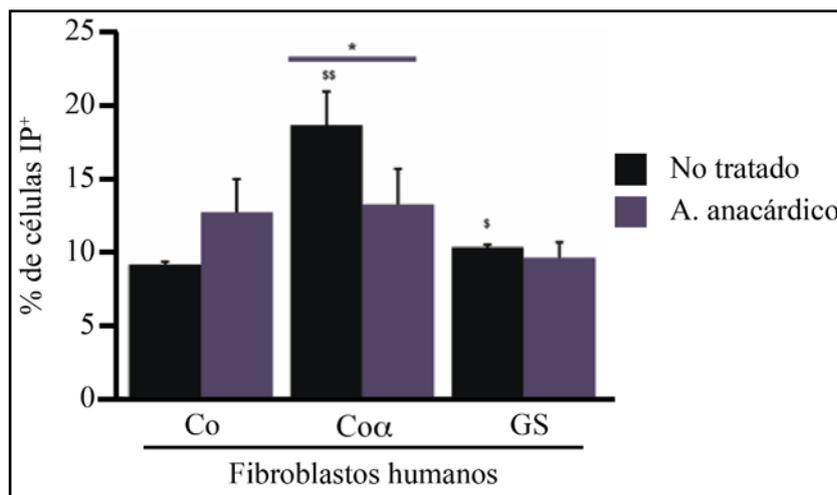


Figura 5.8: Efecto citoprotector del ácido anacárdico en células de enfermos idiopáticos. Las células son sembradas y expuestas a 10 μ M de ácido anacárdico (A. anacárdico) durante 15 h. Los datos representados son el porcentaje de células IP⁺ de cada línea en 5000 eventos. Los resultados son la media \pm error estándar de dos experimentos independientes (\$\$ $p \leq 0.01$, \$\$\$ $p \leq 0.001$ y * $p \leq 0.05$).

5.5. Diminución de la actividad de las histonas desacetilasas en fibroblastos idiopáticos

La mayoría de los estudios que relacionan la modulación de la acetilación y las enfermedades neurodegenerativas muestran una hipo-acetilación debida a una pérdida de la actividad de las HATs [170], una interacción proteína-histonas impidiendo la acetilación de los residuos lisina [87], una degradación de las HATs por el sistema ubiquitin-proteasoma (SUP) [171] o por la activación de caspasas [170]. Mientras que otros destacan la desregulación de la actividad de las HDACs, estudios recientes han mostrado en presencia de MPP⁺ en células neuronales SH-SY5Y [180] e *in vivo* con ratas tratados con paraquat [181, 182], que la actividad de las HDACs aumentan.

En este estudio, dado que el grupo GS tiene las H3 y H4 hiperacetiladas (**Figura 5.6 y 5.7**) respecto al grupo Co α , decidimos examinar la actividad de las HDACs en ambas líneas. Como se muestra en la **figura 5.9**, el grupo Co α presenta una actividad HDAC (0.28 ± 0.02 D.O/ μ g de proteínas) significativamente reducida a pesar de no mostrar una modificación epigenética importante en sus histonas. La actividad de las mutantes G2019S de LRRK2 en fibroblastos (0.33 ± 0.02 D.O/ μ g de proteínas) y neuronas SH-SY5Y (0.93 ± 0.07 D.O/ μ g de proteínas) no difieren significativamente de los controles (0.36 ± 0.04 y 0.92 ± 0.09 D.O/ μ g de proteínas) respectivos.

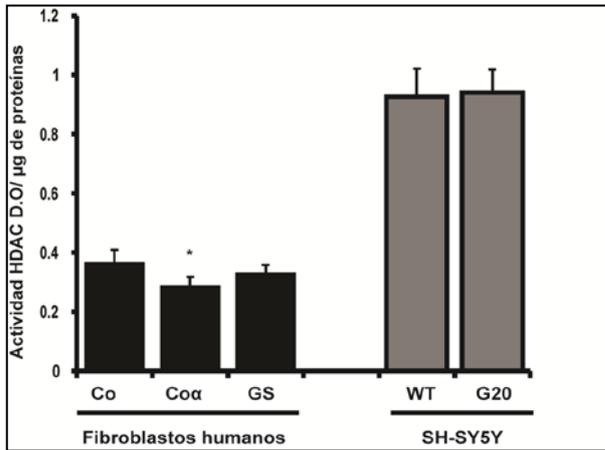


Figura 5.9: Actividad global de HDACs en fibroblastos y neuronas. Las células son sembradas y lisadas aproximadamente en un 80 % de confluencia sin tratar. La actividad de las HDACs se ha evaluado con 130 µg de proteínas a partir de un extracto total de lisados celulares. La actividad se determina con la lectura de la absorbancia, del cromóforo formado al contacto de una lisina desacetilada con la lisina *developer*, por espectrofotometría a una λ de 405 nm. Los datos están presentados en D.O/µg de proteínas y son la media \pm error estándar de 3 experimentos independientes (* $p \leq 0.05$).

5.6. Niveles de expresión de las HDACs de Clases I y II

Aunque su actividad HDAC disminuye, el grupo Co α no presenta una alteración en la transcripción de los diferentes genes *HDACs*, estudiados ni en la clase I, ni en la clase II (**Figura 5.10**). No obstante, el grupo GS muestra menos nivel de transcripción de *HDAC1* de la clase I (**Figura 5.10A**), *HDAC4* de la clase IIa (**Figura 5.10D**) en fibroblastos y más transcripción de *HDAC2* en neuronas (**Figura 5.10B**). Son las HDACs de clases I y IIa que se modulan de manera más significativa en las líneas con la mutación G2019S de LRRK2.

Resultados

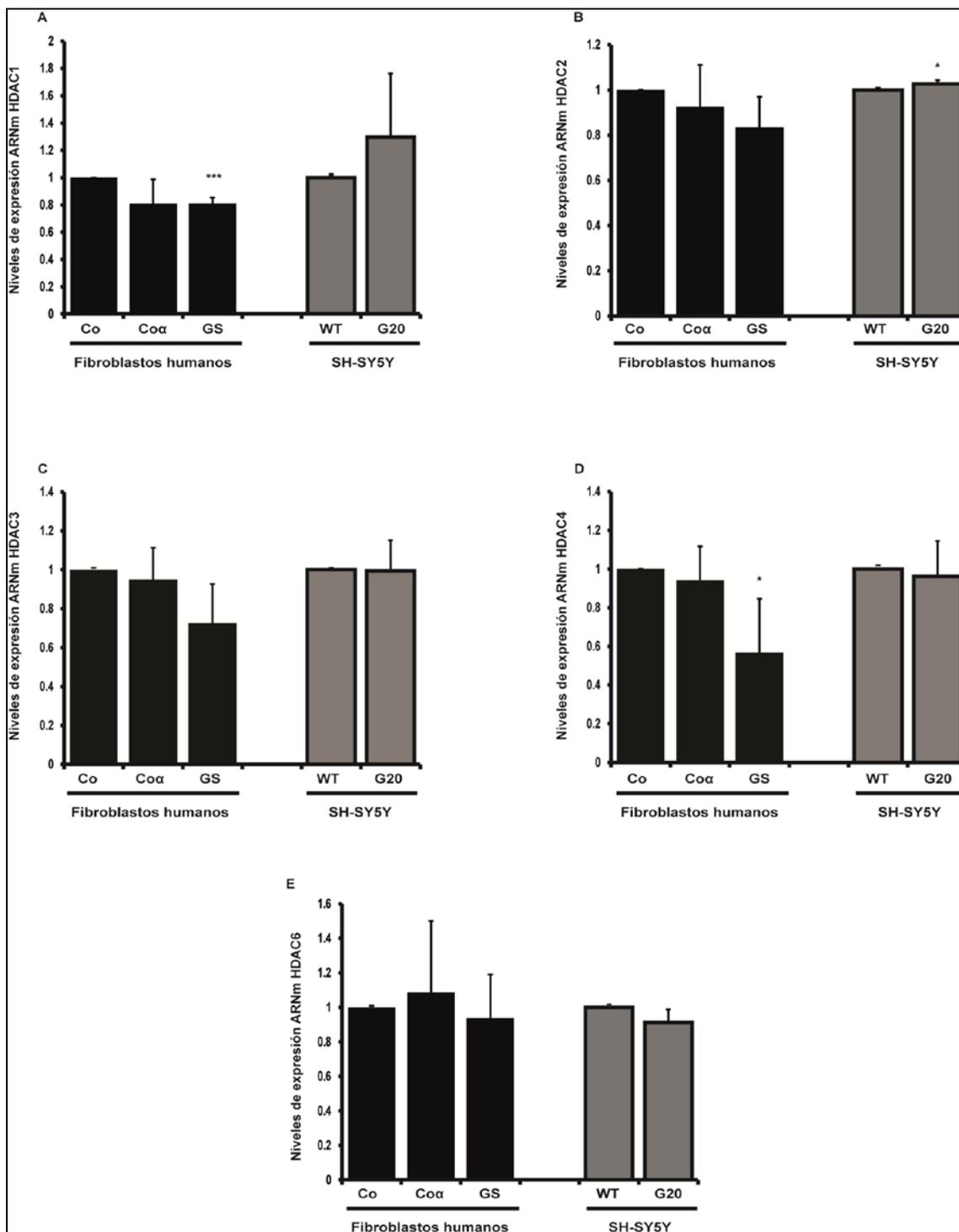


Figura 5.10: Expresión del ARNm de las HDACs de clase I y II en células neuronales y fibroblastos. Los niveles de expresión génica de los diferentes genes de clase I: *HDAC1* (A), *HDAC2* (B), *HDAC3* (C), de clase IIa: *HDAC4* (D) y de clase IIb *HDAC6* (E) se han comprobado basalmente por PCR cuantitativa a tiempo real. El nivel de expresión del ARNm de cada gen se ha normalizado utilizando el *GAPDH* como gen de referencia. Los resultados representan la media \pm error estándar de 3 experimentos independientes (* $p \leq 0.05$ y *** $p \leq 0.001$).

5.7. Modificación de los niveles de expresión de las HDACs de Clase III

En este estudio hemos notado un mayor cambio en los niveles de transcripción de los genes *HDACs* de clase III que en los de clases I y II. Sobre 5 genes estudiados (**Figura 5.11**), 4 se ven reducidos de manera significativa en el grupo Co α excepto *SIRT2* (**Figura 5.11B**). Además, *SIRT5* disminuye significativamente en ambos Tipos celulares, tanto en los fibroblastos, como en las neuronas (**Figura 5.11D**). En cuanto a *SIRT6* (**Figura 5.11E**), solo se ve reducido en fibroblastos y de manera idéntica en los grupos Co α e GS. Es muy interesante destacar el aumento del nivel de transcrito de *SIRT1* en las células neuronales G20 y fibroblastos, aunque en este caso, a pesar de presentar un valor mayor, éste no resulta estadísticamente significativo (**Figura 5.11A**).

5.8. Incremento de la actividad de SIRT1 en los individuos G2019S:

Después de las importantes variabilidades observadas en los niveles de transcripción de los genes *SIRT*s, analizamos por western-blotting los niveles de proteínas correspondientes. La proteína *SIRT1* está fosforilada en el grupo GS (**Figura 5.12A, B**) lo que favorece su translocación nuclear en este modelo. Esta diferencia es significativa respecto al grupo Co α . Las isoformas de la proteína *SIRT2* se incrementan en los dos grupos Co α y GS; aunque este aumento no resulte significativo, es mayor en el grupo GS (1.40 ± 0.49) hasta 50 % más de la isoforma 2 de *SIRT2* que en el grupo control (0.53 ± 0.03), (**Figura 5.12C, D, E**). No obstante, la proteína *SIRT3* (**Figura 5.12F, G**) y *SIRT5* (**Figura 5.12H, I**) aumenta significativamente en el Co α respecto al Co. Además estas diferencias son relevantes entre los dos grupos Co α y GS. En cuanto a la proteína *SIRT6* (**Figura 5.12J, K**) no se observa una modulación importante en ninguno de los tres grupos.

Resultados

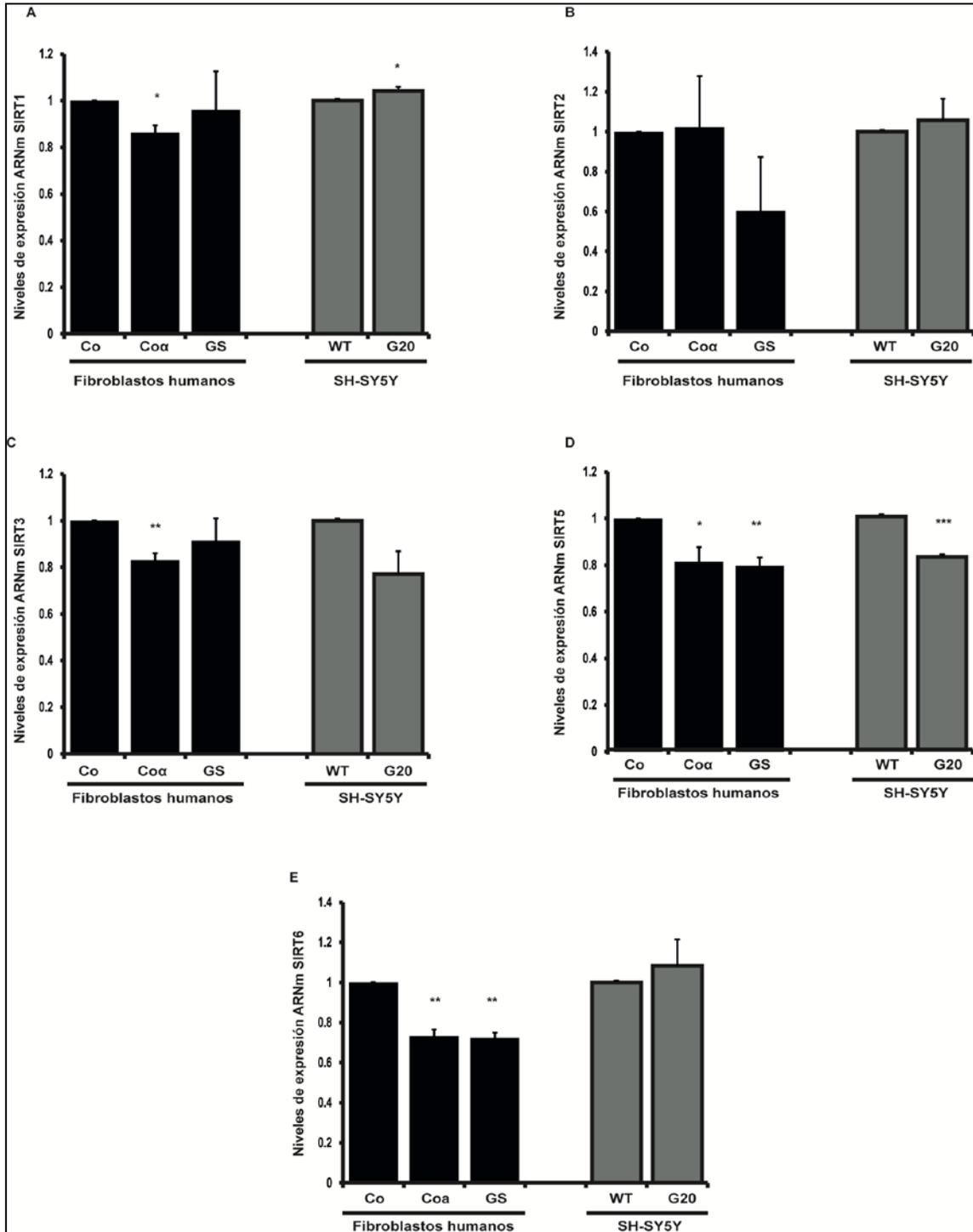


Figura 5.11: Niveles de expresión génica de las sirtuinas o HDACs de clase III. Los niveles de ARNm de los diferentes genes *SIRT*s: *SIRT1* (A), *SIRT2* (B), *SIRT3* (C) *SIRT5* (D) y *SIRT6* (E) se han analizado por PCR cuantitativa. El nivel de expresión del ARNm de cada gen se ha evaluado utilizando el *GAPDH* como control endógeno. Los resultados representan la media \pm error estándar de 3 experimentos independientes (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ y *** $p \leq 0.001$).

Resultados

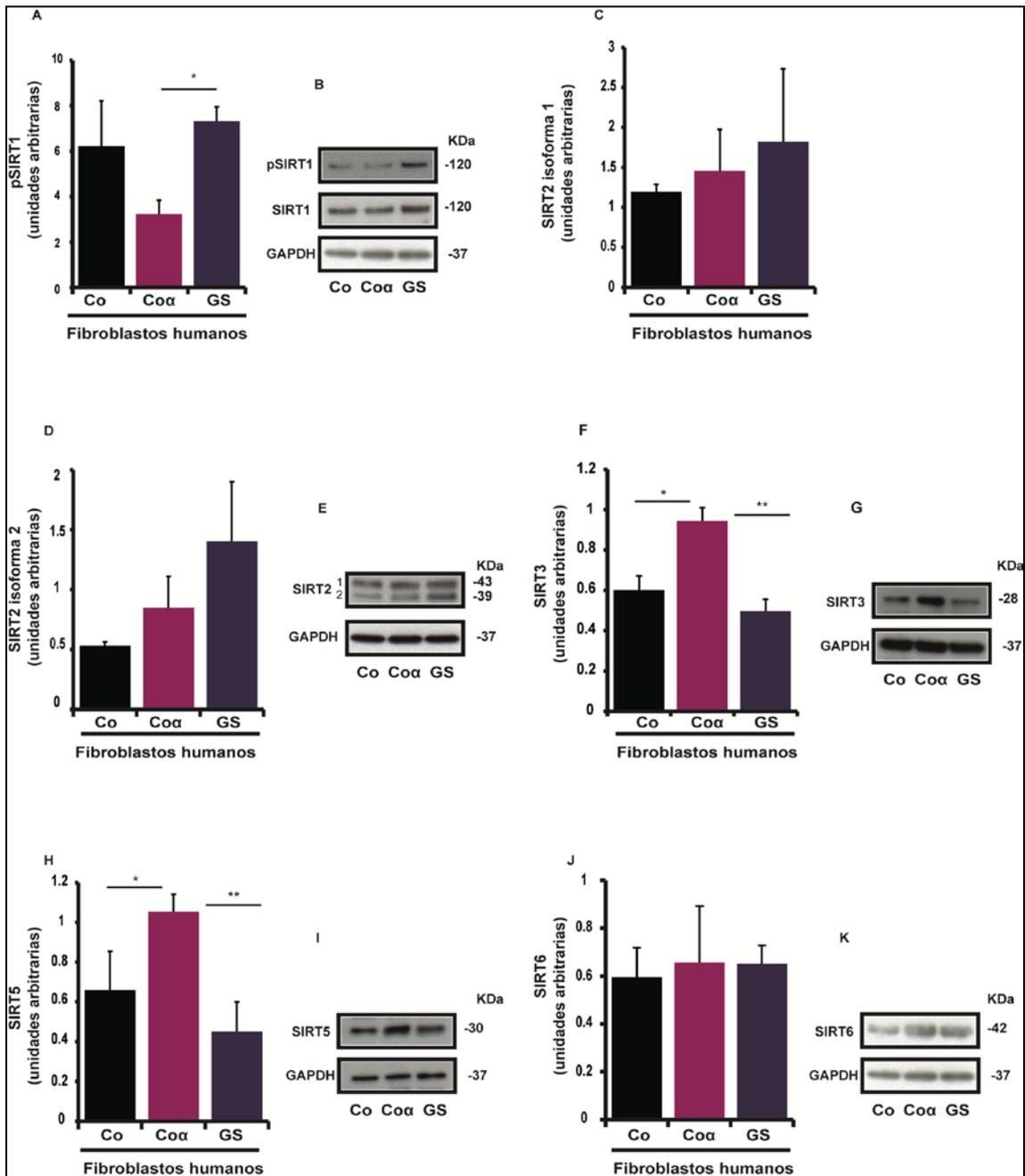


Figura 5.12: Expresiones de las proteínas sirtuinas en fibroblastos procedentes de enfermos de Parkinson y controles. Las células son sembradas y lisadas aproximadamente en un 80 % de confluencia sin tratar. Los niveles de proteínas fosforiladas y total son determinados por western-blotting. (B, E, G, I, K) Muestran los blots representativos de pSIRT1 (Ser47) y SIRT1, SIRT2, SIRT3, SIRT5 y SIRT6, respectivamente, utilizando el GAPDH como control de carga. (A, C, D, F, H, J) Representan la densitometría de cada banda de las proteínas en unidades arbitrarias. La masa molecular está expresada en kilodaltons (kDa). Los datos representan la media \pm error estándar de 3 experimentos independientes (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$).

5.9. Efecto de los inhibidores de las HDACs de Clase I, II y III en los fibroblastos:

En conjunto, estos resultados no explican el menor nivel de acetilación de histonas en el grupo Co α . En este grupo, la actividad total de las HATs no está alterada pero la actividad global de las HDACs si lo está. A continuación, tratamos las células con inhibidores de HDACs de clases I y II o de clase III, que son respectivamente tricostatina A (TSA) y nicotinamida (NAM) [134, 183]. En primer lugar realizamos un experimento dosis respuesta durante 24 h con cada inhibidor con el fin de evaluar su citotoxicidad. Los resultados se muestran en la **figura 5.13** empleando para ello la reducción del MTT a formazán.

La TSA es un inhibidor inespecífico de las HDACs de clases I y II; puede presentar tanto un efecto citoprotector como citotóxico en función de la concentración o tiempo de exposición [183]. En nuestro caso, empleamos concentraciones crecientes de 0 a 100 μ M durante 24 h. Todas las líneas muestran un claro efecto citotóxico a partir de 40 μ M (GS) y 80 μ M (Co y Co α) (**Figura 5.13A**). Elegimos la concentración de 1 μ M de uso para todas las líneas celulares, con una reducción de la viabilidad celular oscilando entre 0.3 y 7.2 %.

La NAM es un inhibidor de las sirtuinas o HDACs de clase III [183, 184]. Para tratar las células, hemos usado unas dosis de 0 a 100 mM durante 24 h. NAM muestra un claro efecto citotóxico a partir de 5 mM, la viabilidad de todas las líneas se ha reducido al menos de 10 % (**Figura 5.13B**). A pesar de su toxicidad, las líneas Co α eran más resistentes. En función de los resultados obtenidos optamos por emplear 1 mM como concentración de trabajo.

Resultados

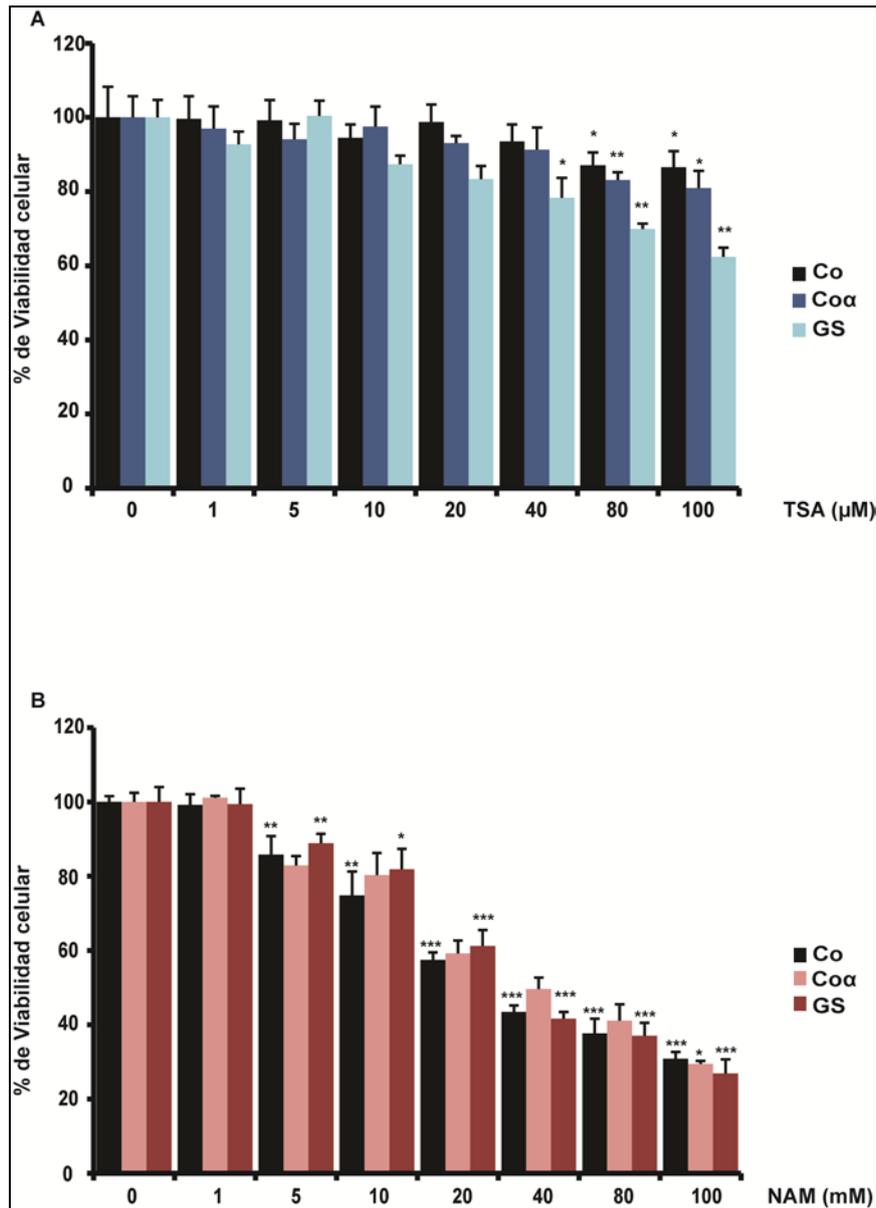


Figura 5.13: Efecto dosis-respuesta de TSA y de NAM en fibroblastos. Las células son sembradas y expuestas con TSA (0-100 μ M) y NAM (0-100 mM) durante 24 h. Los efectos de TSA (A) y NAM (B) están analizados con el método colorimétrico del MTT. Los resultados representan el porcentaje de viabilidad celular relativa de cada línea respecto a su control. Los datos muestran la media \pm error estándar de 3 experimentos independientes (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ y *** $p \leq 0.001$).

En base a los resultados anteriores decidimos verificar el posible efecto sinérgico de ambos inhibidores empleando para ello el marcaje con IP mediante citómetro de flujo. Al tratar las tres líneas con 1 μ M de TSA, 1 mM de NAM o una combinación de ambos durante 2 h comprobamos, al igual que mediante la técnica de MTT, una mayor citotoxicidad para NAM, citotoxicidad que no se ve incrementada con el uso combinado con TSA (**Figura 5.14**). La clase III de HDACs o sirtuinas parecen ser imprescindibles para la supervivencia celular.

Resultados

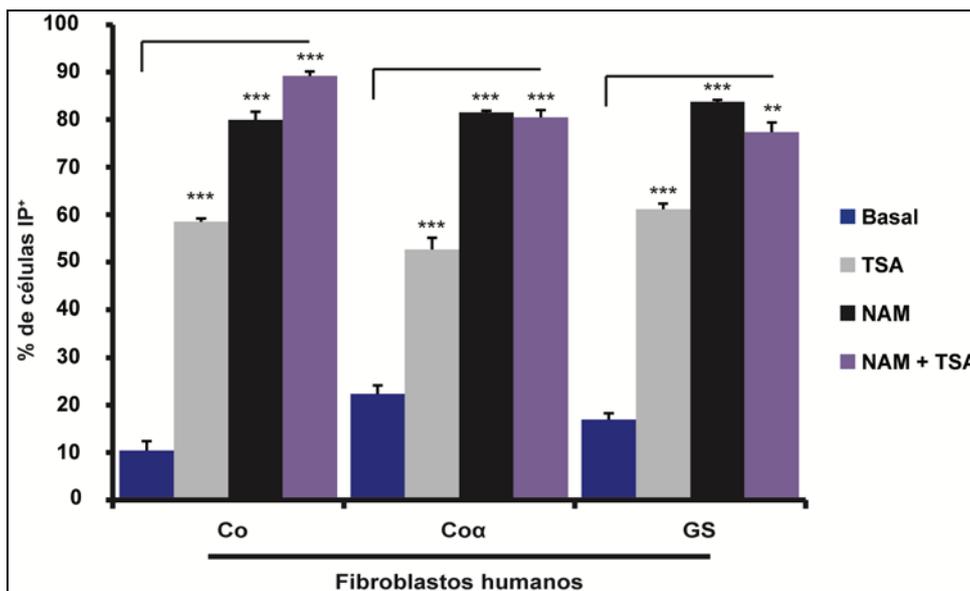


Figura 5.14: Efecto citotóxico de los inhibidores HDACs en fibroblastos. Las células son sembradas y expuestas a 1 μ M de TSA, 1 mM de NAM o combinados (TSA + NAM) durante 2 h. Los datos representados son el porcentaje de células IP⁺ de cada línea en 5000 eventos. Los resultados son la media \pm error estándar de tres experimentos independientes (** $p \leq 0.01$ y *** $p \leq 0.001$).

Sin embargo, los efectos de ambos inhibidores sobre el nivel de acetilación de las proteínas son diferentes. Tratando las células con TSA durante 4 h, los niveles de acetilación de la tubulina K40 (datos no mostrados) y de la H3K14 se incrementan pero NAM tiene un efecto menor (**Figura 5.15**) y con el doble tratamiento, los niveles de acetilación de las proteínas son igual que con la TSA solo (datos no mostrados). Estos resultados apuntan que las HDACs de clase III no tienen la misma actividad que las HDACs de clase I y II en fibroblastos pero suficiente para provocar una citotoxicidad.

Las actividades de las sirtuinas son NAD⁺-dependiente; el ratio NAD⁺/NADH es inherente al ciclo de Krebs. Durante este ciclo, y sobre todo mientras la glicolisis y la β -oxidación de los ácidos grasos, el complejo I de la mitocondria oxida el NADH en NAD⁺. Decidimos analizar el nivel de acetil-CoA y las enzimas implicadas en su producción y su destino que ya hemos mencionado en la sección (4) de la introducción.

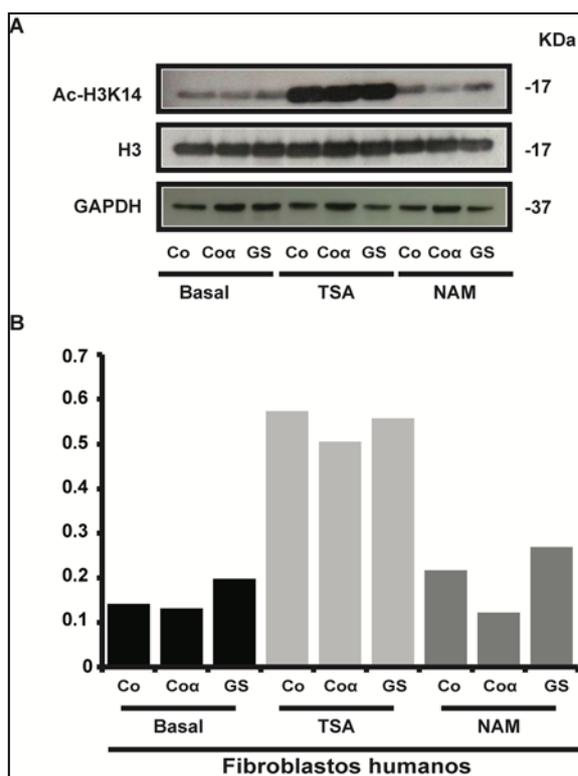


Figura 5.15: TSA incrementa los niveles de acetilación de la histona 3. Las células son sembradas y expuestas a 1 μ M de TSA, 1 mM de NAM durante 4 h. El extracto celular total se analizó por Western-blotting. **(A)** Muestra el blot representativo de acetil-H3K14 y H3, utilizando GAPDH como control de carga. **(B)** Representa la densitometría del ratio acetil-H3K14/H3. La masa molecular está expresada en kilodaltons (kDa).

5.10. Metabolismo

En primer lugar, hemos medido el nivel de acetil-CoA con un kit fluorimétrico. Los niveles observados en las diferentes líneas no son significativos (**Figura 5.16**). ACLY es la enzima principal de la producción de acetil-CoA en el citosol y en el núcleo. De hecho la acetilación es dependiente del acetil-CoA nucleo-citosólico [185]. El nivel de ARNm de ACLY aumenta en los grupos Co α y GS significativamente y no en neuronas G20 (**Figura 5.17 A**).

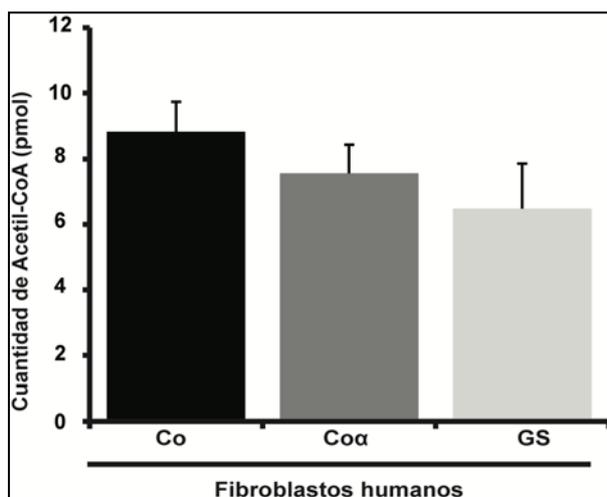


Figura 5.16: Concentración de acetil-CoA en fibroblastos. Las células son sembradas y lisadas aproximadamente en un 80 % de confluencia. El nivel de acetil-CoA se ha evaluado con 1 mg de proteínas a partir de un extracto total de lisados celulares. La cantidad de acetil-CoA en pmol se determina mediante la intensidad de fluorescencia del complejo NADH-PicoProbe a una excitación/emisión de 535/589 nm. Los datos representan la media \pm error estándar de 3 experimentos independientes ($p > 0.05$).

Resultados

Mediante western-blotting, observamos un incremento de la proteína fosforilada (p-ACLY) en el grupo GS que está acompañada de una fosforilación de mTOR (**Figura 5.17B, C y D**). Esta modificación post-traduccional de ACLY es dependiente de la vía PI3K/AKT [144], el cual es un inhibidor de la autofagia y fosforila mTOR (pmTOR). En las líneas GS, tenemos una autofagia mTOR-independiente [47] y PI3K clase III-dependiente [59]. La inhibición de esta ruta con la 3-MA reduce la autofagia en el grupo GS [59] y además disminuye el nivel de p-ACL y de p-mTOR (**Figura 5.17**) de manera estadísticamente no significativa. Por otro parte, el nivel de expresión de AceCS1 aumenta de manera relevante (**5.18B, D**), lo que sugiere una producción de acetyl-CoA citosólico en el grupo GS.

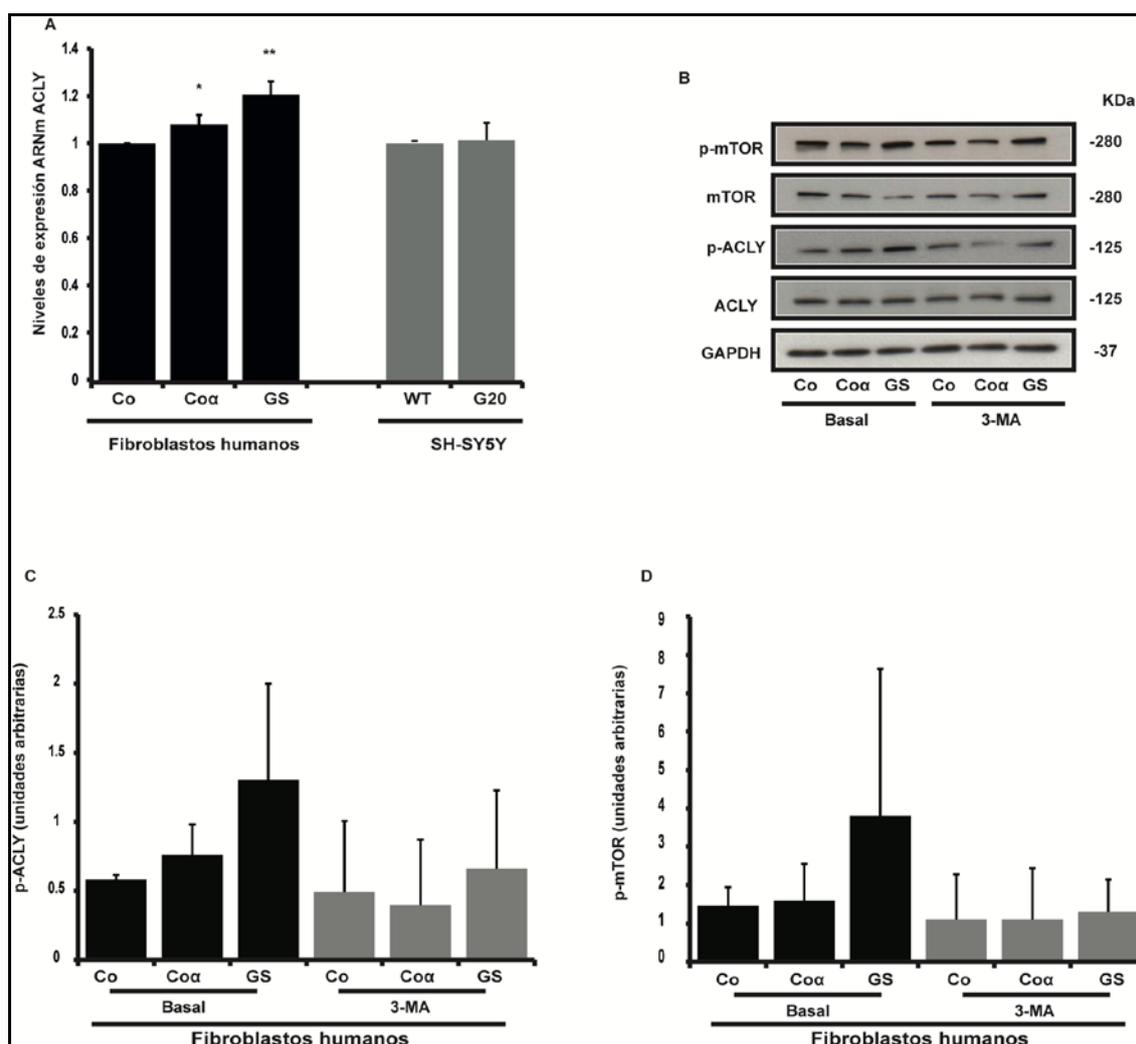


Figura 5.17: Nivel de expresión de ACLY en fibroblastos y en neuronas. (A) El nivel de expresión del ARNm de ACLY se ha analizado por PCR cuantitativa, utilizando el *GAPDH* como gen de referencia. Los resultados representan la media \pm error estándar de 3 experimentos independientes (* $p \leq 0.05$ y ** $p \leq 0.01$ y *** $p \leq 0.001$). (B, C y D) Las células son sembradas y expuestas a 10 mM de 3-MA durante 4 h. Los niveles de proteínas fosforiladas y totales son determinados por western-blotting. (B) Muestra el blot representativo de p-mTOR, mTOR, p-ACLY y ACLY utilizando el GAPDH como control de carga. La masa molecular está expresada en kilodaltons (kDa). (C, D) Representan la densitometría de p-ACL y p-mTOR, respectivamente, en unidades arbitrarias. Los datos representan la media \pm error estándar de 2 experimentos independientes ($p > 0.05$).

Resultados

AGS es la enzima primordial que realiza la síntesis de los ácidos grasos a partir del acetil-CoA y del malonil-CoA. El nivel de ARNm de AGS aumenta significativamente en el grupo GS (**Figura 5.18A**) pero no se refleja en su nivel de proteína (**Figura 5.18B, C**). Expusimos las células durante 4 h a 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de triclosán (2,4,4-tricloro-2-hydroxydiphenyl-ether) que es un inhibidor de AGS [186], a 200 μM de ácido linoleico que es un ácido graso poli-insaturado para favorecer la lipogénesis. Como se puede observar en **la figura 5.18E**, el número de vacuolas de lípidos es bajo en modelos de EP aunque aumenta con el ácido linoleico, lo que no se observa con el triclosán. Estos resultados demuestran que hay menos síntesis de ácidos grasos en modelos de EP.

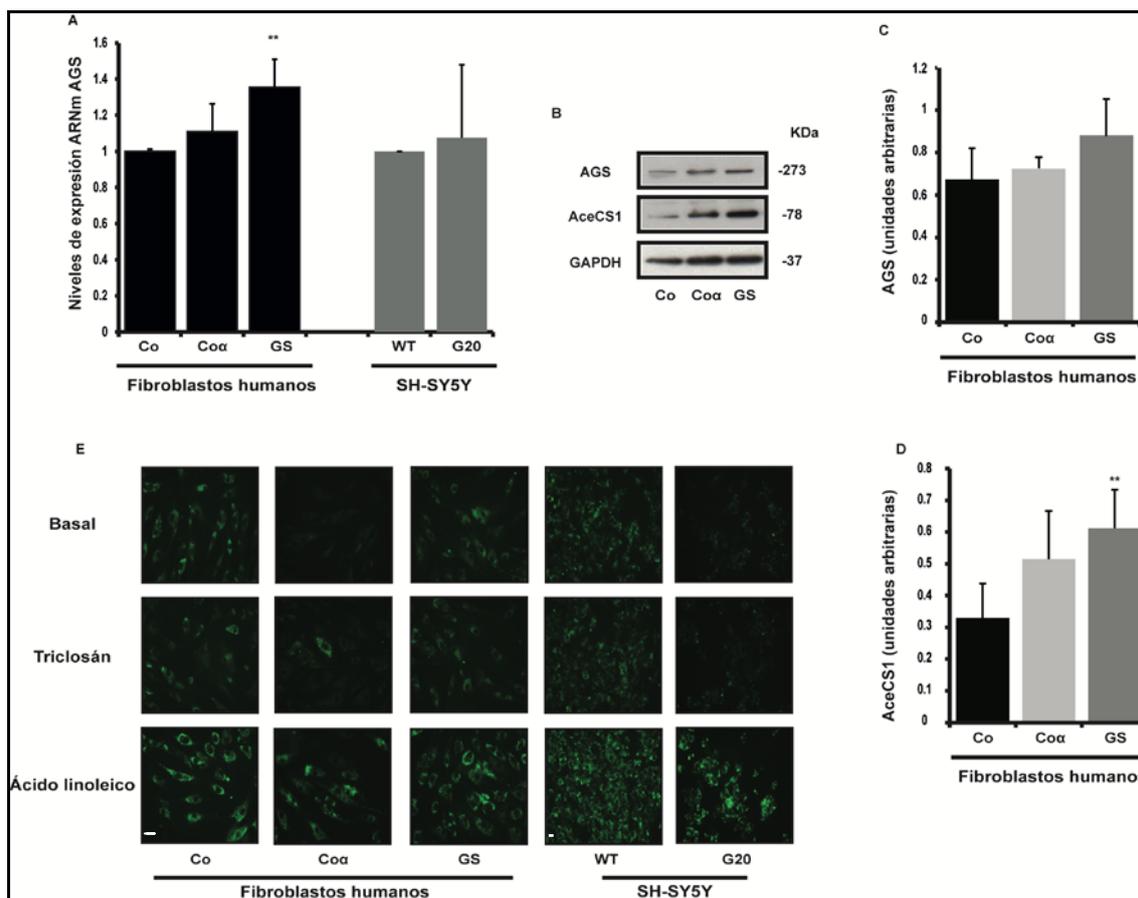


Figura 5.18: Nivel de expresión de las enzimas lipogénicas en fibroblastos y en neuronas. (A) El nivel de expresión del ARNm de AGS se ha analizado por PCR cuantitativa, utilizando el *GAPDH* como gen de referencia. Los resultados representan la media \pm error estándar de 3 experimentos independientes (** $p \leq 0.01$). (B, C y D) Las células son sembradas y lisadas aproximadamente en un 80 % de confluencia sin tratamiento. Los extractos celulares totales se analizan por western-blotting con los anticuerpos AGS y AceCS1 utilizando el GAPDH como control de carga. (C, D) Representan la densitometría de AGS y AceCS1, respectivamente, en unidades arbitrarias. Los datos representan la media \pm error estándar de 3 experimentos independientes (** $p \leq 0.01$). (E) Microfotografías representativas de las vacuolas de lípidos. Las células son sembradas y expuestas a 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de triclosán, 200 μM de ácido linoleico durante 4 h, y marcadas con "Nile red" para detectar por inmunofluorescencia las vacuolas de lípidos. La barra de escala corresponde a 10 μm de longitud.

Resultados

A continuación, estudiamos el nivel de expresión de ACC, enzima localizada por encima de AGS y participa en la regulación de la síntesis de los ácidos grasos. Su nivel de expresión no varía en las diferentes líneas estudiadas (**Figura 5.19A**), pero la proteína está significativamente fosforilada (p-ACC) en el grupo GS (**Figura 5.19B, C**). ACC es el sustrato de AMPK α y está negativamente regulada por este último. Igual que p-ACC, p-AMPK α se incrementa en los grupos Co α y GS aunque de manera no significativa (**Figura 5.19B, D**). El silenciamiento de AMPK α disminuye el nivel de p-ACC en el residuo ser79 (datos no mostrados). Además, siAMPK α afecta el nivel de acetilación de la tubulina K40 (ac-tubulina K40) lo cual incrementa en los modelos de la EP (**Figura 5.20A**). El nivel de ac-tubulina K40 está acompañado de una reducción de su desacetilasa HDAC6 en los grupos Co α y GS (**Figura 5.20B, C**).

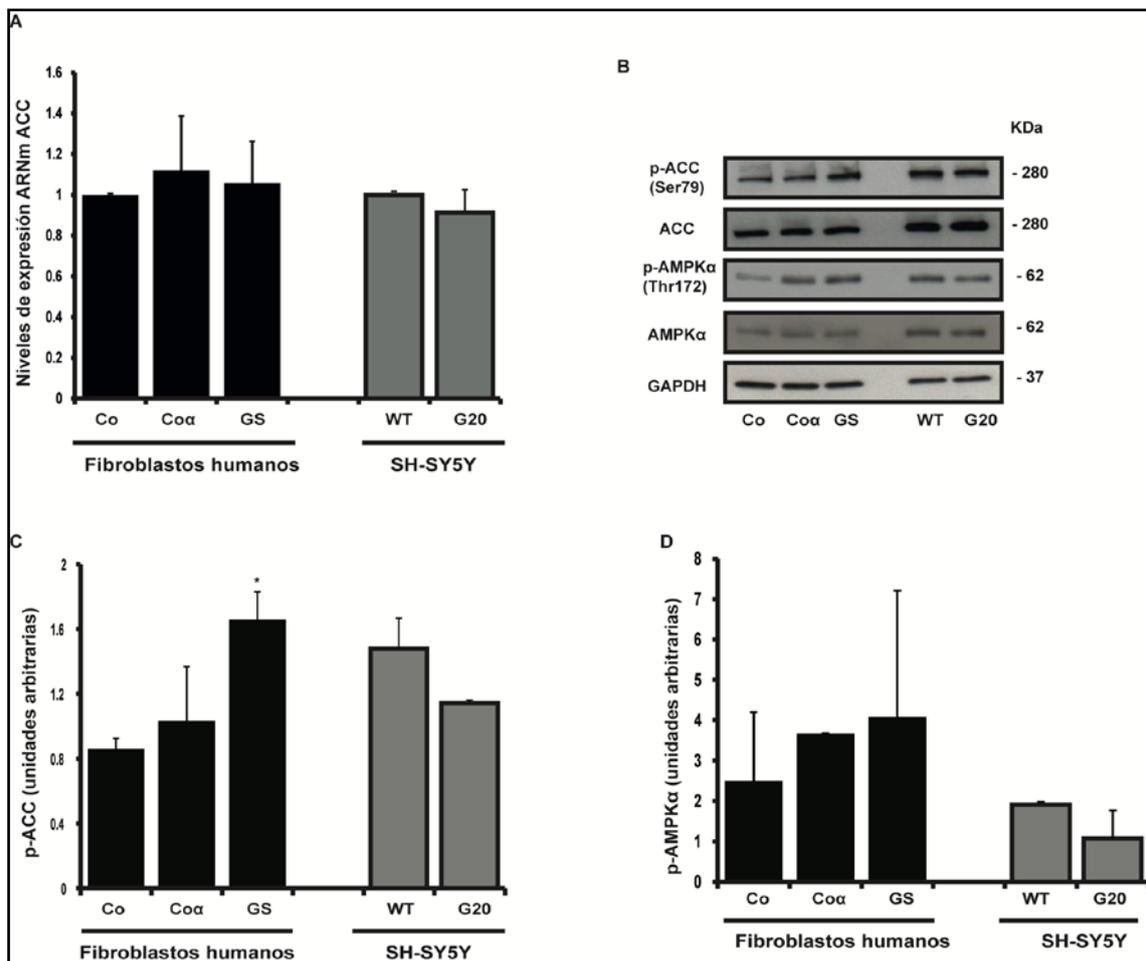


Figura 5.19: Nivel de expresión de ACC y AMPK α en fibroblastos y neuronas. (A) El nivel de expresión del ARNm de ACC se ha analizado por PCR cuantitativa, utilizando el GAPDH como gen de referencia. Los resultados representan la media \pm error estándar de 3 experimentos independientes ($p > 0.05$). (B, C y D) Las células son sembradas y lisadas aproximadamente en un 80 % de confluencia sin tratamiento. Los niveles de proteínas fosforiladas y totales son determinados por western-blotting. (B) Muestra el blot representativo de p-ACC, ACC, p-AMPK α y AMPK α , utilizando el GAPDH como control de carga. La masa molecular esta expresada en kilodaltons (kDa). (C, D) Representan la densitometría de pACC y pAMPK α , respectivamente, en unidades arbitrarias. Los datos representan la media \pm error estándar de 2 experimentos independientes (* $p \leq 0.05$).

Resultados

Si el silenciamiento de AMPK α disminuye la acetilación de las proteínas, su inhibición farmacológica con 10 μ M de dorsomorfina durante 1 h y 2 h regula el $\Delta\Psi_m$ en fibroblastos (**Figura 5.20D**). Basalmente, los grupos Co α y GS tienen un porcentaje de células DiOC $_6$ (3) bajo y etidio $^+$ significativamente elevado (**Figura 5.20D, E**). Con la dorsomorfina, el porcentaje de células DiOC $_6$ (3) bajo se ve significativamente disminuido en el grupo GS mientras que aumenta de manera relevante en los grupos Co y Co α durante 2 h de tratamiento. El inhibidor de AMPK incrementa el porcentaje de células etidio $^+$ en todos los grupos y especialmente en Co y Co α (**Figura 5.20E**).

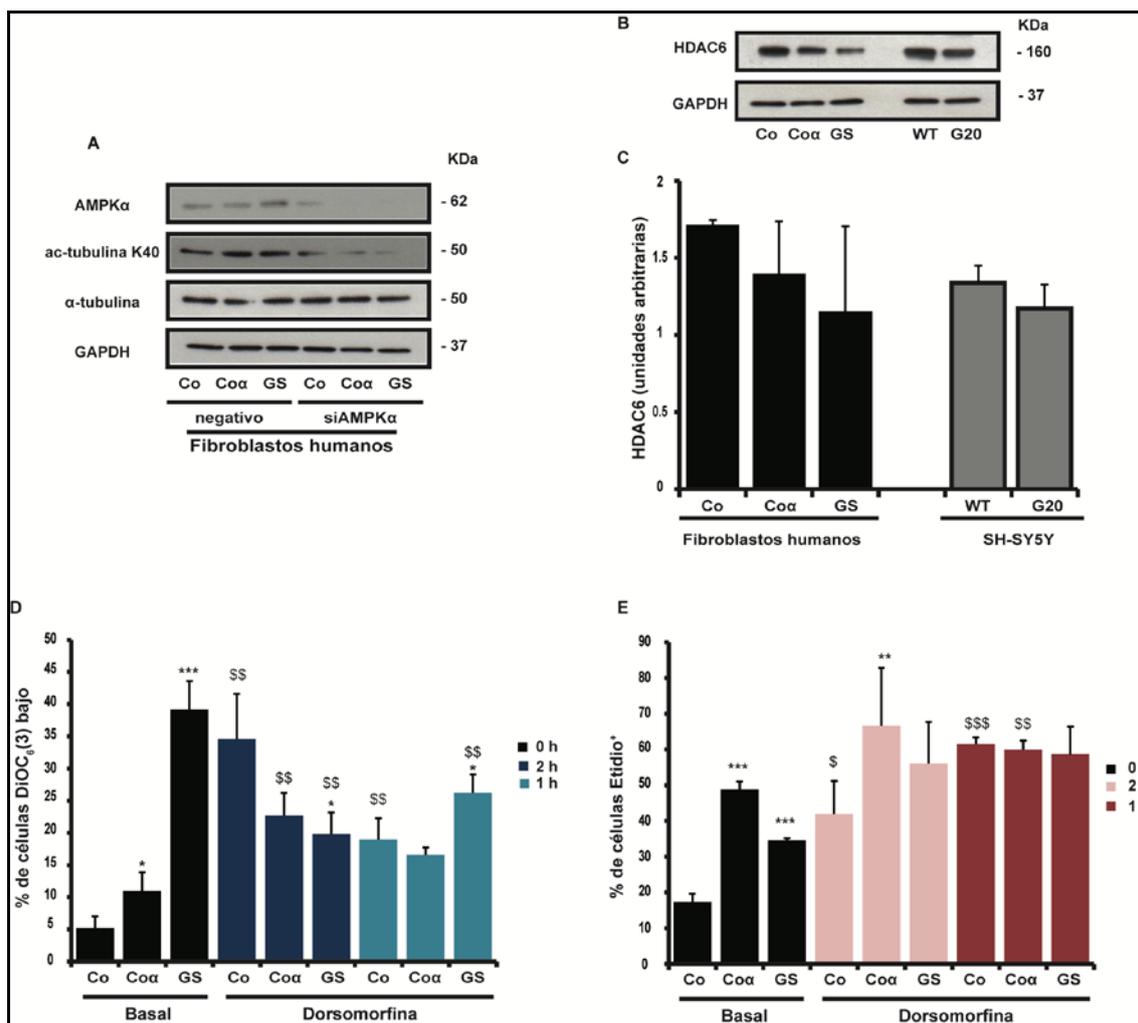


Figura 5.20: Efecto de la inhibición de AMPK α en fibroblastos. (A) Las células son transfectadas con siARN para AMPK α o para el control negativo (scrambled) durante tres días. Los niveles de proteínas son determinados por western-blotting y se muestra el blot representativo de AMPK α , ac-tubulina K40 y α -tubulina, usando GAPDH como control de carga. (B y C) Las células son sembradas y lisadas aproximadamente en un 80 % de confluencia sin tratamiento. Los niveles proteicos de HDAC6 son determinados por Western-blotting. (B) Muestra el blot representativo de HDAC6, utilizando el GAPDH como control de carga. La masa molecular esta expresada en kilodaltons (kDa). (C) Muestra la densitometría de cada banda en unidades arbitrarias. Los datos son la media \pm error estándar de 3 experimentos independientes ($p > 0.05$). (D y E) Las células son sembradas y expuestas a 10 μ M de dorsomorfina durante 2 h y 1 h. Las células son marcadas con DiOC $_6$ (3) e hidroetidio y analizadas por citómetro de flujo. (D) Muestra el % de células DiOC $_6$ (3) bajo. (E) Representa el % de células etidio $^+$. Los datos representan la media \pm error estándar de 3 experimentos independientes (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ respecto al tratamiento y \$ $p \leq 0.05$, \$\$ $p \leq 0.01$, \$\$\$ $p \leq 0.001$ respecto cada línea).

Resultados

6. DISCUSIÓN

La modificación epigenética es un cambio, en la función de un gen, debido a varias señalizaciones moleculares que no alteran la secuencia del ADN pero modifican el fenotipo. Esas modificaciones son dependientes del medioambiente y están relacionadas con muchas enfermedades metabólicas y neurodegenerativas como la EP [91]. Factores medioambientales y genéticos tienen un papel crucial en la patología de la EP y provocan modificaciones epigenéticas que determinan sus fenotipos. El número de casos de origen genético en la EP son escasos, pero la interacción con los factores medioambientales acelera la patogénesis. Las modificaciones epigenéticas ocurren en las histonas y son modificaciones post-traduccionales que incluyen la metilación, la acetilación, la ubiquitinización, la fosforilación, la sumoilación etc. Estos últimos modulan la expresión génica.

En estudios de cerebros postmortem de individuos con Parkinson, se ha mostrado que el gen de *SNCA* que es el componente principal de los CL, sufre una regulación epigenética [85]. En modelos de EP, *in vivo* e *in vitro*, *SNCA* inhibe la acetilación de las histonas promoviendo una neurotoxicidad. La proteína interactúa con las histonas para impedir su acetilación [86, 87], sin embargo en modelos de estrés oxidativo con PQ^{2+} o MPP^+ , el nivel de acetilación de las histonas se ve incrementado [90, 187]. Esos niveles de acetilación de las histonas están relacionados con una inhibición de las HATs [171] o de las HDACs [187].

En nuestro trabajo, hemos estudiado el nivel de acetilación en fibroblastos procedentes de individuos con EP: una línea de origen idiopático (*Coα*) y una línea de origen genético con la mutación G2019S de *LRRK2* (GS). El nivel de acetilación total en estos modelos es muy diferente. El grupo GS tiene más proteínas totales acetiladas respecto al grupo *Coα* además no hay una modificación significativa en las actividades de HATs. Pensamos que si no hemos notado una alteración es porque no hemos estudiado la actividad de una HAT en concreto o que no hemos separado el compartimento nuclear del citosólico y que la actividad de algunas puede enmascarar la de otras, lo que se demostró previamente en células neuronales primarias [170]. Varios estudios han mostrado que los niveles de ARNm de CBP y p300 no cambian en modelos de enfermedades neurodegenerativas pero sufren una degradación que provoca una hipoacetilación [170, 171]. En nuestro estudio, no hemos observado un cambio en la expresión génica de p300 en ninguna de las líneas. Los niveles de expresión de PCAF en el grupo GS, de Tip60 en el grupo *Coα* y de hMOF en ambos casos están significativamente reducidos pero no afectan los niveles de proteínas endógenas de PCAF y Tip60, lo que descarta una desregulación de las proteínas HATs en la hipoacetilación o la hiperacetilación observadas en ambos grupos. De manera interesante la expresión de hMOF disminuye significativamente con la mutación G2019S de *LRRK2* endógeno (en fibroblastos) y exógeno (en neuronas) y no se sabe hasta qué nivel hMOF participa en la patología de la EP. La interacción de hMOF con Nrf-2 permite que la proteína acetilada en su lisina 588 (Nrf-2K588) se active y se transloque al núcleo induciendo una respuesta anti-oxidativa [188]. Así una baja expresión de hMOF puede desregular los niveles de generación de ERO en nuestro modelo.

Posteriormente, hemos mostrado que las histonas 3 y 4 están hiperacetiladas en el grupo GS a pesar de no detectar una modificación significativa en las actividades y los niveles de expresión de las proteínas HATs. El ácido anacárdico, el cual es un inhibidor potente de las HATs PCAF, p300 [179] y Tip60 [90] acentúa de manera significativa la diferencia observada en los niveles de ac-H3K14. PCAF [123] y p300 [118] acetilan la H3K14, la cual se reduce en el grupo Co α en presencia de ácido anacárdico durante 1 h. Este hecho sugiere que las HATs acetiltransferasa no están alteradas en el grupo Co α y que su inhibición disminuye significativamente el porcentaje de células IP⁺. Así, el ácido anacárdico tiene un efecto citoprotector en el grupo Co α . En células neuronales dopaminérgicas, el ácido anacárdico protege las células de la muerte celular inducida por el dieldrin a través de la hiperacetilación de H3 y H4 [90]. Sin embargo, la dosis de 10 μ M de ácido anacárdico no ha mostrado efecto en el grupo GS. Estos resultados nos permiten plantear otras hipótesis:

- (1) El tiempo de tratamiento o la dosis del ácido anacárdico no son adecuados en ese modelo,
- (2) Otras HATs no afectadas por el ácido anacárdico acetilan la H3K14 en el grupo GS,
- (3) Observamos una menor actividad de las HDACs. Estudios de 24 h y 48 h con 20 μ M de ácido anacárdico no dieron resultados positivos (datos no mostrados).

Las modificaciones epigenéticas son dependientes de la exposición medioambiental y también del patrón genético de cada uno. El estado fundamental de la cromatina difiere entre Co α y GS, la hiperacetilación de las H3K14 y H4K5/K8/K12 en el grupo GS demuestra que hay una expresión activa de los genes [137]. Estudios en modelos de estrés oxidativo de EP tanto in vivo como in vitro arrojan que los niveles de acetilación disminuyen con las neurotoxinas (MPP⁺/MPTP y PQ²⁺), una disminución que puede estar relacionada a una actividad HDAC elevada [180, 182]. En el grupo Co α , observamos una actividad HDAC significativamente disminuida que no correlaciona con el nivel de acetilación de las histonas. El grupo Co α parece tener un desequilibrio de actividad total entre HATs y HDACs, de esta manera el ácido anacárdico regularía este desequilibrio y por consiguiente la supervivencia celular.

El análisis de los niveles de expresión de los diferentes HDACs muestra una modulación significativa de las HDACs de clase I (HDAC1, HDAC3) y IIa (HDAC4) en el grupo GS. HDAC4 y HDAC3 forman un complejo funcional en el núcleo [132]. La actividad desacetilasa de HDAC4 está negativamente regulada por la CaMKK. Una vez fosforilada, HDAC4 es inactiva y se transloca al citoplasma donde es retenida por la proteína 14.3.3 [128]. CaMKK está activada en células HEK293T sobreexpresando la mutación G2019S de LRRK2 [189], además el nivel de expresión de HDAC4 está significativamente reducido en el grupo GS. La proteína LRRK2 activada tiene dos residuos de serina fosforilada (Ser910 y Ser935) que favorecen su interacción con la proteína 14.3.3 [190], lo que puede retener HDAC4 en el citoplasma debido a la actividad exacerbada de la proteína mutada. La interacción de LRRK2 con 14.3.3 le confiere una localización citoplásmica difusa [190]. Pensamos que en el grupo GS,

LRRK2 puede interactuar con HDAC4 y que la acumulación de la proteína HDAC4 ejerce un retrocontrol negativo sobre su expresión génica y altera también la de HDAC3, pues una disminución de HDAC3 endógeno altera la actividad de HDAC4 [132]. Si HDAC4 forma un complejo con LRRK2, esto podría explicar en parte la hiperacetilación de las proteínas observadas en el grupo GS. Hay que señalar que no hemos observado una modulación significativa en la cantidad de acetil-CoA total en los diferentes grupos. El grupo GS tiene un nivel significativo de AceCS1, la enzima tiene una localización núcleo-citoplásmica y está activada por SIRT1 [148]. Su activación en este grupo puede modular los niveles de acetilación. AceCS1 y ACLY son las dos enzimas que producen acetil-CoA [143] núcleo-citoplásmica para la acetilación de las proteínas; pACLY aumenta en el grupo GS hasta 2 veces más que el control, pero no es estadísticamente significativo y desconocemos hasta qué nivel podría participar en la producción de acetil-CoA.

En cuanto a las HDACs de clase III, el nivel de expresión de los genes (*SIRT1*, *SIRT3*, *SIRT5* y *SIRT6*) es significativamente bajo en el grupo Co α . Sólo dos de ellos *SIRT5* y *SIRT6* se ven disminuidos en el grupo GS. No obstante, los niveles de proteínas endógenas son muy diferentes. *SIRT3* y *SIRT5* son proteínas mitocondriales y están significativamente aumentadas en el grupo Co α . La mitocondria tiene un papel crucial en el metabolismo celular y en la producción de energía; y es la fuente principal es la fuente principal de generación de EROs, y a su vez, sufre alteraciones como consecuencia de las mismas. Su biogénesis es regulada por fisión, fusión y una degradación por autofagia. La degradación selectiva de la mitocondria se conoce como la mitofagia, cuya desregulación aumenta la generación de EROs, provocando una acumulación de proteínas agregadas y la muerte celular. *SIRT3* tiene un papel antioxidante activando la transcripción de la catalasa y de la MnSOD (del inglés *manganese-dependent superoxide dismutase*) que es una enzima mitocondrial antioxidante, lo que sugiere que un incremento de *SIRT3* tiene que disminuir los niveles de ERO [191]. En nuestros resultados, observamos en el grupo Co α un incremento de *SIRT3* que está acompañada de una producción significativa de EROs y de una disminución del $\Delta\Psi_m$. Los mismos están experimentados en el grupo GS, la única diferencia es que no tiene un nivel de proteína *SIRT3* elevado. Además una sobreexpresión de *SIRT3* activa la β -oxidación de los ácidos grasos a través de la activación de AMPK α [192]. Sin embargo no observamos en el grupo Co α niveles de pAMPK α y de p-ACC estadísticamente significativos pero si exhibe menos vacuolas de lípidos. En otro sentido, pensamos que la diferencia observada entre Co α y GS puede ser debido a la autofagia exacerbada en el grupo GS [47]. Además en este grupo se observa una activación ligera de AMPK α y un aumento significativo de la fosforilación de su sustrato (pACC) lo que está en concordancia con resultados previos [189]. Estos resultados confirman una activación de la autofagia en el grupo GS y puede que una degradación excesiva de la mitocondria (mitofagia) disminuya el nivel de las proteínas mitocondriales tal y como *SIRT3*, *SIRT5*. Una extracción mitocondrial del grupo SH-SY5Y G20 muestra que las células tienen un nivel reducido de la proteína mitocondrial Tom20 (datos no mostrados). En concordancia con nuestros resultados, un estudio

reciente ha mostrado que el nivel de expresión de SIRT3 aumenta en células sometidas a un estímulo de estrés oxidativo durante 24 h y que su nivel de ARNm fluctúa durante el tratamiento [193]. Al igual que SIRT3, SIRT5 también tiene efectos citoprotector y anti-oxidante. SIRT5 protege *in vivo* e *in vitro* de la degeneración neuronal inducida por el MPTP/MPP⁺, la deficiencia de la proteína disminuye el nivel de expresión de la MnSOD [194]. Las dos proteínas controlan la capacidad anti-oxidante de la mitocondria, así, el incremento del nivel de expresión de SIRT3 y SIRT5 es una respuesta adaptiva al estrés crónico que sufren las células.

SIRT1 está fosforilada (pSIRT1) en el grupo GS, esta fosforilación hace que la proteína se transloque al núcleo. Estos resultados no aclaran el desequilibrio de las actividades HATs/HDACs en el grupo Co α , pero ponen de manifiesto el papel de esta proteína en la autofagia. LC3 tiene una localización nucleocitoplásmica, y se transloca al citoplasma durante la inducción de la autofagia. Basalmente, LC3-I es más abundante en el núcleo que en el citoplasma y se encuentra acetilada. SIRT1 desacetila LC3 nuclear en sus residuos K49 y K51 y otorga su translocación al citoplasma para la formación del autofagosoma. En condiciones normales la activación de SIRT1 con el resveratrol favorece esta translocación nucleocitoplásmica de LC3 y activa la autofagia [109]. Dado que el grupo GS tiene una autofagia basal exacerbada, planteamos que pSIRT1 deacetila LC3 y participa en la inducción. Al tratar las células durante 4 h con dos inhibidores inespecíficos de HDACs: la TSA que inhibe las clases I y II (Wang, Wang et al. 2009), y NAM, que inhibe la clase III, hemos observado que el nivel de lipidación de LC3 se incrementa con TSA y no con NAM en fibroblastos (datos no mostrados). Resultados similares fueron publicados con un inhibidor específico de SIRT1, EX527 [109], de esta manera se pone de manifiesto que TSA no afecta la desacetilación de LC3 ni impide su lipidación. No obstante, durante 2 h de tratamiento, los inhibidores aumentan el porcentaje de células IP⁺. Los dos inhibidores tienen un efecto tóxico pero las células son más sensibles a NAM, lo que muestra que las sirtuinas son importantes para la supervivencia celular. La TSA es citotóxico en modelos celulares de EP, su efecto aumenta la muerte celular inducida por MPP⁺ y rotenona en neuronas dopaminérgicas [195] lo que corrobora nuestros datos.

Basalmente, el grupo Co α tiene un porcentaje de viabilidad celular bajo respecto al grupo GS y esta diferencia puede ser debida a los niveles de pSIRT1. SIRT1 promueve la supervivencia celular en condiciones de estrés, desacetilando p53 [140]. Además frente a un estímulo de estrés oxidativo, SIRT1 citoplásmico no protege a las células de la muerte celular [141]. Así la inhibición de SIRT1 con NAM podría aumentar el porcentaje de células IP⁺ en fibroblastos. En western-blotting, TSA aumenta los niveles de proteínas acetiladas, efecto que no se observó con NAM. La inhibición de las sirtuinas es tóxica para las células pero no incrementa el nivel de acetilación de la H3K14 ni de la ac-tubulina K40 (datos no mostrados). Así, pensamos

que las HDACs de clase III tienen una actividad menor respecto a las HDACs de clase I y II en fibroblastos y esa diferencia se observa en el análisis de la actividad total de HDACs. Esta disminución de las actividades de las sirtuinas puede ser debida a un ratio NAD^+/NADH desregulado y las sirtuinas tienen una actividad NAD^+ -dependiente [184].

Los grupos Co α y GS tienen una β -oxidación de los ácidos grasos activada para enfrentar la depleción energética observada generalmente en la EP. Durante la patología, la actividad de la cadena respiratoria está disminuida a consecuencia de la inhibición del complejo I (NADH-ubiquinona reductasa) de la cadena de transporte electrónico [196]. Esta inhibición provoca una alteración o mal funcionamiento mitocondrial, aumenta la generación de EROs y el estrés oxidativo y posteriormente la muerte celular. Normalmente, el acetil-CoA que entra en la mitocondria durante el ciclo de Krebs produce NADH, el cual es transformado en ATP, pero el complejo I cataliza la oxidación de NADH en NAD^+ [197]. Así pensamos que la inhibición del complejo I (**Figura 6.1**) reduce los niveles de NAD^+ y afecta parcialmente las actividades de las sirtuinas, sobre todo en el grupo Co α . Además la inhibición de AMPK α por dorsomorfin incrementa significativamente el $\Delta\Psi_m$ en el grupo Co α , mientras que disminuye en el grupo GS. No obstante no desciende los niveles de EROs en ambos grupos.

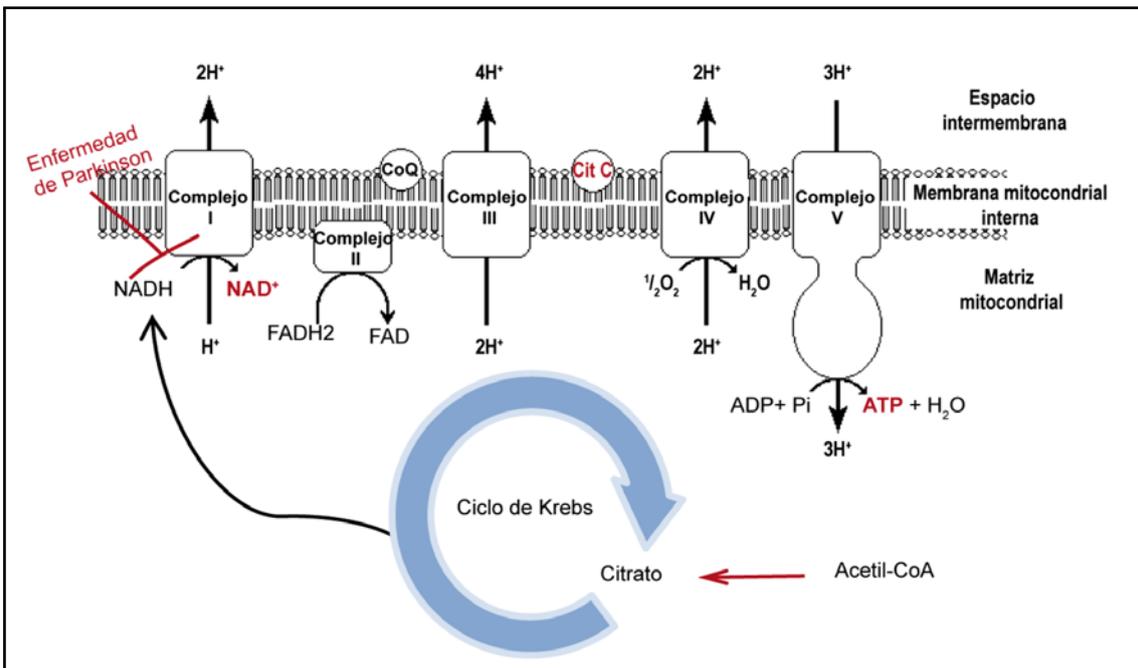


Figura 6.1: Cadena de transporte electrónico mitocondrial. Los diferentes complejos alojados en la membrana interna mitocondrial implicados en el transporte de electrones a partir del NADH/ NAD^+ hasta H_2O genera energía para bombear los protones y sintetizar el ATP. En la patología de la EP, el complejo I está inhibido.

Los grupos Co α y GS no tienen una diferencia estadísticamente significativa en la acetilación de las proteínas no histonas pero sí diferencian en los niveles de acetilación de las histonas. La diferencia de niveles de acetilación totales observada entre grupos Co α y GS no es debida a la EP sino a la mutación de la proteína LRRK2 porque en SH-SY5Y G20 el nivel de proteínas acetiladas sigue el mismo patrón además en fibroblastos con la mutación R1441G de LRRK2, los niveles de acetilación de las proteínas están también incrementados y los portadores no padecen todavía la EP. Así, el fenotipo celular entre individuos idiopáticos y individuos con la mutación G2019S de LRRK2 es claramente diferente a nivel epigenético. El grupo GS tiene más histonas acetiladas que el grupo Co α . Este último a pesar de tener una menor actividad total de HDAC, no hemos llegado a mostrar porque se produce esta hipo-acetilación de las histonas, además su actividad HAT no está alterada. Varios experimentos quedan por hacer para poder responder a ciertas hipótesis.

7. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Basándonos en los resultados obtenidos a lo largo de este trabajo, podemos concluir que:

8. El nivel de proteínas acetiladas es mayor en fibroblastos procedentes de enfermos con la mutación G2019S de LRRK2 que en los procedentes de enfermos idiopáticos. Esta misma afirmación es aplicable a los niveles de histonas acetiladas
8. Existe un desequilibrio de actividades HATs/HDACs en fibroblastos idiopáticos y que el ácido anarcárdico, un inhibidor de HATs controla esa desregulación y incrementa la supervivencia celular.
8. Los niveles de sirtuinas mitocondriales (SIRT3 y SIRT5) aumentan en fibroblastos idiopático y ejercen una respuesta adaptiva frente al estrés celular. Las actividades de las HDACs de clase III son disminuidas en fibroblastos idiopáticos y que son imprescindibles a la supervivencia celular.
8. El nivel total de acetil-coenzima A no varía pero los fibroblastos G2019S de LRRK2 tienen un nivel de AceCS1 elevado además, la β -oxidación de los ácidos grasos está exacerbada en ambos grupos a través de la activación de AMPK α .

8. BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía

1. de Lau, L.M. and M.M. Breteler, *Epidemiology of Parkinson's disease*. Lancet Neurol, 2006. **5**(6): p. 525-35.
2. Parkinson, J., *An essay on the shaking palsy*. 1817. J Neuropsychiatry Clin Neurosci, 2002. **14**(2): p. 223-36; discussion 222.
3. Rajput, A.H., *Frequency and cause of Parkinson's disease*. Can J Neurol Sci, 1992. **19**(1 Suppl): p. 103-7.
4. Hughes, A.J., et al., *A clinicopathologic study of 100 cases of Parkinson's disease*. Arch Neurol, 1993. **50**(2): p. 140-8.
5. Garcia Ruiz, P.J., M.J. Catalan, and J.M. Fernandez Carril, *Initial motor symptoms of Parkinson disease*. Neurologist, 2011. **17**(6 Suppl 1): p. S18-20.
6. Gibb, W.R., *Idiopathic Parkinson's disease and the Lewy body disorders*. Neuropathol Appl Neurobiol, 1986. **12**(3): p. 223-34.
7. Braak, H., et al., *Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology*. Cell Tissue Res, 2004. **318**(1): p. 121-34.
8. Jankovic, J., *Parkinson's disease: clinical features and diagnosis*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2008. **79**(4): p. 368-76.
9. Samii, A., J.G. Nutt, and B.R. Ransom, *Parkinson's disease*. Lancet, 2004. **363**(9423): p. 1783-93.
10. Moustafa, A.A. and M. Poletti, *Neural and behavioral substrates of subtypes of Parkinson's disease*. Front Syst Neurosci, 2013. **7**: p. 117.
11. Naoi, M., et al., *Glutathione redox status in mitochondria and cytoplasm differentially and sequentially activates apoptosis cascade in dopamine-melanin-treated SH-SY5Y cells*. Neurosci Lett, 2009. **465**(2): p. 118-22.
12. Sulzer, D., *Multiple hit hypotheses for dopamine neuron loss in Parkinson's disease*. Trends Neurosci, 2007. **30**(5): p. 244-50.
13. Bekris, L.M., I.F. Mata, and C.P. Zabetian, *The genetics of Parkinson disease*. J Geriatr Psychiatry Neurol, 2010. **23**(4): p. 228-42.
14. Farrer, M.J., *Genetics of Parkinson disease: paradigm shifts and future prospects*. Nat Rev Genet, 2006. **7**(4): p. 306-18.
15. Langston, J.W., et al., *1-Methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP⁺): identification of a metabolite of MPTP, a toxin selective to the substantia nigra*. Neurosci Lett, 1984. **48**(1): p. 87-92.
16. Langston, J.W. and P.A. Ballard, Jr., *Parkinson's disease in a chemist working with 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine*. N Engl J Med, 1983. **309**(5): p. 310.

Bibliografía

17. Bove, J., et al., *Toxin-induced models of Parkinson's disease*. NeuroRx, 2005. **2**(3): p. 484-94.
18. Niso-Santano, M., et al., *Low concentrations of paraquat induces early activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2, protein kinase B, and c-Jun N-terminal kinase 1/2 pathways: role of c-Jun N-terminal kinase in paraquat-induced cell death*. Toxicol Sci, 2006. **92**(2): p. 507-15.
19. Gonzalez-Polo, R.A., et al., *Paraquat-induced apoptotic cell death in cerebellar granule cells*. Brain Res, 2004. **1011**(2): p. 170-6.
20. Gonzalez-Polo, R.A., et al., *Relationship between autophagy and apoptotic cell death in human neuroblastoma cells treated with paraquat: could autophagy be a "brake" in paraquat-induced apoptotic death?* Autophagy, 2007. **3**(4): p. 366-7.
21. Gonzalez-Polo, R.A., et al., *Inhibition of paraquat-induced autophagy accelerates the apoptotic cell death in neuroblastoma SH-SY5Y cells*. Toxicol Sci, 2007. **97**(2): p. 448-58.
22. Gonzalez-Polo, R., et al., *Silencing DJ-1 reveals its contribution in paraquat-induced autophagy*. J Neurochem, 2009. **109**(3): p. 889-98.
23. Mounsey, R.B. and P. Teismann, *Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease: pathogenesis and neuroprotection*. Parkinsons Dis, 2010. **2011**: p. 617472.
24. Phillipson, O.T., *Management of the aging risk factor for Parkinson's disease*. Neurobiol Aging, 2014. **35**(4): p. 847-57.
25. Langston, J.W., et al., *Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis*. Science, 1983. **219**(4587): p. 979-80.
26. Lotharius, J. and K.L. O'Malley, *Role of mitochondrial dysfunction and dopamine-dependent oxidative stress in amphetamine-induced toxicity*. Ann Neurol, 2001. **49**(1): p. 79-89.
27. Tetrad, J.W. and J.W. Langston, *MPTP-induced parkinsonism as a model for Parkinson's disease*. Acta Neurol Scand Suppl, 1989. **126**: p. 35-40.
28. Farhoudi, M., et al., *Serum iron and ferritin level in idiopathic Parkinson*. Pak J Biol Sci, 2012. **15**(22): p. 1094-7.
29. Ngwa, H.A., et al., *Vanadium exposure induces olfactory dysfunction in an animal model of metal neurotoxicity*. Neurotoxicology, 2013.
30. Jellinger, K.A., *The relevance of metals in the pathophysiology of neurodegeneration, pathological considerations*. Int Rev Neurobiol, 2013. **110**: p. 1-47.

Bibliografía

31. Winneke, G., *Developmental aspects of environmental neurotoxicology: lessons from lead and polychlorinated biphenyls*. J Neurol Sci, 2011. **308**(1-2): p. 9-15.
32. Singh, A.K., et al., *A current review of cypermethrin-induced neurotoxicity and nigrostriatal dopaminergic neurodegeneration*. Curr Neuropharmacol, 2012. **10**(1): p. 64-71.
33. Niso-Santano, M., et al., *Activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 is a key factor in paraquat-induced cell death: modulation by the Nrf2/Trx axis*. Free Radic Biol Med, 2010. **48**(10): p. 1370-81.
34. Ortiz-Ortiz, M.A., et al., *Curcumin enhances paraquat-induced apoptosis of N27 mesencephalic cells via the generation of reactive oxygen species*. Neurotoxicology, 2009. **30**(6): p. 1008-18.
35. Niso-Santano, M., et al., *Activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 is a key factor in paraquat-induced cell death: modulation by the Nrf2/Trx axis*. Free Radic Biol Med, 2010. **48**(10): p. 1370-81.
36. Tamilselvam, K., et al., *Neuroprotective effects of hesperidin, a plant flavanone, on rotenone-induced oxidative stress and apoptosis in a cellular model for Parkinson's disease*. Oxid Med Cell Longev, 2013. **2013**: p. 102741.
37. Polymeropoulos, M.H., et al., *Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease*. Science, 1997. **276**(5321): p. 2045-7.
38. Spillantini, M.G., et al., *alpha-Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with lewy bodies*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(11): p. 6469-73.
39. Bonifati, V., *Genetics of Parkinson's disease--state of the art, 2013*. Parkinsonism Relat Disord, 2014. **20 Suppl 1**: p. S23-8.
40. Kitada, T., et al., *Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism*. Nature, 1998. **392**(6676): p. 605-8.
41. Bonifati, V., et al., *Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism*. Science, 2003. **299**(5604): p. 256-9.
42. Bonifati, V., et al., *DJ-1(PARK7), a novel gene for autosomal recessive, early onset parkinsonism*. Neurol Sci, 2003. **24**(3): p. 159-60.
43. van Duijn, C.M., et al., *Park7, a novel locus for autosomal recessive early-onset parkinsonism, on chromosome 1p36*. Am J Hum Genet, 2001. **69**(3): p. 629-34.
44. Morais, V.A., et al., *Parkinson's disease mutations in PINK1 result in decreased Complex I activity and deficient synaptic function*. EMBO Mol Med, 2009. **1**(2): p. 99-111.

Bibliografía

45. Gomez-Sanchez, R., et al., *Mitochondrial impairment increases FL-PINK1 levels by calcium-dependent gene expression*. Neurobiol Dis, 2014. **62**: p. 426-40.
46. Reinhardt, P., et al., *Genetic correction of a LRRK2 mutation in human iPSCs links parkinsonian neurodegeneration to ERK-dependent changes in gene expression*. Cell Stem Cell, 2013. **12**(3): p. 354-67.
47. Bravo-San Pedro, J.M., et al., *The LRRK2 G2019S mutant exacerbates basal autophagy through activation of the MEK/ERK pathway*. Cell Mol Life Sci, 2013. **70**(1): p. 121-36.
48. Tsika, E. and D.J. Moore, *Mechanisms of LRRK2-mediated neurodegeneration*. Curr Neurol Neurosci Rep, 2012. **12**(3): p. 251-60.
49. Marin, I., W.N. van Egmond, and P.J. van Haastert, *The Roco protein family: a functional perspective*. FASEB J, 2008. **22**(9): p. 3103-10.
50. Thaler, A., et al., *The LRRK2 G2019S mutation as the cause of Parkinson's disease in Ashkenazi Jews*. J Neural Transm (Vienna), 2009. **116**(11): p. 1473-82.
51. Gilsbach, B.K. and A. Kortholt, *Structural biology of the LRRK2 GTPase and kinase domains: implications for regulation*. Front Mol Neurosci, 2014. **7**: p. 32.
52. Zach, S., S. Felk, and F. Gillardon, *Signal transduction protein array analysis links LRRK2 to Ste20 kinases and PKC zeta that modulate neuronal plasticity*. PLoS One, 2010. **5**(10): p. e13191.
53. Yakhine-Diop, S.M.S., et al., *G2019S Mutation of LRRK2 increases Autophagy via MEK/ERK Pathway*. in press, 2015.
54. Lee, J.W. and J.R. Cannon, *LRRK2 mutations and neurotoxicant susceptibility*. Exp Biol Med (Maywood), 2015. **240**(6): p. 752-9.
55. Cardona, F., M. Tormos-Perez, and J. Perez-Tur, *Structural and functional in silico analysis of LRRK2 missense substitutions*. Mol Biol Rep, 2014. **41**(4): p. 2529-42.
56. West, A.B., et al., *Parkinson's disease-associated mutations in leucine-rich repeat kinase 2 augment kinase activity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(46): p. 16842-7.
57. Su, Y.C. and X. Qi, *Inhibition of excessive mitochondrial fission reduced aberrant autophagy and neuronal damage caused by LRRK2 G2019S mutation*. Hum Mol Genet, 2013. **22**(22): p. 4545-61.
58. Ng, C.H., et al., *Parkin protects against LRRK2 G2019S mutant-induced dopaminergic neurodegeneration in Drosophila*. J Neurosci, 2009. **29**(36): p. 11257-62.

Bibliografía

59. Yakhine-Diop, S.M., et al., *G2019S LRRK2 mutant fibroblasts from Parkinson's disease patients show increased sensitivity to neurotoxin 1-methyl-4-phenylpyridinium dependent of autophagy*. Toxicology, 2014. **324**: p. 1-9.
60. Su, Y.C., X. Guo, and X. Qi, *Threonine 56 phosphorylation of Bcl-2 is required for LRRK2 G2019S-induced mitochondrial depolarization and autophagy*. Biochim Biophys Acta, 2015. **1852**(1): p. 12-21.
61. Gonzalez-Polo, R.A., et al., *Is the Modulation of Autophagy the Future in the Treatment of Neurodegenerative Diseases?* Curr Top Med Chem, 2015. **15**(21): p. 2152-74.
62. Parzych, K.R. and D.J. Klionsky, *An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation*. Antioxid Redox Signal, 2014. **20**(3): p. 460-73.
63. Gwinn, D.M., et al., *AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint*. Mol Cell, 2008. **30**(2): p. 214-26.
64. Egan, D.F., et al., *Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy*. Science, 2011. **331**(6016): p. 456-61.
65. Hoyer-Hansen, M., et al., *Control of macroautophagy by calcium, calmodulin-dependent kinase kinase-beta, and Bcl-2*. Mol Cell, 2007. **25**(2): p. 193-205.
66. Grotemeier, A., et al., *AMPK-independent induction of autophagy by cytosolic Ca²⁺ increase*. Cell Signal, 2010. **22**(6): p. 914-25.
67. Lee, I.H. and T. Finkel, *Regulation of autophagy by the p300 acetyltransferase*. J Biol Chem, 2009. **284**(10): p. 6322-8.
68. Lee, I.H., et al., *A role for the NAD-dependent deacetylase Sirt1 in the regulation of autophagy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(9): p. 3374-9.
69. Liu, K.P., et al., *LC3B-II deacetylation by histone deacetylase 6 is involved in serum-starvation-induced autophagic degradation*. Biochem Biophys Res Commun, 2013. **441**(4): p. 970-5.
70. Chen, Q., et al., *Potassium Bisperoxo(1,10-phenanthroline)oxovanadate (bpV(phen)) Induces Apoptosis and Pyroptosis and Disrupts the P62-HDAC6 Protein Interaction to Suppress the Acetylated Microtubule-dependent Degradation of Autophagosomes*. J Biol Chem, 2015. **290**(43): p. 26051-8.
71. Kawaguchi, Y., et al., *The deacetylase HDAC6 regulates aggresome formation and cell viability in response to misfolded protein stress*. Cell, 2003. **115**(6): p. 727-38.
72. Lee, J.Y., et al., *HDAC6 controls autophagosome maturation essential for ubiquitin-selective quality-control autophagy*. EMBO J, 2010. **29**(5): p. 969-80.

Bibliografía

73. Zhang, L., et al., *Tubastatin A/ACY-1215 improves cognition in Alzheimer's disease transgenic mice*. J Alzheimers Dis, 2014. **41**(4): p. 1193-205.
74. Guedes-Dias, P., et al., *HDAC6 inhibition induces mitochondrial fusion, autophagic flux and reduces diffuse mutant huntingtin in striatal neurons*. Biochim Biophys Acta, 2015. **1852**(11): p. 2484-93.
75. Cook, C., et al., *Loss of HDAC6, a novel CHIP substrate, alleviates abnormal tau accumulation*. Hum Mol Genet, 2012. **21**(13): p. 2936-45.
76. Iwata, A., et al., *HDAC6 and microtubules are required for autophagic degradation of aggregated huntingtin*. J Biol Chem, 2005. **280**(48): p. 40282-92.
77. Lee, J.Y., et al., *Disease-causing mutations in parkin impair mitochondrial ubiquitination, aggregation, and HDAC6-dependent mitophagy*. J Cell Biol, 2010. **189**(4): p. 671-9.
78. Song, J.X., et al., *HMGB1 is involved in autophagy inhibition caused by SNCA/alpha-synuclein overexpression: a process modulated by the natural autophagy inducer corynoxine B*. Autophagy, 2014. **10**(1): p. 144-54.
79. Bonet-Ponce, L., et al., *Rotenone Induces the Formation of 4-Hydroxynonenal Aggregates. Role of ROS-Mediated Tubulin Hyperacetylation and Autophagic Flux Disruption*. Mol Neurobiol, 2015.
80. Gómez-Sánchez, R., et al., *Pink1 deficiency enhances autophagy and mitophagy induction*. Molecular & Cellular Oncology, 2015.
81. Winslow, A.R. and D.C. Rubinsztein, *The Parkinson disease protein alpha-synuclein inhibits autophagy*. Autophagy, 2011. **7**(4): p. 429-31.
82. Obeid, R., et al., *Methylation status and neurodegenerative markers in Parkinson disease*. Clin Chem, 2009. **55**(10): p. 1852-60.
83. International Parkinson's Disease Genomics, C. and C. Wellcome Trust Case Control, *A two-stage meta-analysis identifies several new loci for Parkinson's disease*. PLoS Genet, 2011. **7**(6): p. e1002142.
84. Coppede, F., *Genetics and epigenetics of Parkinson's disease*. ScientificWorldJournal, 2012. **2012**: p. 489830.
85. Jowaed, A., et al., *Methylation regulates alpha-synuclein expression and is decreased in Parkinson's disease patients' brains*. J Neurosci, 2010. **30**(18): p. 6355-9.
86. Goers, J., et al., *Nuclear localization of alpha-synuclein and its interaction with histones*. Biochemistry, 2003. **42**(28): p. 8465-71.

Bibliografía

87. Kontopoulos, E., J.D. Parvin, and M.B. Feany, *Alpha-synuclein acts in the nucleus to inhibit histone acetylation and promote neurotoxicity*. Hum Mol Genet, 2006. **15**(20): p. 3012-23.
88. Outeiro, T.F., et al., *Sirtuin 2 inhibitors rescue alpha-synuclein-mediated toxicity in models of Parkinson's disease*. Science, 2007. **317**(5837): p. 516-9.
89. Monti, B., et al., *Valproic acid is neuroprotective in the rotenone rat model of Parkinson's disease: involvement of alpha-synuclein*. Neurotox Res, 2010. **17**(2): p. 130-41.
90. Song, C., et al., *Environmental neurotoxic pesticide increases histone acetylation to promote apoptosis in dopaminergic neuronal cells: relevance to epigenetic mechanisms of neurodegeneration*. Mol Pharmacol, 2010. **77**(4): p. 621-32.
91. Ammal Kaidery, N., S. Tarannum, and B. Thomas, *Epigenetic landscape of Parkinson's disease: emerging role in disease mechanisms and therapeutic modalities*. Neurotherapeutics, 2013. **10**(4): p. 698-708.
92. Jablonka, E. and M.J. Lamb, *The changing concept of epigenetics*. Ann N Y Acad Sci, 2002. **981**: p. 82-96.
93. Berger, S.L., *An embarrassment of niches: the many covalent modifications of histones in transcriptional regulation*. Oncogene, 2001. **20**(24): p. 3007-13.
94. Flanagan, T.W. and D.T. Brown, *Molecular dynamics of histone H1*. Biochim Biophys Acta, 2015.
95. Sudarsanam, P. and F. Winston, *The Swi/Snf family nucleosome-remodeling complexes and transcriptional control*. Trends Genet, 2000. **16**(8): p. 345-51.
96. Narlikar, G.J., H.Y. Fan, and R.E. Kingston, *Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription*. Cell, 2002. **108**(4): p. 475-87.
97. Roth, S.Y., J.M. Denu, and C.D. Allis, *Histone acetyltransferases*. Annu Rev Biochem, 2001. **70**: p. 81-120.
98. Yong Zhong Xu, C. Kanagaratham, and D. Radzioch, *Chromatin Remodelling During Host-Bacterial Pathogen Interaction*, , Dr. Danuta Radzioch (Ed.). 2013(Chromatin Remodelling).
99. Brownell, J.E., et al., *Tetrahymena histone acetyltransferase A: a homolog to yeast Gcn5p linking histone acetylation to gene activation*. Cell, 1996. **84**(6): p. 843-51.
100. Taunton, J., C.A. Hassig, and S.L. Schreiber, *A mammalian histone deacetylase related to the yeast transcriptional regulator Rpd3p*. Science, 1996. **272**(5260): p. 408-11.

Bibliografía

101. Marmorstein, R. and S.Y. Roth, *Histone acetyltransferases: function, structure, and catalysis*. *Curr Opin Genet Dev*, 2001. **11**(2): p. 155-61.
102. Doerks, T., et al., *Systematic identification of novel protein domain families associated with nuclear functions*. *Genome Res*, 2002. **12**(1): p. 47-56.
103. Utley, R.T., et al., *Transcriptional activators direct histone acetyltransferase complexes to nucleosomes*. *Nature*, 1998. **394**(6692): p. 498-502.
104. Larschan, E. and F. Winston, *The *S. cerevisiae* SAGA complex functions in vivo as a coactivator for transcriptional activation by Gal4*. *Genes Dev*, 2001. **15**(15): p. 1946-56.
105. Eberharter, A. and P.B. Becker, *Histone acetylation: a switch between repressive and permissive chromatin. Second in review series on chromatin dynamics*. *EMBO Rep*, 2002. **3**(3): p. 224-9.
106. Bu, P., et al., *Loss of Gcn5 acetyltransferase activity leads to neural tube closure defects and exencephaly in mouse embryos*. *Mol Cell Biol*, 2007. **27**(9): p. 3405-16.
107. Sykes, S.M., et al., *Acetylation of the p53 DNA-binding domain regulates apoptosis induction*. *Mol Cell*, 2006. **24**(6): p. 841-51.
108. Gu, W. and R.G. Roeder, *Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain*. *Cell*, 1997. **90**(4): p. 595-606.
109. Huang, R., et al., *Deacetylation of nuclear LC3 drives autophagy initiation under starvation*. *Mol Cell*, 2015. **57**(3): p. 456-66.
110. Sklenar, A.R. and M.R. Parthun, *Characterization of yeast histone H3-specific type B histone acetyltransferases identifies an ADA2-independent Gcn5p activity*. *BMC Biochem*, 2004. **5**: p. 11.
111. Verreault, A., et al., *Nucleosomal DNA regulates the core-histone-binding subunit of the human Hat1 acetyltransferase*. *Curr Biol*, 1998. **8**(2): p. 96-108.
112. Ling, X., et al., *Yeast histone H3 and H4 amino termini are important for nucleosome assembly in vivo and in vitro: redundant and position-independent functions in assembly but not in gene regulation*. *Genes Dev*, 1996. **10**(6): p. 686-99.
113. Sterner, D.E. and S.L. Berger, *Acetylation of histones and transcription-related factors*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2000. **64**(2): p. 435-59.
114. Chan, H.M. and N.B. La Thangue, *p300/CBP proteins: HATs for transcriptional bridges and scaffolds*. *J Cell Sci*, 2001. **114**(Pt 13): p. 2363-73.
115. Liu, L., et al., *p53 sites acetylated in vitro by PCAF and p300 are acetylated in vivo in response to DNA damage*. *Mol Cell Biol*, 1999. **19**(2): p. 1202-9.

Bibliografía

116. Liu, Y.Z., N.S. Thomas, and D.S. Latchman, *CBP associates with the p42/p44 MAPK enzymes and is phosphorylated following NGF treatment*. *Neuroreport*, 1999. **10**(6): p. 1239-43.
117. Liu, Y.Z., J.C. Chrivia, and D.S. Latchman, *Nerve growth factor up-regulates the transcriptional activity of CBP through activation of the p42/p44(MAPK) cascade*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(49): p. 32400-7.
118. Schiltz, R.L., et al., *Overlapping but distinct patterns of histone acetylation by the human coactivators p300 and PCAF within nucleosomal substrates*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(3): p. 1189-92.
119. Taipale, M., et al., *hMOF histone acetyltransferase is required for histone H4 lysine 16 acetylation in mammalian cells*. *Mol Cell Biol*, 2005. **25**(15): p. 6798-810.
120. Avvakumov, N. and J. Cote, *The MYST family of histone acetyltransferases and their intimate links to cancer*. *Oncogene*, 2007. **26**(37): p. 5395-407.
121. Neal, K.C., et al., *A new human member of the MYST family of histone acetyltransferases with high sequence similarity to Drosophila MOF*. *Biochim Biophys Acta*, 2000. **1490**(1-2): p. 170-4.
122. Nagy, Z. and L. Tora, *Distinct GCN5/PCAF-containing complexes function as co-activators and are involved in transcription factor and global histone acetylation*. *Oncogene*, 2007. **26**(37): p. 5341-57.
123. Shi, S., et al., *Dimeric structure of p300/CBP associated factor*. *BMC Struct Biol*, 2014. **14**: p. 2.
124. Delcuve, G.P., D.H. Khan, and J.R. Davie, *Roles of histone deacetylases in epigenetic regulation: emerging paradigms from studies with inhibitors*. *Clin Epigenetics*, 2012. **4**(1): p. 5.
125. Luo, Y., et al., *Trans-regulation of histone deacetylase activities through acetylation*. *J Biol Chem*, 2009. **284**(50): p. 34901-10.
126. Choudhary, C., et al., *Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions*. *Science*, 2009. **325**(5942): p. 834-40.
127. Fischer, D.D., et al., *Isolation and characterization of a novel class II histone deacetylase, HDAC10*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(8): p. 6656-66.
128. de Ruijter, A.J., et al., *Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family*. *Biochem J*, 2003. **370**(Pt 3): p. 737-49.
129. Guan, J.S., et al., *HDAC2 negatively regulates memory formation and synaptic plasticity*. *Nature*, 2009. **459**(7243): p. 55-60.

Bibliografía

130. Montgomery, R.L., et al., *Histone deacetylases 1 and 2 redundantly regulate cardiac morphogenesis, growth, and contractility*. Genes Dev, 2007. **21**(14): p. 1790-802.
131. He, S., et al., *Differential intranuclear organization of transcription factors Sp1 and Sp3*. Mol Biol Cell, 2005. **16**(9): p. 4073-83.
132. Fischle, W., et al., *Enzymatic activity associated with class II HDACs is dependent on a multiprotein complex containing HDAC3 and SMRT/N-CoR*. Mol Cell, 2002. **9**(1): p. 45-57.
133. Bertos, N.R., A.H. Wang, and X.J. Yang, *Class II histone deacetylases: structure, function, and regulation*. Biochem Cell Biol, 2001. **79**(3): p. 243-52.
134. Kao, H.Y., et al., *Isolation and characterization of mammalian HDAC10, a novel histone deacetylase*. J Biol Chem, 2002. **277**(1): p. 187-93.
135. Blander, G. and L. Guarente, *The Sir2 family of protein deacetylases*. Annu Rev Biochem, 2004. **73**: p. 417-35.
136. Saunders, L.R. and E. Verdin, *Sirtuins: critical regulators at the crossroads between cancer and aging*. Oncogene, 2007. **26**(37): p. 5489-504.
137. Imai, S., et al., *Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase*. Nature, 2000. **403**(6771): p. 795-800.
138. Costantini, S., et al., *Genealogy of an ancient protein family: the Sirtuins, a family of disordered members*. BMC Evol Biol, 2013. **13**: p. 60.
139. Tanno, M., et al., *Nucleocytoplasmic shuttling of the NAD⁺-dependent histone deacetylase SIRT1*. J Biol Chem, 2007. **282**(9): p. 6823-32.
140. Luo, J., et al., *Negative control of p53 by Sir2alpha promotes cell survival under stress*. Cell, 2001. **107**(2): p. 137-48.
141. Jin, Q., et al., *Cytoplasm-localized SIRT1 enhances apoptosis*. J Cell Physiol, 2007. **213**(1): p. 88-97.
142. McBurney, M.W., et al., *The mammalian SIR2alpha protein has a role in embryogenesis and gametogenesis*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(1): p. 38-54.
143. Wellen, K.E., et al., *ATP-citrate lyase links cellular metabolism to histone acetylation*. Science, 2009. **324**(5930): p. 1076-80.
144. Migita, T., et al., *ATP citrate lyase: activation and therapeutic implications in non-small cell lung cancer*. Cancer Res, 2008. **68**(20): p. 8547-54.
145. Lin, R., et al., *Acetylation stabilizes ATP-citrate lyase to promote lipid biosynthesis and tumor growth*. Mol Cell, 2013. **51**(4): p. 506-18.

Bibliografía

146. Zu, X.Y., et al., *ATP citrate lyase inhibitors as novel cancer therapeutic agents*. Recent Pat Anticancer Drug Discov, 2012. **7**(2): p. 154-67.
147. Beigneux, A.P., et al., *ATP-citrate lyase deficiency in the mouse*. J Biol Chem, 2004. **279**(10): p. 9557-64.
148. Ariyannur, P.S., et al., *Nuclear-cytoplasmic localization of acetyl coenzyme a synthetase-1 in the rat brain*. J Comp Neurol, 2010. **518**(15): p. 2952-77.
149. Chu, K.Y., et al., *ATP-citrate lyase reduction mediates palmitate-induced apoptosis in pancreatic beta cells*. J Biol Chem, 2010. **285**(42): p. 32606-15.
150. Hallows, W.C., S. Lee, and J.M. Denu, *Sirtuins deacetylate and activate mammalian acetyl-CoA synthetases*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(27): p. 10230-5.
151. Menendez, J.A. and R. Lupu, *Fatty acid synthase-catalyzed de novo fatty acid biosynthesis: from anabolic-energy-storage pathway in normal tissues to jack-of-all-trades in cancer cells*. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2004. **52**(6): p. 414-26.
152. Puig, T., et al., *Novel Inhibitors of Fatty Acid Synthase with Anticancer Activity*. Clin Cancer Res, 2009. **15**(24): p. 7608-7615.
153. Viollet, B., et al., *AMPK inhibition in health and disease*. Crit Rev Biochem Mol Biol, 2010. **45**(4): p. 276-95.
154. Hardie, D.G. and D.A. Pan, *Regulation of fatty acid synthesis and oxidation by the AMP-activated protein kinase*. Biochem Soc Trans, 2002. **30**(Pt 6): p. 1064-70.
155. Guo, Y., et al., *AMPK inhibition blocks ROS-NFkappaB signaling and attenuates endotoxemia-induced liver injury*. PLoS One, 2014. **9**(1): p. e86881.
156. Yi, C. and L. Yu, *How does acetylation regulate autophagy?* Autophagy, 2012. **8**(10): p. 1529-30.
157. Banreti, A., M. Sass, and Y. Graba, *The emerging role of acetylation in the regulation of autophagy*. Autophagy, 2013. **9**(6): p. 819-29.
158. Papkovskaia, T.D., et al., *G2019S leucine-rich repeat kinase 2 causes uncoupling protein-mediated mitochondrial depolarization*. Hum Mol Genet, 2012. **21**(19): p. 4201-13.
159. Solla, P., et al., *Parkin Exon Rearrangements and Sequence Variants in LRRK2 Mutations Carriers: Analysis on a Possible Modifier Effect on LRRK2 Penetrance*. Parkinsons Dis, 2010. **2010**: p. 537698.

Bibliografía

160. Fuentes, J.M., et al., *Clean Western blots of membrane proteins after yeast heterologous expression following a shortened version of the method of Perini et al.* Anal Biochem, 2000. **285**(2): p. 276-8.
161. Robinson, K.M., et al., *Selective fluorescent imaging of superoxide in vivo using ethidium-based probes.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(41): p. 15038-43.
162. <Flow Cytometric Analysis of Respiratory Burst Activity.pdf>.
163. Rothe, G. and G. Valet, *Flow cytometric analysis of respiratory burst activity in phagocytes with hydroethidine and 2',7'-dichlorofluorescein.* J Leukoc Biol, 1990. **47**(5): p. 440-8.
164. Carter, W.O., P.K. Narayanan, and J.P. Robinson, *Intracellular hydrogen peroxide and superoxide anion detection in endothelial cells.* J Leukoc Biol, 1994. **55**(2): p. 253-8.
165. Rumin, J., et al., *The use of fluorescent Nile red and BODIPY for lipid measurement in microalgae.* Biotechnol Biofuels, 2015. **8**: p. 42.
166. Suzuki, M., Y. Shinohara, and T. Fujimoto, *Histochemical detection of lipid droplets in cultured cells.* Methods Mol Biol, 2013. **931**: p. 483-91.
167. Rodriguez-Arribas, M., et al., *IFDOTMETER: A New Software Application for Automated Immunofluorescence Analysis.* J Lab Autom, 2015.
168. <Simultaneous detection of apoptosis and mitochondrial.pdf>.
169. Landry, B., et al., *Progress in RNAi-mediated Molecular Therapy of Acute and Chronic Myeloid Leukemia.* Mol Ther Nucleic Acids, 2015. **4**: p. e240.
170. Rouaux, C., et al., *Critical loss of CBP/p300 histone acetylase activity by caspase-6 during neurodegeneration.* EMBO J, 2003. **22**(24): p. 6537-49.
171. Jin, H., et al., *alpha-Synuclein negatively regulates protein kinase Cdelta expression to suppress apoptosis in dopaminergic neurons by reducing p300 histone acetyltransferase activity.* J Neurosci, 2011. **31**(6): p. 2035-51.
172. Park, S.Y., et al., *Selective inhibition of PCAF suppresses microglial-mediated beta-amyloid neurotoxicity.* Int J Mol Med, 2013. **32**(2): p. 469-75.
173. Maurice, T., et al., *Altered memory capacities and response to stress in p300/CBP-associated factor (PCAF) histone acetylase knockout mice.* Neuropsychopharmacology, 2008. **33**(7): p. 1584-602.
174. Duclot, F., et al., *Mice knock out for the histone acetyltransferase p300/CREB binding protein-associated factor develop a resistance to amyloid toxicity.* Neuroscience, 2010. **167**(3): p. 850-63.
175. Bodai, L., et al., *Pcaf modulates polyglutamine pathology in a Drosophila model of Huntington's disease.* Neurodegener Dis, 2012. **9**(2): p. 104-6.

Bibliografía

176. Pirooznia, S.K., et al., *Tip60 HAT activity mediates APP induced lethality and apoptotic cell death in the CNS of a Drosophila Alzheimer's disease model*. PLoS One, 2012. **7**(7): p. e41776.
177. Valor, L.M., et al., *Lysine acetyltransferases CBP and p300 as therapeutic targets in cognitive and neurodegenerative disorders*. Curr Pharm Des, 2013. **19**(28): p. 5051-64.
178. Kornacki, J.R., A.D. Stuparu, and M. Mrksich, *Acetyltransferase p300/CBP associated Factor (PCAF) regulates crosstalk-dependent acetylation of histone H3 by distal site recognition*. ACS Chem Biol, 2015. **10**(1): p. 157-64.
179. Balasubramanyam, K., et al., *Small molecule modulators of histone acetyltransferase p300*. J Biol Chem, 2003. **278**(21): p. 19134-40.
180. Choong, C.J., et al., *A novel histone deacetylase 1 and 2 isoform-specific inhibitor alleviates experimental Parkinson's disease*. Neurobiol Aging, 2015.
181. <Epigenetic Study of Parkinson's Disease in Experimental.pdf>.
182. Salama, A.F., et al., *Epigenetic Study of Parkinson's Disease in Experimental Animal Model*. International Journal of Clinical and Experimental Neurology, 2015. **3**(1): p. 11-20.
183. Chuang, D.M., et al., *Multiple roles of HDAC inhibition in neurodegenerative conditions*. Trends Neurosci, 2009. **32**(11): p. 591-601.
184. Green, K.N., et al., *Nicotinamide restores cognition in Alzheimer's disease transgenic mice via a mechanism involving sirtuin inhibition and selective reduction of Thr231-phosphotau*. J Neurosci, 2008. **28**(45): p. 11500-10.
185. Galdieri, L. and A. Vancura, *Acetyl-CoA carboxylase regulates global histone acetylation*. J Biol Chem, 2012. **287**(28): p. 23865-76.
186. Wallet, M.A., et al., *Triclosan alters antimicrobial and inflammatory responses of epithelial cells*. Oral Dis, 2013. **19**(3): p. 296-302.
187. Song, C., et al., *Paraquat induces epigenetic changes by promoting histone acetylation in cell culture models of dopaminergic degeneration*. Neurotoxicology, 2011. **32**(5): p. 586-95.
188. Chen, Z., et al., *The histone acetyltransferase hMOF acetylates Nrf2 and regulates anti-drug responses in human non-small cell lung cancer*. Br J Pharmacol, 2014. **171**(13): p. 3196-211.
189. Gomez-Suaga, P., et al., *Leucine-rich repeat kinase 2 regulates autophagy through a calcium-dependent pathway involving NAADP*. Hum Mol Genet, 2012. **21**(3): p. 511-25.

Bibliografía

190. Dzamko, N., et al., *Inhibition of LRRK2 kinase activity leads to dephosphorylation of Ser(910)/Ser(935), disruption of 14-3-3 binding and altered cytoplasmic localization*. *Biochem J*, 2010. **430**(3): p. 405-13.
191. Kincaid, B. and E. Bossy-Wetzel, *Forever young: SIRT3 a shield against mitochondrial meltdown, aging, and neurodegeneration*. *Front Aging Neurosci*, 2013. **5**: p. 48.
192. Shi, T., G.Q. Fan, and S.D. Xiao, *SIRT3 reduces lipid accumulation via AMPK activation in human hepatic cells*. *J Dig Dis*, 2010. **11**(1): p. 55-62.
193. Dai, S.H., et al., *Sirt3 protects cortical neurons against oxidative stress via regulating mitochondrial Ca²⁺ and mitochondrial biogenesis*. *Int J Mol Sci*, 2014. **15**(8): p. 14591-609.
194. Liu, L., et al., *Protective role of SIRT5 against motor deficit and dopaminergic degeneration in MPTP-induced mice model of Parkinson's disease*. *Behav Brain Res*, 2015. **281**: p. 215-21.
195. Wang, Y., et al., *HDAC inhibitor trichostatin A-inhibited survival of dopaminergic neuronal cells*. *Neurosci Lett*, 2009. **467**(3): p. 212-6.
196. Schapira, A.H., et al., *Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease*. *J Neurochem*, 1990. **54**(3): p. 823-7.
197. Kotlyar, A.B. and N. Borovok, *NADH oxidation and NAD⁺ reduction catalysed by tightly coupled inside-out vesicles from Paracoccus denitrificans*. *Eur J Biochem*, 2002. **269**(16): p. 4020-4.

“La beauté d’une action réside dans son achèvement”

Cheikh Ahmadou Bamba