



Programa de doctorat de BIOMEDICINA

Bienni 2003-2005

**Mecanismes de toxicitat de la dopamina en cèl·lules de
neuroblastoma humà SH-SY5Y**

Aquesta tesi ha estat realitzada sota la direcció del Dr. Santiago Ambrosio Viale a la Unitat de Bioquímica del Departament de Ciències Fisiològiques II de la Universitat de Barcelona

Pol Giménez Xavier

Dr. Santiago Ambrosio Viale

Memòria presentada per Pol Giménez Xavier
Per optar al grau de
Doctor per la Universitat de Barcelona

Si saps fer un Western,
saps cuinar.

TAULA DE CONTINGUTS

INTRODUCCIÓ	1
1.1 La dopamina	3
1.2 La malaltia de Parkinson	12
1.3 Neurodegeneració	19
1.3.1 Toxicitat de la dopamina	20
1.3.2 Estrès cel·lular	20
1.3.2.1 Estrès oxidatiu	21
1.3.2.2 Estrès reticular	24
1.3.3 Mort cel·lular	28
1.3.3.1 Apoptosi	30
1.3.3.2 Autofàgia	36
1.4 Les cèl·lules SH-SY5Y	53
OBJECTIUS	55
RESULTATS	59
Efecte de la dopamina sobre la viabilitat i el poder reductor de les cèl·lules SH-SY5Y ...	61
Efecte de la dopamina sobre l'expressió de proteïnes en cèl·lules SH-SY5Y	85
Processos moleculars en la mort induïda per dopamina en cèl·lules SH-SY5Y	107
DISCUSSIÓ GENERAL	131
CONCLUSIONS	139
MATERIALS I MÈTODES	143
BIBLIOGRAFIA	197
ABREVIACIONS	227
PUBLICACIONS	233

1.1 LA DOPAMINA

La dopamina (DA) (Figura 1.1) és, igual que la noradrenalina i l'adrenalina, una catecolamina. Les catecolamines són compostos químics formats per un nucli catecol (un anell de benzè amb dos grups hidroxils en posició orto) i una cadena d'etilamina o algun dels seus derivats.

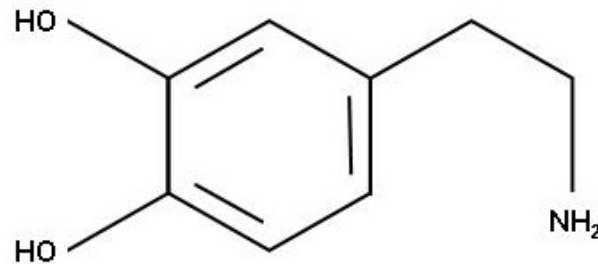


Figura 1.1. Estructura química de la DA (3,4-dihidroxifeniletilamina).

1.1.1 FUNCIONS: LES VIES DOPAMINÈRGIQUES

La DA té moltes funcions al cervell. Cal destacar el seu rol en la regulació del comportament i cognició, activitat motora, motivació i recompensa, regulació de la prolactina, son, estat d'ànim, atenció i aprenentatge.

Les neurones dopaminèrgiques (aquelles que presenten com a principal neurotransmissor la DA) es troben majoritàriament en nuclis mesencefàlics com l'àrea tegmental ventral (ATV) i la *substantia nigra pars compacta* (SNpc), però també es troben en altres llocs com l'hipotàlem, el bulb olfatori i la retina.

Les principals vies dopaminèrgiques són:

- La via nigro-estriatal.
- La via mesolímbica.
- La via mesocortical.
- La via tuberoinfundibular.

La **via nigro-estriatal** connecta la SNpc amb l'estriat (nuclis caudat i putamen). Aquesta via es relaciona amb el control motor i la seva degeneració està relacionada amb la malaltia de Parkinson (PD, *Parkinson's disease*).

La **via mesolímbica** arrenca a l'ATV i arriba a diferents estructures com són el *nucleus accumbens* i l'amígdala. La via mesolímbica està relacionada amb el control dels estats emocionals, el plaer i sovint es relaciona amb la recompensa i el desig. Aquesta via s'ha implicat en el procés de l'addicció en el sentit més ampli.

La **via mesocortical** s'inicia a l'ATV i finalitza al còrtex prefrontal, còrtex cingulat anterior i còrtex entorrinal. Aquesta via també es coneix amb el nom de via de la recompensa i ha estat relacionada amb els símptomes negatius de l'esquizofrènia.

La **via tuberoinfundibular** va des de l'hipotàlem fins a l'eminència mitja i la hipòfisi, regulant la secreció de prolactina i altres processos neurohormonals.

(Per a una revisió sobre aquest tema consultar l'article de Bjorkoy, *et al.*, 2007).

1.1.2 SÍNTESI

La síntesi de DA es realitza a partir de l'aminoàcid Tyr (Figura 1.2). Després d'un primer pas d'hidroxilació catalitzat per la tirosina hidroxilasa (TH), es produeix L-DOPA (3,4-dihidroxifenilalanina). Aquesta finalment es converteix en dopamina mitjançant una descarboxilació catalitzada per la descarboxilasa d'aminoàcids aromàtics (DAA).

La hidroxilació de la Tyr és el pas limitant en la síntesi de catecolamines al SNC (Nagatsu, *et al.*, 1964) i, per tant, també en la síntesi de DA. Aquest enzim és una monooxigenasa que utilitza Tyr i oxigen com a substrats i tetrahidrobiopterina (BH₄) com a cofactor per afegir un grup hidroxil a l'aminoàcid.

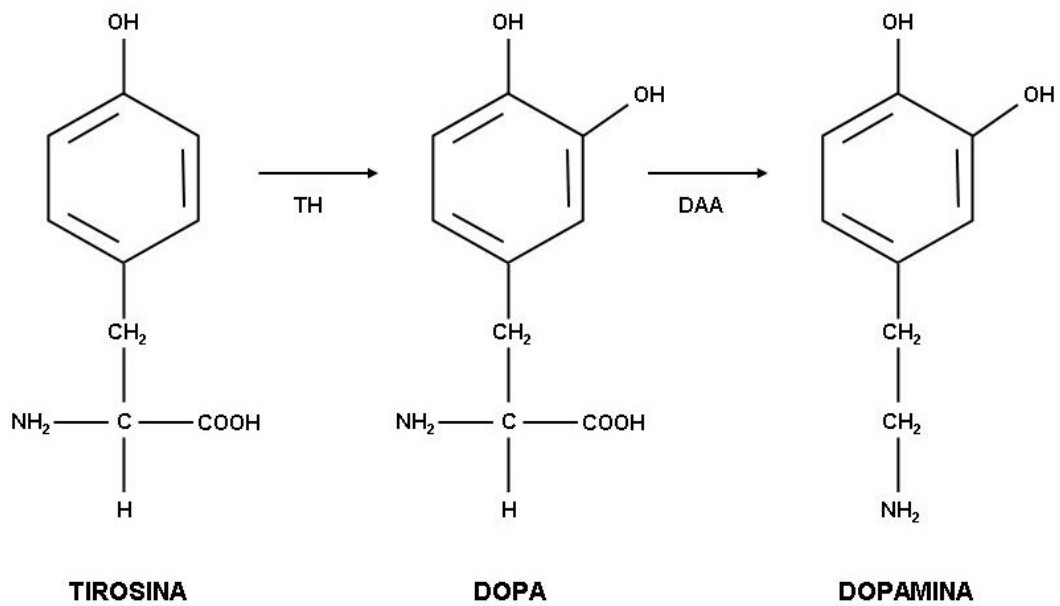


Figura 1.2. Biosíntesi de DA.

L'activitat TH està regulada per diferents factors:

- Regulació per substrat i producte. Els productes metabòlics (L-DOPA i DA) inhibeixen l'activitat de la TH en homogenats de teixit nerviós (Fujisawa, *et al.*, 1989). La ràpida acció de la DAA fa que la concentració d'L-DOPA sigui molt baixa i, per tant, poc rellevant en la regulació de l'enzim. En canvi, la DA té una certa capacitat de regular la TH per *feed-back*.

- Regulació per fosforilació. L'activitat de la TH depèn críticament del seu estat de fosforilació (Fujisawa, *et al.*, 1989). L'addició de fosfats produeix un increment de l'activitat catalítica i pot estar catalitzada per diferents quinases com la PKA, la CaMKII i la PKC.

- Regulació per receptor. Diferents estudis tant *in vivo* com *in vitro* han demostrat que els agonistes dopaminèrgics disminueixen la síntesi de DA (Hetey, *et al.*, 1985). Altres neurotransmissors com l'adenosina i el glutamat poden regular la síntesi de DA activant receptors presents en les terminacions dopaminèrgiques (Chowdhury, *et al.*, 1991).

- La funció de la TH requereix també de la presència de ferro com a grup prostètic i d' α -cetoglutarat com a regulador al·lostèric.

Després de la seva formació la DA és emmagatzemada mitjançant transportadors vesiculars de monoamines (VMAT) a l'interior de vesícules sinàptiques, segons un gradient invers de protons (Amara, *et al.*, 1993).

1.1.3 RECEPTORS I TRANSPORTADORS

Com en gairebé tots els processos de neurotransmissió coneguts la DA és alliberada a l'espai sinàptic a través de l'exocitosi de les vesícules sinàptiques. Aquest procés és desencadenat per l'entrada de calci com a conseqüència de l'arribada del potencial d'acció a la terminació nerviosa.

L'acció de la DA sobre les cèl·lules diana depèn del tipus de receptor present en elles. Segons les seves característiques moleculars s'han descrit 5 subtipus de receptors dopaminèrgics, els quals s'han agrupat en dues famílies farmacològiques anomenades D_1 i D_2 a partir de l'efecte d'agonistes i antagonistes selectius.

La família D_1 està formada per dos subtipus, anomenats D_1 i D_5 , i es caracteritza per estimular l'activitat adenilat ciclasa. En canvi, la família D_2 , formada pels subtipus D_2 , D_3 i D_4 , es caracteritza per inhibir o no actuar sobre aquest enzim (Bradford, 1988). Tots aquests receptors són receptors acoblats a proteïnes G.

La recaptació de DA a la sinapsi dopaminèrgica està mitjançada pel transportador de DA (DAT) que pertany a la família de transportadors de neurotransmissors dependents de Na^+ i Cl^- (Cragg, *et al.*, 2004).

1.1.4 METABOLISME I TRANSFORMACIÓ DE LA DOPAMINA

El procés d'inactivació de la DA es produeix fonamentalment mitjançant dos enzims, la monoamino-oxidasa (MAO) i la catecol-O-metiltransferasa (COMT), essent els principals productes de la degradació l'àcid dihidroxifenilacètic (DOPAC) i l'àcid homovanílic (HVA) (Figura 1.3).

Hi han dos subtipus principals de MAO, MAO-A i MAO-B que es localitzen majoritàriament a la membrana mitocondrial externa (Jhonson, 1968).

La COMT presenta dues formes, una soluble i una altra unida a membrana, de manera que la major part del seu producte és extracel·lular (Mannisto, *et al.*, 1999).

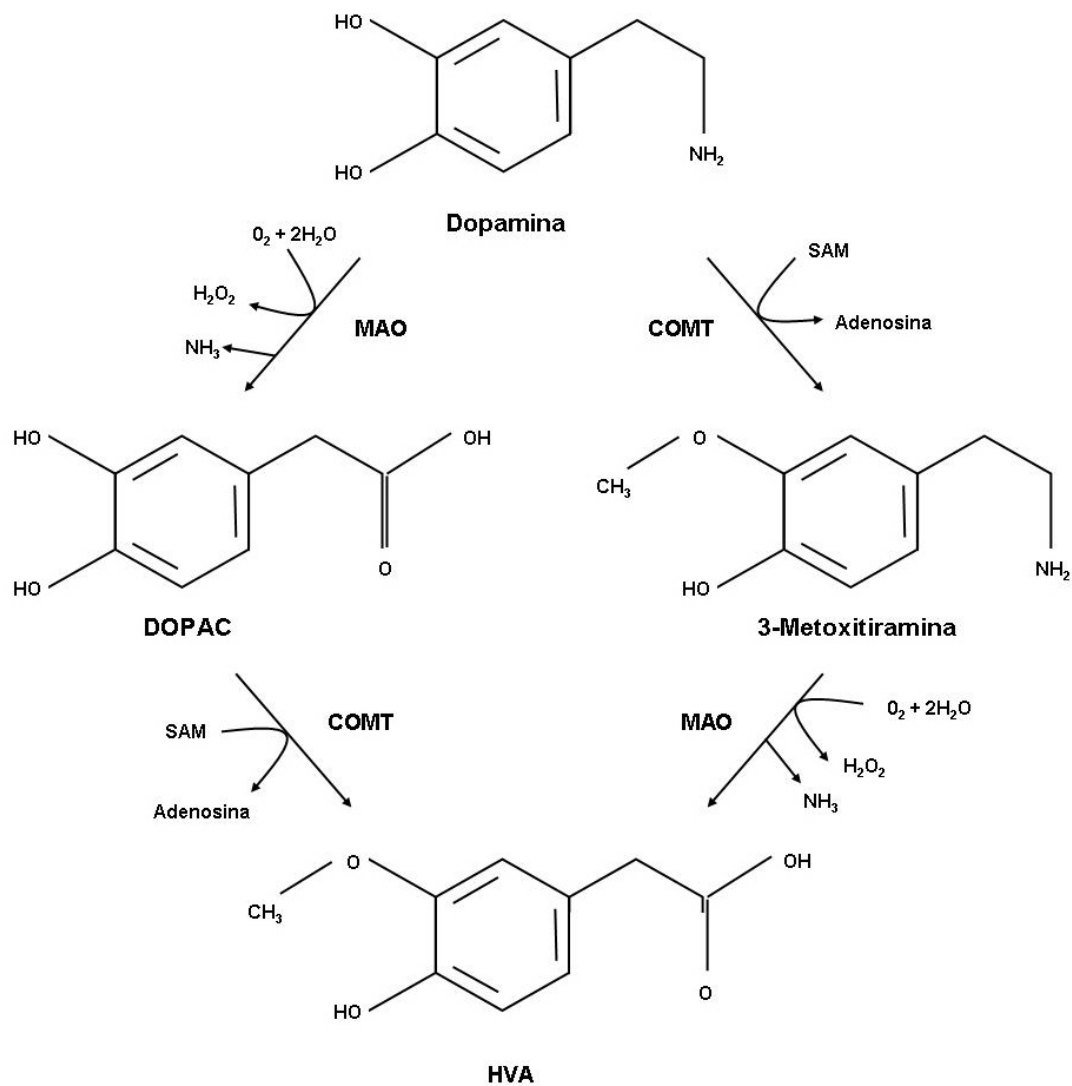


Figura 1.3. Inactivació de la DA.

1.1.4.1 Formació de quinones i aminocroms

L'oxidació de la dopamina a aminocrom té lloc mitjançant 3 reaccions (Figura 1.4). La primera reacció consisteix en la transferència de dos electrons. Aquesta transferència és molt ràpida i es forma DA-o-quinona. Durant la segona reacció la cadena d'etilamina es cicle i es forma el leucoaminocrom. En la tercera reacció el leucoaminocrom s'oxida a dopaminocrom, en aquest procés es transfereixen dos electrons. Totes aquestes reaccions són altament afavorides en un pH alcalí.

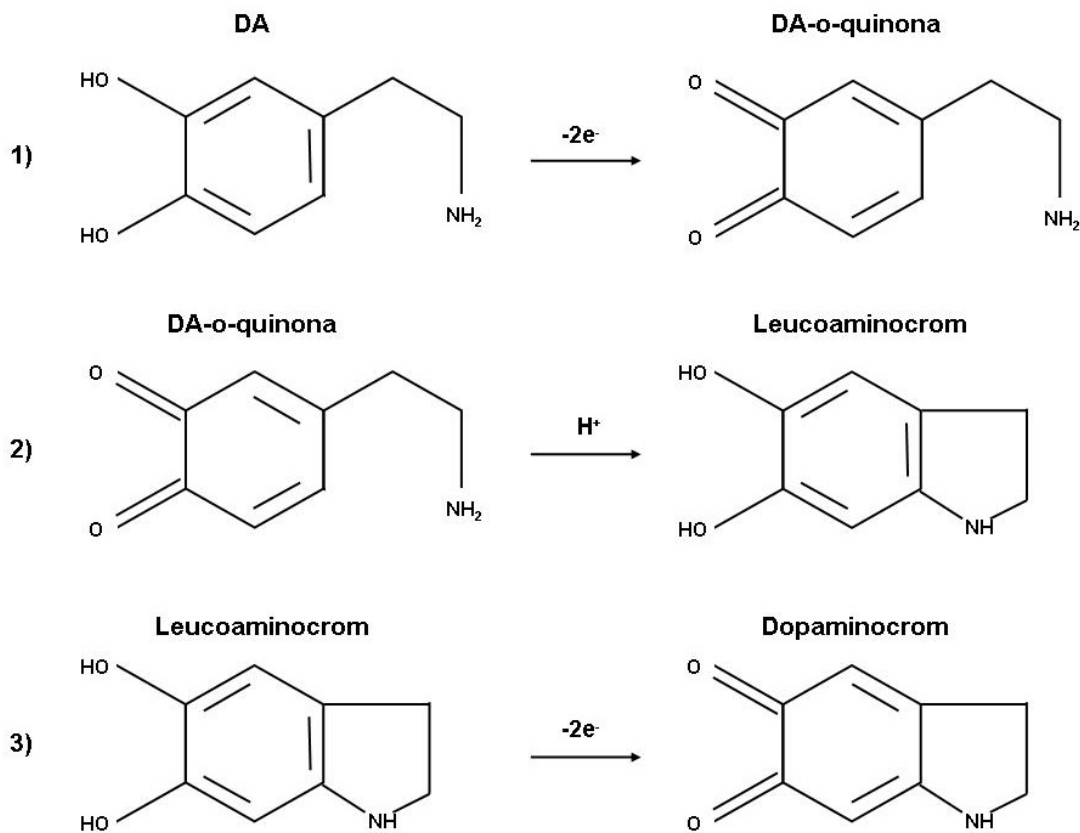


Figura 1.4. Representació de les reaccions que tenen lloc durant el procés d'oxidació de la DA.

(Per una revisió sobre aquest tema consultar l'article de Sulzer, *et al.*, 2000).

1.1.4.2 El paper dels metalls i els radicals d'oxigen lliure en la formació de DA-quinones

L'oxidació de la DA es veu afavorida en presència d'ions metàl·lics com el Fe^{3+} . El Fe^{3+} actua com a acceptor d'electrons a les reaccions 1 i 3 formant-se Fe^{2+} , que en presència d' H_2O_2 , mitjançant la reacció de Fenton, pot generar radicals hidroxil:



Altres metalls com el coure i el manganès poden igualment afavorir la formació de quinones a partir de la DA.

Cal destacar que la DA s'oxida espontàniament *in vitro* en presència d'oxigen formant-se H_2O_2 , $(\text{O}_2)^\cdot$ i $(\text{OH})^\cdot$.

1.1.4.3 Enzims involucrats en la síntesi de DA-quinones

El principal enzim que intervé en la formació de DA-quinones és la tirosinasa que catalitza la conversió de tirosina a L-DOPA i la conversió d'aquesta a DA-quinona (Figura 1.5).

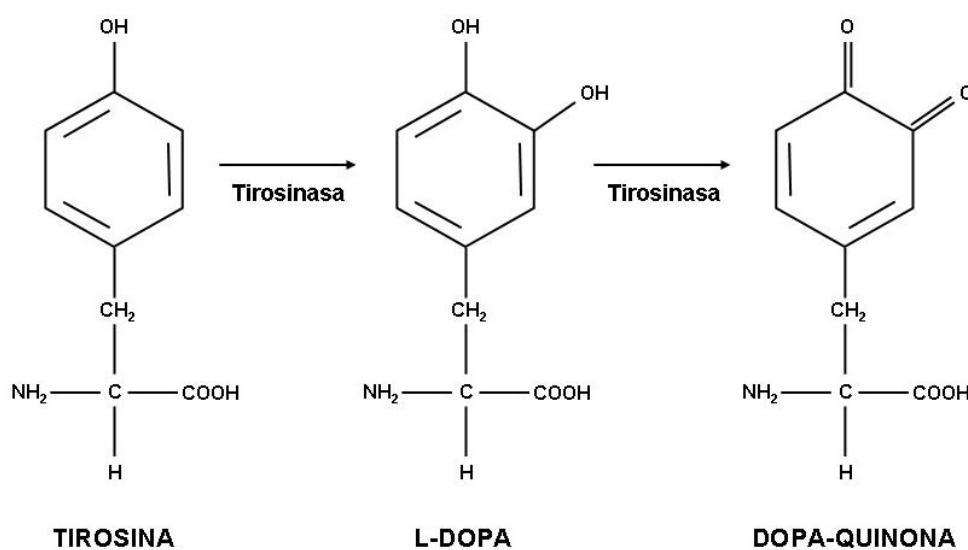


Figura 1.5. Representació de la formació de la DA-quinona mitjançant l'enzim tirosinasa.

La tirosinasa no s'ha trobat en neurones de la *substantia nigra* (Ikemoto, *et al.*, 1998) però hi ha d'altres enzims involucrats en la síntesi de DA-quinones com són la prostaglandina H sintasa i la TH. L'L-DOPA pot actuar com a substrat de la TH formant-se L-DOPA-quinona.

1.1.4.4 Derivats conjugats amb Cys

Les DA-quinones tenen la capacitat d'unir-se a Cys lliures o a proteïnes mitjançant residus de Cys. La Cys pot reaccionar amb l'anell de la DA-quinona per formar 5-S-cisteinil-DA (Figura 1.6). La 5-S-cisteinil-DA es pot oxidar generant nombrosos derivats que tenen la capacitat d'unir-se a proteïnes alterant la seva funció. Aquest procés es veu afavorit en presència de Fe^{2+}/Fe^{3+} (Shen, *et al.*, 1998).

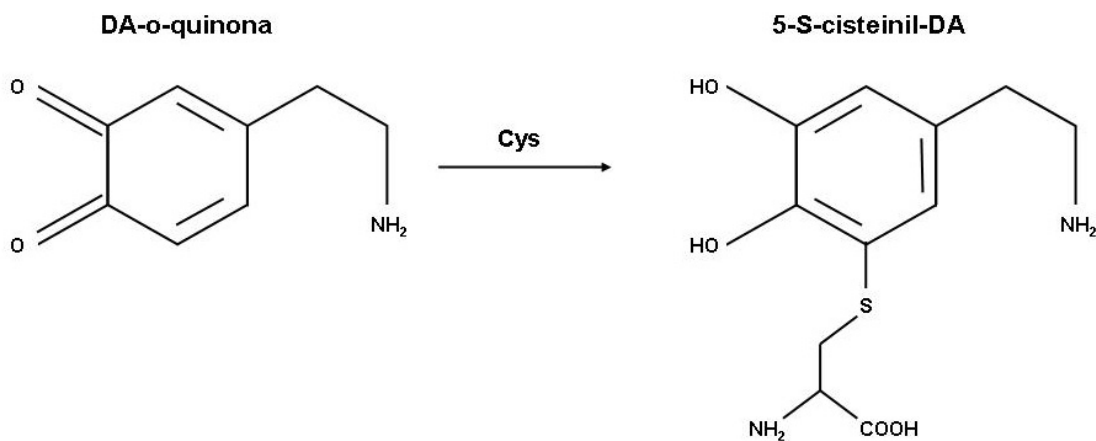


Figura 1.6. Representació de la formació de la 5-S-cisteinil-DA.

1.1.4.5 Formació de neuromelanina

La neuromelanina (NM) és un pigment de la família de les melanines. Aquest compost és el responsable del color fosc de la SNpc.

El procés de formació de la NM no està clar i es discuteix si intervindrien enzims o si seria conseqüència de l'autoxidació de la DA (Zucca, *et al.*, 2004).

S'ha proposat que la tirosinasa participaria en la formació de NM, no obstant, les persones albines que careixen d'una tirosinasa funcional, presenten una pigmentació normal de les neurones del sistema nerviós. A més a més, com s'ha comentat, aquest enzim no s'ha trobat en neurones de la *substantia nigra* (Ikemoto, *et al.*, 1998). Altres enzims que han estat proposats són la TH, la peroxidasa i la prostaglandina H sintasa. No obstant, el seu paper en la formació de la NM és molt controvertit (Zucca, *et al.*, 2004).

Per una altra banda la NM podria formar-se com a conseqüència de l'oxidació no enzimàtica de les catecolamines. A partir de l'oxidació de la DA s'ha sintetitzat DA-melanina al laboratori, no obstant, aquesta melanina presenta nombroses diferències estructurals respecte la NM humana (Double, *et al.*, 2000). En contraposició a aquest fet en uns experiments realitzats en cultiu cel·lular s'ha aconseguit sintetitzar una NM químicament igual a la humana mitjançant el tractament amb DOPA (Sulzer, *et al.*, 2000).

1.2 LA MALATIA DE PARKINSON

El PD és un dels trastorns neurodegeneratius més freqüents i es caracteritza per tremolor en repòs, bradicinèsia, rigidesa i alteracions de la postura (Hoehn, *et al.*, 1967). Les malalties que presenten aquestes quatre característiques s'agrupen amb el nom de parkinsonismes.

Normalment es distingeix entre dos tipus de PD. Aproximadament en un 10% dels casos hi ha una història familiar (Parkinsonismes genètics). En canvi, en la majoria de casos el PD és esporàdic i les causes desconegudes, per aquest motiu es parla de parkinsonisme idiopàtic.

Els principals marcadors del PD són la pèrdua de neurones dopaminèrgiques a la SNpc i la formació d'inclusions citoplasmàtiques eosinòfiles anomenades cossos de Lewy (LB, *Lewy body*) (Figura 1.7) (Duvoisin, *et al.*, 1989).

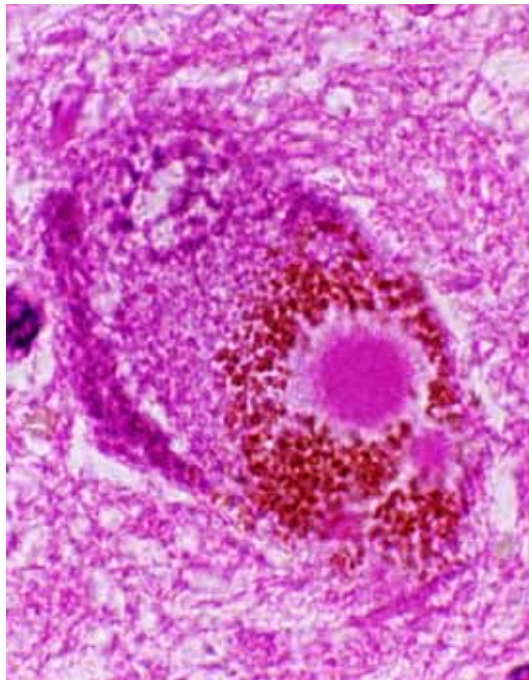


Figura 1.7. Imatge d'un cos de Lewy.

1.2.1 ETIOLOGIA

L'existència de les formes familiar i idiopàtica del PD juntament amb nombroses evidències suggereixen una etiologia multifactorial on intervindrien factors tant genètics com ambientals en els dos tipus.

1.2.1.1 Parkinsonisme induït químicament i factors ambientals

El fet que més va recolzar la hipòtesi de la participació de factors ambientals en l'etiologia del PD va ser el descobriment de que l'MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,5-tetrahidropiridina) induïa una forma aguda de parkinsonisme (Davis, *et al.*, 1979).

A part de l'MPTP s'han descrit nombrosos compostos amb la capacitat d'induir parkinsonisme, tals com el manganès (Mena, *et al.*, 1970) i determinats pesticides i herbicides com la rotenona (Tanner, 1992; Betarbet, *et al.*, 2000).

1.2.1.2 Malaltia de Parkinson familiar i els gens PARK

Un numero reduït de mutacions han estat relacionades amb casos de PD familiar. Els gens que presenten aquestes mutacions es coneixen amb el nom de PARK i fins al dia d'avui s'han descrit 13 gens, encara que només 7 o 8 tenen identificada la proteïna que codifiquen (Taula 1.1) (Actualitzada de Klein, *et al.*, 2006).

La parkina i l'UCHL1 formen part de la maquinària de degradació de proteïnes mal plegades per part del proteosoma.

La funció de PINK1 és desconeguda, no obstant, es pensa que actuaria com a quinasa a l'interior del mitocondri (Silvestri, *et al.*, 2005).

La funció de DJ-1 també és desconeguda, no obstant, pot tenir un paper protector en una situació d'estrès oxidatiu (Canet-Aviles, *et al.*, 2004).

La proteïna LRRK2 o dardarina presenta activitats quinasa i GTPasa però el seu paper és desconegut (Li, *et al.*, 2007).

Finalment HtrA2 és una proteasa mitocondrial que interactua amb PINK1 (Plun-Favreau, *et al.*, 2007).

Gen	Tipus d'herència	Localització cromosòmica	Proteïna
PARK1 (=PARK4)	Autosòmica dominant	4q	α -sinucleïna
PARK2	Autosòmica recessiva	6q	Parkina
PARK3	Autosòmica dominant	2p	?
PARK5	Autosòmica dominant	4p	UCHL1
PARK6	Autosòmica recessiva	1p	PINK1
PARK7	Autosòmica recessiva	1p	DJ-1
PARK8	Autosòmica dominant	12p-q	LRRK2
PARK9	Autosòmica recessiva	1p	?
PARK10	?	1p	?
PARK11	?	2q	?
PARK12	?	?	?
PARK13	?	2p	HtrA2

Taula 1.1. Els gens PARK.

1.2.2 L' α -SINUCLÈINA

La família de les sinucleïnes humanes esta formada per tres membres; α - β - i γ -sinucleïna (Chen, *et al.*, 1995; Spillantini, *et al.*, 1995; Lavedan, *et al.*, 1998). L' α -sinucleïna i la β -sinucleïna són abundants al sistema nerviós central, mentre que la γ -sinucleïna és abundant en el sistema nerviós perifèric (Clayton, *et al.*, 1998).

L' α -sinucleïna va ser originàriament identificada en l'òrgan elèctric del peix *Torpedo californica* (Maroteaux, *et al.*, 1988). El nom sinucleïna (*synuclein*) va ser escollit ja que la proteïna va ser trobada en sinapsis (*synapses*) i en l'embolcall nuclear (*nuclear envelope*).

El paper de l' α -sinucleïna a les malalties neurodegeneratives es va sospitar després de l'aïllament d'un fragment de la proteïna (NACP) a les plaques amiloides de malalts d'Alzheimer (Uéda, *et al.*, 1993). Posteriorment es van associar mutacions al

gen de l' α -sinucleïna amb el PD, però només en un numero reduït de famílies (Polymeropoulos, *et al.*, 1997). No obstant, el descobriment de que l' α -sinucleïna és el major component dels LB dona suport al seu rol en el PD (Spillantini, *et al.*, 1997)

L' α -sinucleïna es localitza a varies zones del cervell com el neocortex, el bulb olfatori, l'hipocamp, el nucli estriat, el tàlem i el cerebel (Iwai, *et al.*, 1995). Aquesta α -sinucleïna localitzada al cervell és una proteïna de 140 aminoàcids i d'un pes molecular de 14 kDa, codificada per un gen localitzat al cromosoma 4q21-22 (Uéda, *et al.*, 1993; Jakes, *et al.*, 1994; Campion, *et al.*, 1995; Chen, *et al.*, 1995). Tres mutacions puntuals en aquest gen han estat identificades en varies famílies amb PD autosòmic dominant. La primera és la substitució d'una Ala per una Thr en la posició 53 (A53T) (Polymeropoulos, *et al.*, 1997), la segona la substitució d'una Ala per una Pro en la posició 30 (A30P) (Kruger, *et al.*, 1998), finalment la tercera és la substitució d'un Glu per una Lys en la posició 46 (E46K) (Zarranz, *et al.*, 2004).

En condicions fisiològiques l' α -sinucleïna es troba constitutivament fosforilada, aquesta fosforilació podria ésser important en la seva funció (Okochi, *et al.*, 2000) i en la formació de fibril·les (Fujiwara, *et al.*, 2002).

1.2.2.1 Dominis

L'anàlisi de la seqüència de l' α -sinucleïna mostra 3 dominis principals:

- Domini N-terminal amfipàtic, ric en motius incomplets de la seqüència KTKEGV.
- Domini NAC, altament hidrofòbic i anàleg del NACP.
- Domini C-terminal acídic.

Els residus involucrats en l'agregació de l' α -sinucleïna es troben al domini NAC (Giasson, *et al.*, 2000).

1.2.2.2 Neuropatologia

Acumulacions d' α -sinucleïna s'han descrit en les següents patologies:

- Malaltia de Parkinson (Spillantini, *et al.*, 1997).
- Demència amb cossos de Lewy (Trojanowski, *et al.*, 1998).
- Atròfia múltiple sistèmica (Wakabayashi, *et al.*, 1998).

Pel que es parla de sinucleïnopaties per referir-se a aquestes malalties.

Encara que no sigui un paràmetre anatomopatològic característic, també es troben acumulacions d' α -sinucleïna en les següents patologies:

- Alzheimer (Uéda, *et al.*, 1993).
- Esclerosi lateral amiotròfica (Mezey, *et al.*, 1998).
- Malaltia de Pick (Takeda, *et al.*, 2000).
- Malaltia de Hallervorden-Spatz (Wakabayashi, *et al.*, 2000).

1.2.2.3 Principals interaccions

L' α -sinucleïna interacciona amb àcid fosfatídic i fosfolípids acídics presents en vesícules petites (Davidson, *et al.*, 1998).

Per la seva homologia amb la txaperona 14-3-3 s'uneix amb moltes proteïnes que s'uneixen a aquesta com ERK, BAD i PKC, i a la mateixa txaperona 14-3-3 (Ostrerova, *et al.*, 1999).

També s'ha demostrat en preparacions membranals que l' α -sinucleïna és un inhibidor de la fosfolipasa D2 (PLD2), sense quedar clar el possible paper fisiològic d'aquesta inhibició (Jenco, *et al.*, 1998).

Per un altre part s'ha vist que pot interaccionar amb proteïnes que intervenen en el transport vesicular, com la sinfilina-1 (Engelender, *et al.*, 1999), la rabfilina i la rab3a (Dalfo, *et al.*, 2004).

Interacciona amb proteïnes del citoesquelet com Tau (Jensen, *et al.*, 1999).

Respecte a la seva interacció amb proteïnes pròpies del sistema dopaminèrgic, s'ha demostrat la seva unió al DAT afavorint la recaptació de DA (Sidhu, *et al.*, 2004). També s'ha vist que l' α -sinucleïna interacciona amb la TH inhibint la seva activitat (Perez, *et al.*, 2002).

L' α -sinucleïna pot ésser ubiquïtinitzada per la parkina (Shimura, *et al.*, 2001).

Finalment l' α -sinucleïna també pot interaccionar amb la calmodulina (Lee, *et al.*, 2002).

1.2.2.4 Funcions

Com a conseqüència de les seves interaccions es postula que les funcions de l' α -sinucleïna podrien ésser:

- Regulació de la funció sinàptica i de la sinaptogènesi.
- Regulació de l'alliberament de neurotransmissors, especialment de la DA.
- Regulació de la viabilitat cel·lular.

1.2.2.5 Agregació

Ha estat descrit que l' α -sinucleïna pot agregar-se *in vitro* formant fibril·les (Hashimoto, *et al.*, 1998). Aquestes fibril·les són similars a les trobades als LB de malats de Parkinson (Conway, *et al.*, 1998).

Hi ha una sèrie de factors que acceleren la fibril·lació de l' α -sinucleïna:

- Modificacions post-traduccionals, com fosforilacions (Fujiwara, *et al.*, 2002) glicosilacions (McLean, *et al.*, 2002) i nitrosilacions (Takahashi, *et al.*, 2002) afecten a l'agregació.

- La formació d'agregats és facilitada per les formes mutants de l' α -sinucleïna (Conway, *et al.*, 1998; 2000; Narhi, *et al.*, 1999).
- La forma truncada de l' α -sinucleïna està formada pels residus 1-120 i és més propensa a formar filaments que la forma completa (Crowther, *et al.*, 1998).
- Increments en la concentració de l' α -sinucleïna afavoreixen la seva agregació (Wood, *et al.*, 1999).
- La interacció amb ions metàl·lics també afavoreix l'oligomerització (Hashimoto, *et al.*, 1999; Paik, *et al.*, 1999).
- Igualment l'estrès oxidatiu (Hashimoto, *et al.*, 1999) i tòxics com l'MPTP (Kowall, *et al.*, 2000) estimulen la seva unió.
- Finalment, les interaccions amb la proteïna β -amiloide (Paik, *et al.*, 1998) i l'apoproteïna E disparen la seva agregació (Olesen, *et al.*, 1997).

1.3 NEURODEGENERACIÓ

Si bé l'MPTP va representar en el seu moment un gran impuls per a la teoria tòxic-ambiental en l'etiologia del PD, ja que és capaç de reproduir bastant fidedignament quasi totes les característiques d'aquesta malaltia, el temps ha demostrat que el possible tòxic ambiental és difícil de trobar o no existeix. Tret de la relació epidemiològica entre alguns pesticides i herbicides o la ingestió d'aigua de pou i el PD, que podrien explicar només alguns casos concrets de parkinsonisme, si alguna toxina està darrera de la major part de casos de parkinsonisme idiopàtic, la seva existència resulta esquiva.

La principal característica de les neurones dopaminèrgiques és que tenen DA. La DA *in vitro* pot ser tòxica per si mateixa (Michel, *et al.*, 1990). Fins a quin punt també podrà ser-ho *in vivo*? Per contestar aquesta pregunta hem de tenir en compte que l'oxidació de la DA es produeix espontàniament en presència d'oxigen a pH neutre o bàsic. Es produeixen en aquesta oxidació diferents compostos potencialment tòxics, pel seu caràcter com a quinones, i es genera peròxid d'hidrogen. Com a conseqüència es poden generar espècies reactives d'oxigen o ROS (*reactive oxygen species*) (Spencer, *et al.*, 1998; Stokes, *et al.*, 1999; Li, *et al.*, 2001). La producció de ROS disminueix les capacitats antioxidants endògenes, especialment el contingut de GSH (Spencer, *et al.*, 1998). Dels productes del metabolisme de la DA, el 3,4-dihidroxifenilacetaldehid (DOPAL), producte efímer i precursor del DOPAC, per la seva reactivitat podria ser un dels causants de la neurodegeneració (Eisenhofer, *et al.*, 2004).

La relació que pugui tenir l' α -sinucleïna amb aquest procés es desconeix. L'estrès oxidatiu produït per la DA pot ésser resultat de la interacció entre l' α -sinucleïna i la DA citosòlica i veure's incrementada en presència de les formes mutades de l' α -sinucleïna (Lotharius, *et al.*, 2002; Baptista, *et al.*, 2003). De fet, l' α -sinucleïna oxidada té una major tendència a agregar-se que la forma nativa (Souza, *et al.*, 2000). A més a més, l'elevada expressió d' α -sinucleïna pot causar estrès oxidatiu per si mateixa (Hsu, *et al.*, 2000).

Una hipòtesi actual basada en els estudis amb MPTP i en fets experimentals observats a malalts de Parkinson, considera que alteracions en l'activitat del complex I mitocondrial podrien estar relacionades amb la malaltia (Greenmayre, *et al.*, 2001).

Està descrit que la rotenona (pesticida inhibidor del complex I en el lloc d'interacció amb el NADH) pot produir degeneració de la *substantia nigra* i acumulació d' α -sinucleïna (Betarbet, *et al.*, 2000). Una reducció en l'activitat del complex I mitocondrial, com la produïda per la rotenona i el MPTP, incrementa la producció de ROS (Cassarino, *et al.*, 1997). A més, la rotenona, conjuntament amb metabòlits de la DA, potencia la mort cel·lular de les cèl·lules PC12 (Kristal, *et al.*, 2001).

També cal destacar que cervells de malalts de Parkinson presenten evidències d'apoptosi, incloent-hi fragmentació nuclear i activació de caspases (Tatton, *et al.*, 1998; Hartmann, *et al.*, 2000). No obstant, el paper de l'apoptosi en la neurodegeneració del PD és controvertit i no ha estat demostrat de forma conclusiva (Burke, *et al.*, 1998).

1.3.1 TOXICITAT DE LA DOPAMINA

Els efectes tòxics de la DA han estat demostrats *in vivo* (Filloux, *et al.*, 1993; Ben-Shachar, *et al.*, 1995) i en cultius primaris dopaminèrgics (Michel, *et al.*, 1990), corticals (Hoyt, *et al.*, 1997) i estriatals (McLaughlin, *et al.*, 1998). La fragmentació del DNA observada després del tractament amb DA en cultius primaris suggereix la implicació d'un procés apoptòtic lligat a la mort cel·lular. L'apoptosi induïda per DA també ha estat descrita en neurones simpàtiques de pollastre (Ziv, *et al.*, 1994), en cèl·lules PC12 diferenciades (Offen *et al.*, 1997) i diferents línies de neuroblastoma (Simantov, *et al.*, 1996; Zhang, *et al.*, 1998; Junn, *et al.*, 2001). No obstant, sembla ser que el dany causat per la DA no seria exclusivament apoptòtic i altres formes de mort cel·lular podrien estar implicades en aquest procés (Simantov, *et al.*, 1996; Hoyt, *et al.*, 1997; Junn, *et al.*, 2001; Gómez-Santos, *et al.*, 2003).

1.3.2 ESTRÈS CEL·LULAR

Distingirem l'estrès oxidatiu i l'estrès del reticle endoplasmàtic com a causes interconnectades que poden dur a la mort cel·lular.

1.3.2.1 ESTRÈS OXIDATIU

Un gran nombre d'estudis relacionen alteracions redox amb el PD, no obstant es desconeix si l'estrès oxidatiu lligat al PD és un esdeveniment primari o una conseqüència d'altres factors patològics. A pesar d'això, no hi ha dubte que les ROS i/o les espècies reactives de nitrogen (RNS, *reactive nitrogen species*) tindrien un paper important en la neurodegeneració observada en aquesta malaltia.

(Per una revisió sobre aquest tema consultar l'article de Jenner, 2003).

1.3.2.1.1 Radicals lliures

Un radical lliure és una espècie que conté un o més electrons desaparellats. Un gran nombre de radicals lliures són produïts als organismes vius com l'àtom d'hidrogen (H[·]). Els principals radicals lliures relacionats amb el PD són les ROS i les RNS. A més a més, els metalls de transició com el ferro i el coure poden ésser inclosos en aquesta definició, ja que tenen una bona capacitat de desprendre's d'electrons, resultant bons catalitzadors de les reaccions que involucren radicals lliures.

1.3.2.1.2 Espècies reactives d'oxigen

Les principals ROS a humans són l'H₂O₂, el (O₂)^{·-} i el (OH)[·].

Un gran nombre d'enzims estan involucrats en la producció d'aquestes ROS. La xantina oxidasa, l'aldehid oxidasa i en general totes les monooxigenases poden incrementar la producció d'H₂O₂ i (O₂)^{·-}. Durant el metabolisme de les catecolamines per part de les MAOs i pel procés d'inactivació de l'(O₂)^{·-} també es forma H₂O₂.

L'anió superòxid (O₂)^{·-} és produït a les membranes microsomals durant el procés de detoxicació de compostos tòxics i l'oxidació d'àcids grassos. A més a més, l'(O₂)^{·-} es forma durant l'activitat de la cadena mitocondrial de transport d'electrons. Depenent de la disponibilitat de substrats i cofactors, l'(O₂)^{·-} pot oxidar hidroquinones a radicals semiquinònics i produir H₂O₂.

Si l' H_2O_2 no és eliminat enzimàticament es produeixen $(\text{OH})^\cdot$. Aquest fenomen es veu afavorit per compostos que tenen la capacitat de donar electrons com el NADPH o el glutatió reduït, en presència de metalls de transició com el Fe^{2+} .

1.3.2.1.3 Espècies reactives de nitrogen

Les principals RNS a humans són l'òxid nítric (NO) i el peroxonitrit (ONOO^-).

El NO juga un paper molt important com a senyalitzador en el sistema nerviós i té la capacitat d'inhibir nombrosos enzims, com els complexos I i II de la cadena de transport d'electrons mitocondrial. El (ONOO^-) es forma en presència de (O_2) $^\cdot$ i NO. Aquestes espècies contribueixen a l'estrès oxidatiu, reaccionant amb proteïnes i lípids, que, com a conseqüència d'aquest fet, veuen alterada la seva funció.

1.3.2.1.4 Factors que contribueixen a la generació d'estrès oxidatiu per part de la dopamina

- Dopamina: L'auto-oxidació de la DA afavoreix la producció de dopaquinones i (O_2) $^\cdot$. A més a més, la metabolització de la DA per part de la MAO genera H_2O_2 .
- Neuromelanina: No està clar el paper de la NM en la generació d'estrès oxidatiu, no obstant, sembla que en determinades circumstàncies, com en presència d'un excés de ferro, podria afavorir la formació de ROS (Double, *et al.*, 2002).
- Metalls de transició: Els metalls de transició com el ferro, el coure i el manganès són essencials, per exemple, per a la síntesi dels holoenzims, transport d'oxigen i un gran nombre de reaccions d'oxidació-reducció. No obstant, per la seva capacitat de tenir diferents estats d'oxidació i catalitzar reaccions redox són també potencialment perillosos, ja que poden afavorir l'autooxidació de determinats compostos com la DA o la conversió d' H_2O_2 a $(\text{OH})^\cdot$.

1.3.2.1.5 Disfunció mitocondrial

El lloc de producció de ROS al mitocondri més relacionat amb el PD és el complex I. Està descrit que la *substantia nigra* de malalts de Parkinson presenta una reducció del 30% en l'activitat d'aquest complex (Mizuno, *et al.*, 1989). Les conseqüències d'alteracions al complex I són: increment en la producció de ROS, disminució de la producció d'ATP, inhibició del proteosoma, acumulació de proteïnes oxidades i, en determinades circumstàncies, mort cel·lular.

La causa de la inhibició del complex I en el PD és desconeguda. Aquesta inhibició podria ser conseqüència de RNS (Carreras, *et al.*, 2004) o de toxines tant endògenes com exògenes.

1.3.2.1.6 Conseqüències de l'estrès oxidatiu

Les principals conseqüències de l'estrès oxidatiu són:

- Peroxidació de lípids
- Oxidació de proteïnes
- Dany al DNA

Aquestes alteracions provoquen canvis funcionals i estructurals en les cèl·lules i poden conduir a la mort cel·lular.

1.3.2.1.7 Factors que disminueixen l'estrès oxidatiu

L'estrès oxidatiu pot ésser protegit mitjançant l'acció de determinats enzims com la superòxid dismutasa (SOD), la glutatió peroxidasa o la catalasa. Reaccions no enzimàtiques com les catalitzades per les vitamines C i E, el glutatió reduït, la Cys o el coenzim Q també tenen un paper protector.

1.3.2.2 ESTRÈS RETICULAR

El reticle endoplasmàtic (RE) és un complex membranós intracel·lular que participa en la síntesi i maduració de les proteïnes. Les proteïnes a mesura que es sintetitzen són plegades per unes proteïnes anomenades txaperones i transportades a l'aparell de Golgi. Les proteïnes que no han estat plegades o que s'han plegat malament són retingudes al RE, retro-translocades al citoplasma per la maquinària de degradació associada al RE (ERAD, *Endoplasmic Reticulum-associated degradation*) i finalment degradades pel proteosoma.

Quan la quantitat de proteïnes sintetitzades excedeix la capacitat de la maquinària de plegament i degradació, les proteïnes no plegades o mal plegades (UP, *unfolded proteins*) s'acumulen al RE.

Les UP exposen aminoàcids hidrofòbics que normalment estan localitzats a l'interior de la proteïna i tendeixen a formar agregats. Aquests agregats són tòxics per la cèl·lula i poden induir mort cel·lular i causar diferents malalties. Per contrarestar aquesta situació d'estrès reticular les cèl·lules han desenvolupat una sèrie de mecanismes coneguts com a resposta a l'estrès reticular o resposta a les proteïnes no plegades (UPR, *unfolded protein response*).

Aquesta resposta consisteix bàsicament en quatre mecanismes:

- Disminució de la síntesi de proteïnes.
- Increment de la síntesi de txaperones.
- Increment de l'ERAD.
- Inducció de mort cel·lular.

1.3.2.2.1 Compostos inductors d'estrès reticular

Els Compostos inductors d'estrès reticular es poden classificar en tres grups:

Al primer grup pertanyen els compostos que inhibeixen la glicosilació, com la tunicamicina. Moltes de les proteïnes sintetitzades al RE són N-glicosilades i aquesta N-glicosilació és sovint essencial per al plegament de les proteïnes. Per aquest fet els inhibidors de la glicosilació tenen la capacitat d'induir estrès reticular.

El segon grup estaria format pels compostos que interfereixen en el metabolisme del calci com la taspigargina. La concentració de calci a l'interior del reticle és elevada i les txaperones poden necessitar d'aquest ió per realitzar la seva funció. Per tant, alteracions en la homeòstasi del calci poden produir estrès reticular.

Finalment en el tercer grup trobem els agents reductors com el 2-mercaptoetanol. La formació de ponts disulfur és important en el plegament de les proteïnes i, per tant, els agents reductors poden donar lloc a estrès reticular.

També s'ha observat que la hipòxia indueix estrès reticular però el mecanisme encara és desconegut (Ikeda, *et al.*, 1997).

1.3.2.2 Txaperones del reticle endoplasmàtic

Les txaperones del reticle endoplasmàtic són proteïnes responsables del plegament de les proteïnes que es sintetitzen. La més universal al RE de mamífers és la proteïna *binding protein* o *glucose-regulated protein 78* (BiP o GRP78).

1.3.2.3 Maquinària de degradació de proteïnes associada al reticle endoplasmàtic

Les UP són atrapades per la maquinària ERAD i transportades al citoplasma, on seran ubiquïtinitzades i eliminades pel proteosoma (Jarosch, *et al.*, 2003). Aquest procés es pot dividir en 4 fases:

1) Reconeixement: En aquest procés intervenen les proteïnes EDEM (*ER degradation-enhancing α -mannosidase-like protein*) que discriminen les proteïnes plegades de les no plegades (Hosokawa, *et al.*, 2001). L'OS9 (Osteosarcoma 9) i la XTP3B (*XTP3-transactivated gene B*) són altres proteïnes de l'ERAD que participen al reconeixement (Buschhorn, *et al.*, 2004).

2) Retro-translocació: Transport del RE al citosol. La màquina de retro-translocació encara no ha estat identificada però la proteïnes derlin-1 (Ye, *et al.*, 2004) i p97/cdc48/VCP (Ye, *et al.*, 2001) tindrien un paper fonamental.

3) Ubiquïtinització: Les proteïnes retro-translocades són ubiquïtinitzades pel sistema E1-E2-E3. L'ubiquïtina es conjugada a l'enzim E2 per l'enzim E1 i és transferida als substrats de l'ERAD per l'enzim E3.

4) Degradació: Finalment les proteïnes ubiquïtinitzades són degradades pel proteosoma.

1.3.2.2.4 Vies de senyalització

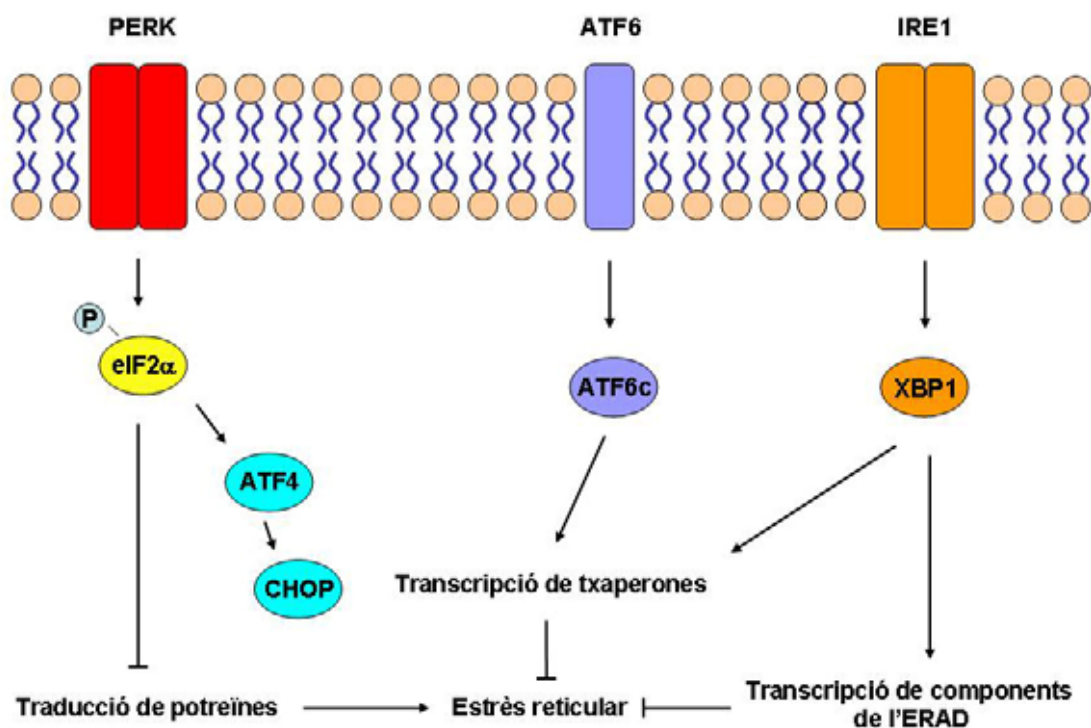


Figura 1.8. Vies d'activació de la resposta a estrès reticular (Adaptat de Marciniak, *et al.*, 2006).

Via de PERK

PERK és una proteïna transmembrana localitzada al RE que detecta l'acumulació de proteïnes no plegades al lumen del RE (Harding, *et al.*, 1999). La porció luminal de PERK està involucrada en la detecció de les proteïnes no plegades, en canvi la porció citoplasmàtica conté un domini quinasa.

En absència d'estrès reticular BiP s'uneix al domini luminal de PERK i la manté inactiva. Quan es produeix una situació d'estrès reticular BiP es separa de PERK i aquesta s'activa per oligomerització i trans-fosforilació (Bertolotti, *et al.*, 2000). L'activació de PERK estimula la fosforilació d'eIF2 α (*α -subunit of eukaryotic translational initiation factor 2*), disminuint la traducció de proteïnes. L'atenuació d'eIF2 α estimula l'expressió i síntesi d'ATF4 (*activating transcription factor 4*) per un mecanisme independent d'eIF2 α (Harding, *et al.*, 2000). Entre les dianes d'ATF4 trobem CHOP (*C/EBP homology protein*), també anomenada GADD153 (*growth-arrest DNA damage-inducible 153*).

Via d'ATF6

ATF6 és un altra proteïna transmembrana situada al RE (Yoshida, *et al.*, 1998). El domini intraluminal detecta les proteïnes no plegades. El domini citoplasmàtic, en canvi, presenta un domini d'unió al DNA del tipus cremallera de leucines i es capaç d'activar la transcripció de determinats gens.

En absència d'estrès reticular BiP es troba unida a ATF6 inhibint la seva translocació cap a l'aparell de Golgi (Shen, *et al.*, 2002). En resposta a l'acumulació de proteïnes no plegades BiP es dissocia d'ATF6. Aquest es transloca a l'aparell de Golgi per transport vesicular, on és tallat per unes proteasas (S1P i S2P). La porció citoplasmàtica resultant [pATF6(N)] es transloca cap al nucli, on s'uneix a una seqüència coneguda amb el nom d'element de resposta a estrès del RE (ERSE, *ER stress response element*) i activa la transcripció de gens de txaperones com BiP i calreticulina.

Via d'IRE1

IRE1 (*inositol requirement 1*) és el tercer sensor molecular situat a la membrana del RE (Wang, *et al.*, 1998). Hi ha dos gens per a IRE1, *Ire1 α* i *Ire1 β* . El domini intraluminal també és un sensor de proteïnes no plegades. El domini citoplasmàtic presenta un domini quinasa i un altre RNasa. Normalment BiP es troba unida al domini intraluminal i es separa en resposta a l'estrès reticular, afavorint l'activació d'IRE1 per dimerització i transfosforilació (Bertolotti, *et al.*, 2000).

Quan IRE1 α és actiu converteix el pre-mRNA de XBP1 (*x-box binding protein 1*) a la seva forma madura de mRNA mitjançant *splicing* no convencional (Calfon, *et al.*, 2002). La proteïna XBP1 estimula la transcripció de components de l'ERAD (Kaneko, *et al.*, 2003) i de txaperones com BiP (Lee, *et al.*, 2003).

IRE1 β s'expressa en cèl·lules epitelials del tracte intestinal i també participaria en la senyalització de l'estrès en el RE (Bertolotti, *et al.*, 2001).

1.3.2.2.5 Estrès reticular i malaltia de Parkinson

L'anàlisi de pacients amb la forma familiar del PD ha revelat l'existència de diversos gens vinculats amb la malaltia (Douglas, *et al.*, 2007). La parkina és una de les ubiquitina ligases (E3) involucrades a l'ERAD (Shimura, *et al.*, 2000). S'ha observat que l'expressió de parkina és incrementada per l'estrès al RE i que les cèl·lules neuronals que sobreexpressen la parkina són més resistents a l'estrès al RE (Imai, *et al.*, 2000). També ha estat descrit que l'UCH-L1 ubiquitinitza proteïnes no plegades i podria estar involucrada en l'ERAD (Liu, *et al.*, 2002).

Aquestes observacions suggereixen que l'estrès reticular pot tenir un paper important al PD. A més a més, s'ha observat que compostos que mimetitzen els efectes del PD com la 6-hidroxidopamina (6-OHDA) indueixen estrès reticular en cèl·lules neuronals (Holtz, *et al.*, 2003).

1.3.3 MORT CEL·LULAR

Històricament s'han descrit tres tipus de mort cel·lular en les cèl·lules de mamífers seguint criteris morfològics (Figura 1.9):

- Tipus I: Aquest tipus es coneix amb el nom d'**apoptosi** i està definit per canvis característics en la morfologia nuclear, com la condensació (picnosi) i la fragmentació de la cromatina (cariorrexí); petits canvis o canvis no ultraestructurals en els orgànuls citoplasmàtics; aparició de protuberàncies a la membrana plasmàtica (*blebbing*) i la formació de cossos apoptòtics que contenen material nuclear i/o citoplasmàtic. Tots aquests canvis es produeixen abans de la pèrdua de la integritat de la membrana plasmàtica.

- Tipus II: Conegut com **autofàgia**, es caracteritza per la presència d'unes estructures de doble membrana, anomenades vesícules autofàgiques, en el citoplasma. Avui en dia encara està en discussió si l'autofàgia és causa directa de la mort cel·lular, per això, encara que el terme mort cel·lular autofàgica fa pensar que la cèl·lula està morint per autofàgia, en realitat aquest terme simplement descriu mort cel·lular amb autofàgia.

- Tipus III: Caracteritzat per la pèrdua de la integritat de la membrana plasmàtica i inflament (*swelling*) dels orgànuls citoplasmàtics, especialment dels mitocondris. Aquest tipus de mort es coneix amb el nom de **necrosi**.

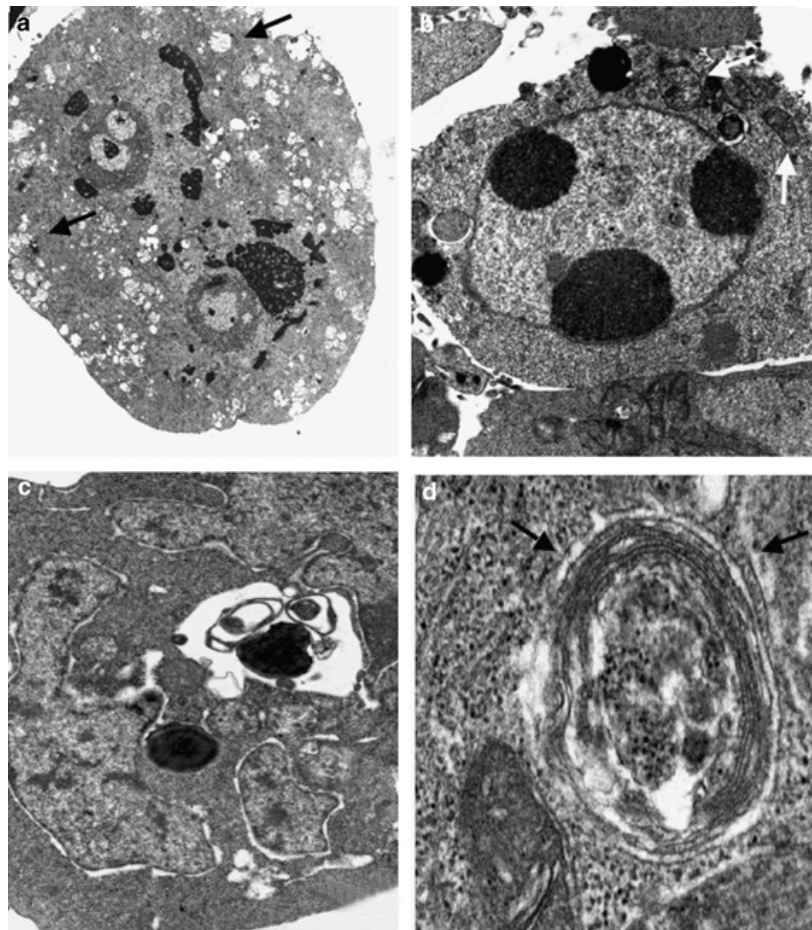


Figura 1.9. Visualització dels diferents tipus de mort cel·lular per microscòpia electrònica. (a) Necrosi d'una cèl·lula epitelial després d'un estrès oxidatiu. (b) Apoptosi d'una cèl·lula epitelial induïda per radiació. (c i d) Autofàgia d'una cèl·lula epitelial com a conseqüència del tractament amb tamoxifè (Kroemer, *et al.*, 2005).

A part d'aquests fenotipus de mort cel·lular s'han descrit formes intermèdies o que no coincideixen del tot amb alguna de les anteriors, de manera que s'utilitzen els termes de paraptosi, oncosi, anoikis i catàstrofe mitòtica (Broker, *et al.*, 2005; Kroemer, *et al.*, 2005).

1.3.3.1 APOPTOSI

El terme apoptosi va ser introduït per Kerr, *et al.*, al 1972 per descriure un procés altament regulat de mort cel·lular programada amb un paper molt important en el desenvolupament i homeòstasi cel·lular. No obstant, l'apoptosi també està relacionada amb un gran número de patologies.

1.3.3.1.1 CARACTERÍSTIQUES MORFOLÒGIQUES I BIOQUÍMIQUES

L'apoptosi produeix una sèrie de canvis morfològics i bioquímics a la cèl·lula que tenen lloc de forma ordenada i estan altament regulats.

A mesura que el procés apoptòtic avança, la morfologia cel·lular canvia. La cromatina es condensa i el nucli es fa més petit. El volum cel·lular també disminueix i apareixen protuberàncies a la membrana plasmàtica. En les etapes finals el nucli i el citoplasma es fragmenten i es formen unes petites partícules envoltades de membrana que reben el nom de cossos apoptòtics. Finalment els cossos apoptòtics són eliminats sense causar una reacció inflamatòria.

Nombrosos marcadors bioquímics de l'apoptosi han estat identificats. Durant el procés apoptòtic es produeix la fragmentació del DNA, l'activació d'unes proteases conegudes amb el nom de caspases i l'externalització a la superfície cel·lular de residus de fosfatidilserina.

1.3.3.1.2 MAQUINÀRIA DEL PROCÉS APOPTÒTIC: LES CASPASES

Molts dels canvis descrits per Kerr, *et al.*, són causats per una sèrie de proteïnes que pertanyen al grup de les Cys-proteases, caracteritzat per la presència d'una Cys

que participa en el trencament d'altres proteïnes. En el cas de les caspases el tall es produeix a nivell d'un residu d'Asp.

La família de les caspases està formada per 14 membres, 11 dels quals han estat trobats en humans (Zimmermann, *et al.*, 2001). Estudis filogenètics han permès dividir aquesta família en dos grups, l'inflamatori i l'apoptòtic. El primer grup participa en la maduració de citoquines pro-inflamatòries, en canvi el segon grup és el que participa en el procés apoptòtic. Per tant, les caspases no només estan relacionades amb el procés apoptòtic, si no que també poden estar relacionades amb altres processos com la proliferació i el control del cicle cel·lular, la diferenciació i l'activació d'NF- κ B entre altres (Lamkanfi, *et al.*, 2006).

S'han descrit fins a 280 possibles substrats de les caspases, com PARP-1 (*Poly (ADP-ribose) polymerase-1*), que poden estar involucrats en la síntesi i reparació del DNA, en la transducció de senyals o formar part de l'estructura del citoesquelet entre altres (Fischer, *et al.*, 2003).

1.3.3.1.3 ESTRUCTURA DE LES CASPASES

Les caspases comparteixen similituds en la seqüència d'aminoàcids i l'estructura (Nicholson, *et al.*, 1997). Són sintetitzades en forma de proenzims (zimògens) inactius que contenen tres dominis: un prodomini N-terminal, una subunitat gran amb l'activitat Cys-proteasa i una subunitat petita a l'extrem C-terminal.

La longitud i la seqüència del prodomini N-terminal varia entre les diferents caspases. Aquest prodomini integra els senyals apoptòtic o pro-inflamatori i pot contenir seqüències que afavoreixen la seva interacció amb molècules activadores: CARD (*caspase recruitment domain*) i DED (*death effector domain*) (Hofmann, *et al.*, 1997; Ashkenazi, *et al.*, 1998).

Els 3 dominis estan separats per llocs de tall per les caspases i, per tant, les caspases són activades mitjançant dos talls. El primer tall separa les subunitats gran i petita, i el segon tall allibera el prodomini N-terminal. Les caspases actives estan formades per un tetramer de dos subunitats grans i dos subunitats petites (Wolf, *et al.*, 1999).

La presència d'aquests llocs de tall és consistent amb l'habilitat de les caspases d'autoactivar-se o ésser activades per altres caspases. Per tant, tenim dos tipus de caspases (Nicholson, *et al.*, 1997):

- Caspases iniciadores: 2, 8, 9 i 10.
- Caspases executores: 3, 6 i 7.

Les caspases iniciadores s'activen de forma cooperativa interaccionant amb proteïnes adaptadores. En canvi les caspases executores són activades per les iniciadores.

1.3.3.1.4 REGULACIÓ DE LES CASPASES

Les cèl·lules presenten inhibidors naturals de les caspases que es coneixen amb el nom d'IAPs (*inhibitors of apoptosis proteins*). Aquests inhibidors inicialment es van descobrir a baculovirus. Posteriorment es van identificar a mamífers diferents IAPs com XIAP, HIAP1, HIAP2 i survivina entre altres (Liston, *et al.*, 1996; Roy, *et al.*, 1997; Deveraux, *et al.*, 1997; Ambrosini, *et al.*, 1997).

1.3.3.1.5 VIES D'ACTIVACIÓ DE LES CASPASES

Hi ha dues vies principals d'activació de les caspases depenent de l'esdeveniment que inicia l'activació d'aquestes. Una necessita la participació del mitocondri (Via intrínseca), l'altra involucra receptors de mort, com el receptor de TNF α (Via extrínseca).

1.3.3.1.5.1 La via mitocondrial de l'apoptosi: Via intrínseca

La via intrínseca pot ésser activada per agressions cel·lulars com el dany al DNA o la hipòxia, i està associada a la regulació per part de les proteïnes de la família de BCL-2 que actuen a nivell de mitocondri, regulant la permeabilització de la membrana mitocondrial externa (MOMP, *mitochondrial outer membrane permeabilization*). La MOMP té lloc mitjançant factors proapoptòtics de la família de BCL-2 com BAX i BAK. Com a conseqüència el citocrom C és alliberat de l'espai intermembranal, afavorint

l'oligomerització d'Apaf-1 i la formació de l'apoptosoma (Matapurkar, *et al.*, 2006). L'apoptosoma està format pel citocrom C, Apaf-1 i la procaspasa 9 i indueix l'activació de la caspasa 9 que activa la procaspasa 3 a caspasa 3 (Acehan, *et al.*, 2002).

Del mitocondri s'alliberen altres factors com les proteïnes Smac/DIABLO (Du, *et al.*, 2000; Verhagen, *et al.*, 2000) i AIF (*apoptosis inducing factor*) (Lorenzo, *et al.*, 1999). Smac/DIABLO afavoreix l'apoptosi inhibint les IAPs, en canvi, AIF indueix mort cel·lular independent de caspases.

1.3.3.1.5.2 Regulació de la via mitocondrial de l'apoptosi: La família BCL-2

El fet de que una cèl·lula decideixi morir o sobreviure està determinat en gran part per la família de proteïnes BCL-2 que conté tant membres proapoptòtics com antiapoptòtics (Breckenridge, *et al.*, 2004). Aquesta família està caracteritzada per la presència d'almenys un domini BH (*BCL-2 homology*) dels 4 possibles (BH1, BH2, BH3 i BH4). Aquests dominis permeten la interacció entre els diferents membres de la família.

La família de BCL-2 normalment es subdivideix en 3 subfamílies segons la seva funció i el número de dominis BH (Danial, *et al.*, 2004).

- Membres antiapoptòtics (*BCL-2 like*): BCL-2 és el membre més característic d'aquesta família. Juntament amb d'altres membres com BCL-X_L, BCL-W, BOO/DIVA/BCL-B, MCL-1 o BFL-1/A1 protegeixen les cèl·lules d'agressions. Aquesta subfamília presenta dominis BH conservats.

- Membres proapoptòtics multidomini (*BAX like*): Dins d'aquest grup trobem BAX, BAK, BOK/MTD, BCL-G_L i BCL-X_S. Tot ells presenten homologia en els dominis BH1, BH2 i BH3.

- Membres proapoptòtics d'un únic domini (*BH3-only*): Aquesta subfamília està caracteritzada per un únic domini BH conservat, el BH3, i ha estat subdividida en dos grups segons la funció que fan (Kim, *et al.*, 2006). Els *BH3-only* activadors, BIM/BOD, tBID i PUMA actuarien activant directament els membres proapoptòtics BAX i BAK. En canvi els *BH3-only* sensibilitzadors inhibirien els membres antiapoptòtics, en aquest

grup trobem BAD, BCL-G_s, BIK/NBK/BLK, BNIP3L/NIX, BNIP3/NIP3, BMF, HRK/DP5, NOXA i MCL-1_s.

1.3.3.1.5.3 Apoptosi induïda per receptors de mort: Via extrínseca

La via extrínseca s'inicia com a conseqüència de la unió d'un lligand extracel·lular, com TNF α , FasL/CD95L, TWEAK o TRAIL a un receptor de mort (TNFR1, Fas/CD95, DR3/Apo2 i DR4/5 respectivament). Els receptors de mort es caracteritzen per la presència d'un domini de mort (DD, *death domain*) (Zimmermann, *et al.*, 2001).

Quan FasL s'uneix a Fas es produeix el reclutament de FADD mitjançant el DD (Ashkenazi, *et al.*, 1998). FADD conté un domini efector de mort (DED, *death effector domain*) que recluta la procaspasa 8 (en humans també pot ésser la procaspasa 10) i es forma el DISC (*Death-inducing signaling complex*). L'alta concentració de procaspasa al DISC estimula la seva activació per auto-proteòlisis i es desencadena la cascada apoptòtica d'activació de les caspases.

Perquè es produeixi una activació completa de les caspases efectores és necessària la inhibició de les IAPs. Amb aquest objectiu la caspasa 8 talla BID i la seva forma proteolitzada, tBID, indueix la sortida de factors mitocondrials proapoptòtics com Smac/DIABLO i el citocrom C (Yin, 2006).

c-FLIP pot bloquejar l'apoptosi induïda per Fas desplaçant la procaspasa 8 del DISC (Irmelm, *et al.*, 1997).

DR3 també s'uneix a FADD (Chinnaiyan, *et al.*, 1996). En canvi la senyalització d'apoptosi mitjançant TRAIL pot tenir lloc en absència de FADD (Yeh, *et al.*, 1998), encara que sembla que el receptor també s'uneix a aquest (Schneider, *et al.*, 1997).

La senyalització per part de TNFR1 és molt més complexa i requereix d'un altre adaptador, TRADD, que recluta a FADD (Zimmermann, *et al.*, 2001).

1.3.3.1.6. p53

Com a conseqüència d'un estrès cel·lular p53 pateix una sèrie de modificacions post-traduccionals que afavoreixen la seva estabilització i acumulació a nucli i citoplasma. En el nucli, p53 regula directament l'expressió de nombrosos gens proapoptòtics, com PUMA, Noxa, BAX i BID. En canvi, en el citoplasma p53 es pot unir a BCL-2 i BCL-X_L, quedant les proteïnes pro-apoptòtiques lliures, o bé, pot activar l'expressió de BAX i BAK (Chipuk, *et al.*, 2006).

Les modificacions post-traduccionals poden ser fosforilacions o acetilacions. El paper d'aquestes modificacions en l'activació i estabilització de p53 és controvertit, però sembla servir per estabilitzar p53 (Xu, *et al.*, 2004).

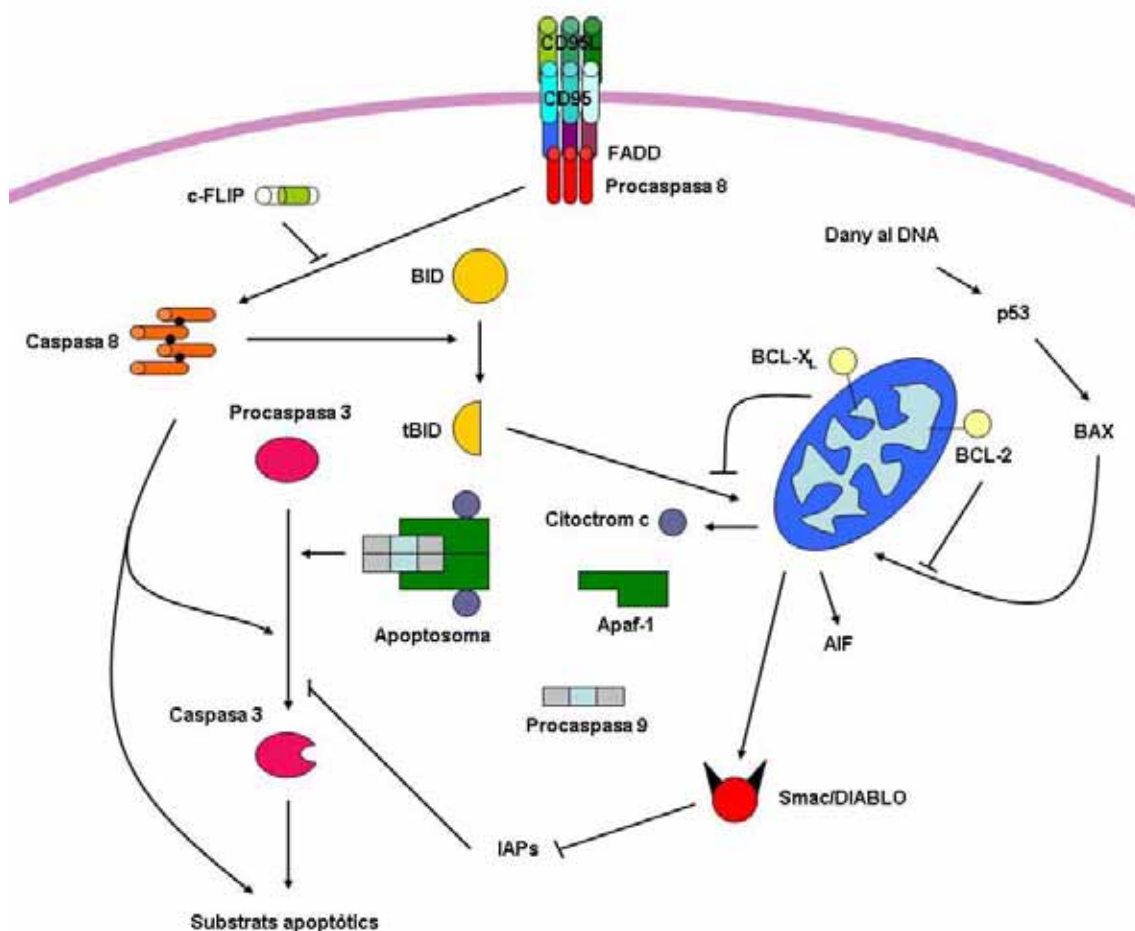


Figura 1.10. Esquema simplificat de la maquinària apoptòtica (Adaptat de Hengartner, 2000).

1.3.3.2 AUTOFÀGIA

Tal com la paraula indica, és un procediment pel que la cèl·lula passa a autodigerir parts de sí mateixa, ja sigui com a resposta a la manca de nutrients o com a resposta a un procés tòxic.

1.3.3.2.1 SISTEMES PROTEOLÍTICS

Pel desenvolupament i creixement d'una cèl·lula és necessari un equilibri entre la síntesi i la degradació de proteïnes i orgànuls. Per realitzar aquesta funció, les cèl·lules eucariotes han desenvolupat dues principals vies de degradació de proteïnes intracel·lulars, el proteosoma i l'autofàgia (Figura 1.11).

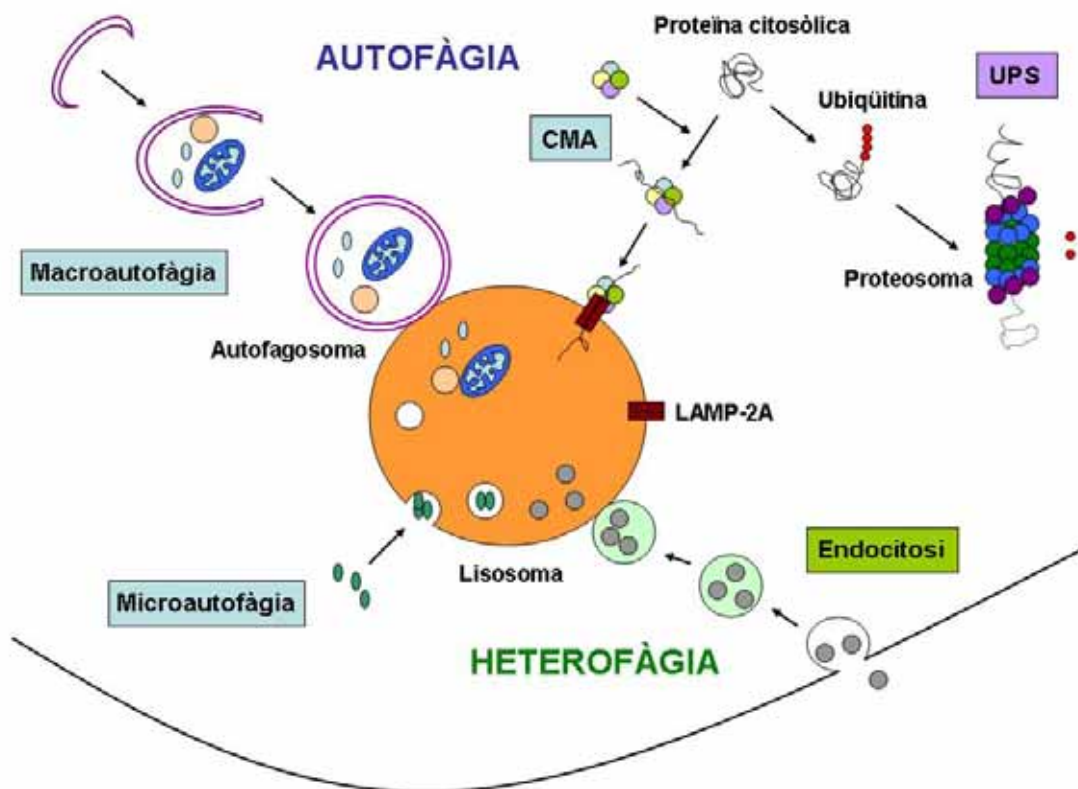


Figura 1.11. Vies de degradació de proteïnes a mamífers. Les proteïnes poden ser transportades al lisosoma des del medi extracel·lular (heterofàgia) o des de l'interior cel·lular (autofàgia). La via heterofàgica més estudiada és l'endocitosis. El proteosoma (UPS, *Ubiquitin proteasome system*) és l'altre principal via de degradació de proteïnes a l'interior cel·lular (Adaptat de Martínez-Vicente, *et al.*, 2007).

L'autofàgia és responsable de la degradació de proteïnes de vida llarga i d'òrgànuls, en canvi el proteosoma degrada de forma específica proteïnes de vida curta que han estat marcades amb ubiquitina.

Hi ha tres tipus principals d'autofàgia. L'autofàgia mediada per txaperones (CMA, *chaperone-mediated autophagy*) és responsable de la degradació de proteïnes citosòliques que contenen una determinada seqüència d'aminoàcids. En aquest procés intervé la proteïna lisosomal LAMP-2A. Els altres dos tipus d'autofàgia són la macroautofàgia i la microautofàgia. La microautofàgia involucra el segrest directe de citoplasma a la superfície lisosomal, en canvi la macroautofàgia implica el segrest de citoplasma a l'interior d'una vesícula autofàgica o autofagosoma i la posterior fusió d'aquesta amb un lisosoma. Normalment quan es parla d'autofàgia a la literatura es fa referència a la macroautofàgia, cal comentar que en aquesta tesi es fa el mateix.

La via del proteosoma (Figura 1.12) (Hochstrasser, 1995) consta de nombrosos components. El primer és l'ubiquitina, un polipèptid de 76 aminoàcids que es troba a totes les cèl·lules eucariotes.

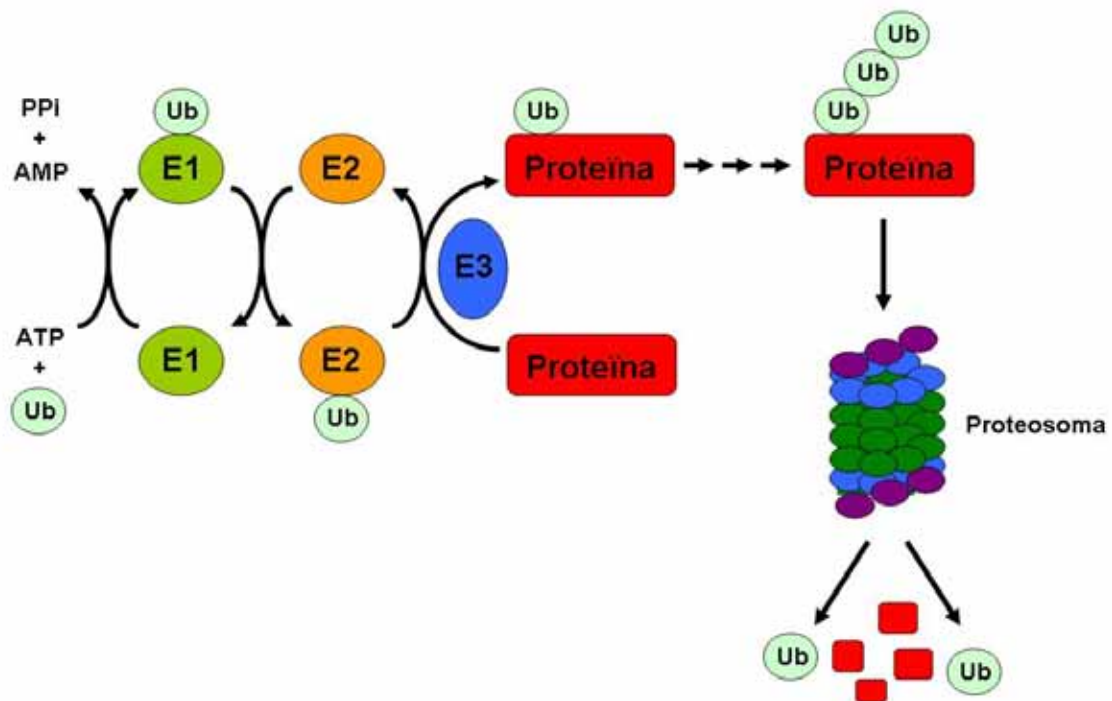


Figura 1.12. La via del proteosoma (Adaptat de Mani, *et al.*, 2005).

L'ubiquitina és activada i conjugada a la proteïna diana mitjançant tres enzims que actuen seqüencialment: L'ubiquitina és conjugada a l'enzim E2 (enzim conjugador de la ubiquitina) per l'enzim E1 (enzim activador de la ubiquitina) i transferida a la proteïna diana per l'enzim E3 (enzim ubiquitina lligasa).

Múltiples ubiquitines són unides irreversiblement a la proteïna diana que és degradada pel complex 26S del proteosoma. Durant la degradació de la proteïna les ubiquitines són alliberades per a la seva reutilització.

Els substrats de la via del proteosoma són predominantment proteïnes de vida curta, però també es degraden proteïnes mal plegades o danyades.

A diferència de la via del proteosoma, l'autofàgia degradaria proteïnes de vida llarga i és l'únic mecanisme que permet la degradació d'òrgans sencers com mitocondris i peroxisomes.

L'autofàgia va ser inicialment descrita com un mecanisme de resposta cel·lular a una situació de privació nutricional. Una de les principals funcions de l'autofàgia és produir aminoàcids mitjançant la degradació de proteïnes per promoure la supervivència cel·lular quan hi ha escassetat de nutrients (Mortimore, *et al.*, 1986).

Encara que l'autofàgia va ser inicialment descrita a mamífers, els seus mecanismes moleculars s'han esbrinat a llevats, degut, en gran part, a la fàcil aplicació d'anàlisis genètics en aquest organismes. Nombrosos experiments van portar a la identificació de les molècules que participen en aquest procés i que es coneixen amb el nom d'ATGs (*AuTophagy-related gens*). La nomenclatura ATG es va establir per unificar totes les anteriors, com per exemple APG, AUT o CVT, que havien estat descrites per diferents laboratoris (Klionsky, *et al.*, 2003).

Els llevats presenten una via pròpia de maduració i recanvi de proteïnes que es coneix amb el nom de CVT (*cytosol-to-vacuole-targeting*). Moltes de les ATGs identificades formen part d'aquesta via (Harding, *et al.*, 1995). La via CVT, a diferència de l'autofàgia, es troba activa quan hi ha nutrients al medi. La seva funció és el transport de l' α -manosidasa i del precursor de l'aminopeptidasa-1 a la vacuola (Scott, *et al.*, 1997; Hutchins, *et al.*, 2001). Per realitzar aquesta funció utilitza la mateixa maquinària que l'autofàgia (Khalfan, *et al.*, 2002).

Actualment s'han identificat nombrosos homòlegs de les ATGs de llevat a cèl·lules eucariotes (Reggiori, *et al.*, 2002).

1.3.3.2.2 EL PROCÉS CEL·LULAR DE L'AUTOFÀGIA

L'autofàgia pot ser induïda per diferents processos com la deprivació, la infecció de determinats patògens o per l'efecte d'agents ambientals. El procés autofàgic (Figura 1.13) es caracteritza per la presència d'unes estructures de doble membrana a l'interior cel·lular.

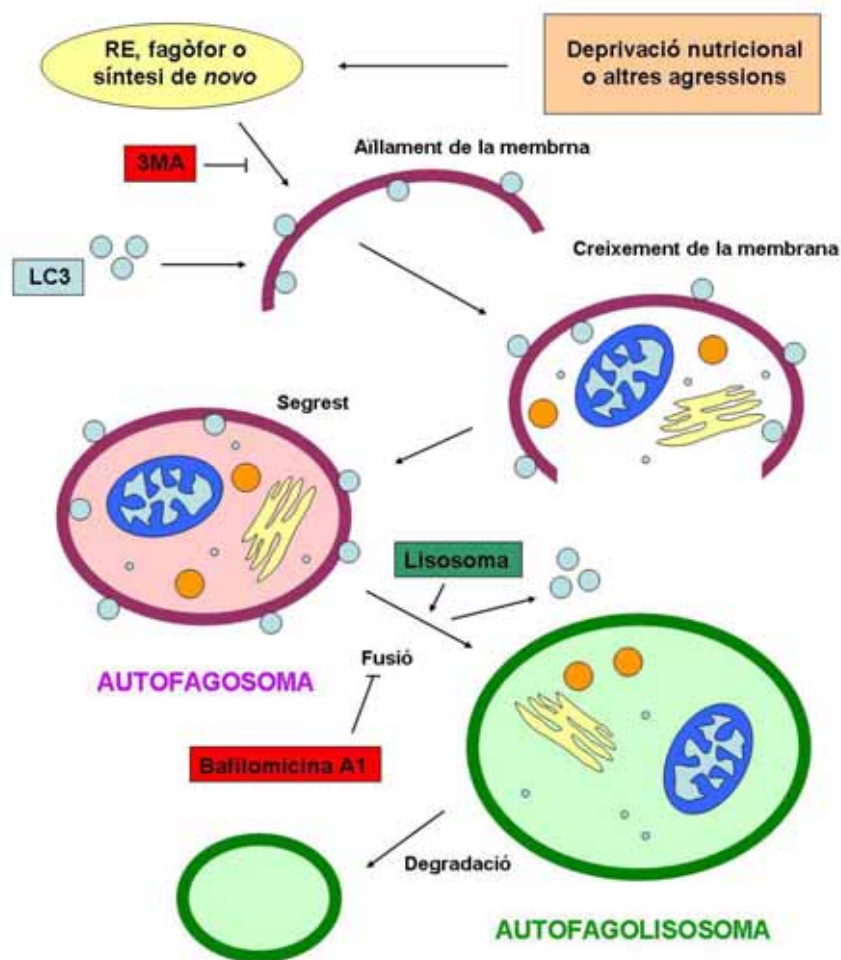


Figure 1.13. Representació bàsica del procés autofàgic (Adaptat de Kondo, *et al.*, 2005).

Inicialment es pensava que aquestes estructures s'originaven a partir del RE (Dunn, 1990), no obstant, avui en dia es pensa que podrien ser originades a partir d'una estructura membranosa anomenada fagòfor (*phagophore*) (Stromhaug, *et al.*,

1998), o podrien ésser sintetitzades de *novo* (Mizushima, *et al.*, 2001). Aquestes estructures membranoses creixen i maduren. La proteïna LC3 (*microtubule-associated protein 1 light chain 3*), homologa d'Atg8 en mamífers, és reclutada cap a la membrana durant aquest procés. Finalment es forma una estructura anomenada autofagosoma, que conté al seu interior proteïnes citosòliques i/o orgànuls cel·lulars com mitocondris. La formació de l'autofagosoma pot ser inhibida mitjançant la 3-MA (3-metiladenina) (Punnonen, *et al.*, 1990). L'autofagosoma posteriorment madura i es fusiona amb un lisosoma donant lloc a una estructura anomenada autofagolisosoma o autolisosoma. El procés de fusió pot ser inhibit mitjançant la bafilomicina A1, inhibidor de les H⁺-ATPasas, o mitjançant compostos que alteren els microtúbuls com la vinblastina o el nocodazol (Reunanen, *et al.*, 1988; Punnonen, *et al.*, 1990). El contingut dels autolisosomes serà finalment degradat per al seu reciclatge.

1.3.3.2.3 FORMACIÓ DE L'AUTOFAGOSOMA

El procés de formació de l'autofagosoma no es coneix completament, no obstant, es sap que a llevats intervenen 2 sistemes amb mecanismes d'activació ubiquitina-like, Atg12-Atg5 i Atg8-fosfatidiletanolamina (PE, *phosphatidylethanolamine*) (Figura 1.14) (Oshumi, 2001). Aquests dos sistemes estan relacionats entre ells i bastant conservats en cèl·lules eucariotes (Levine, *et al.*, 2004).

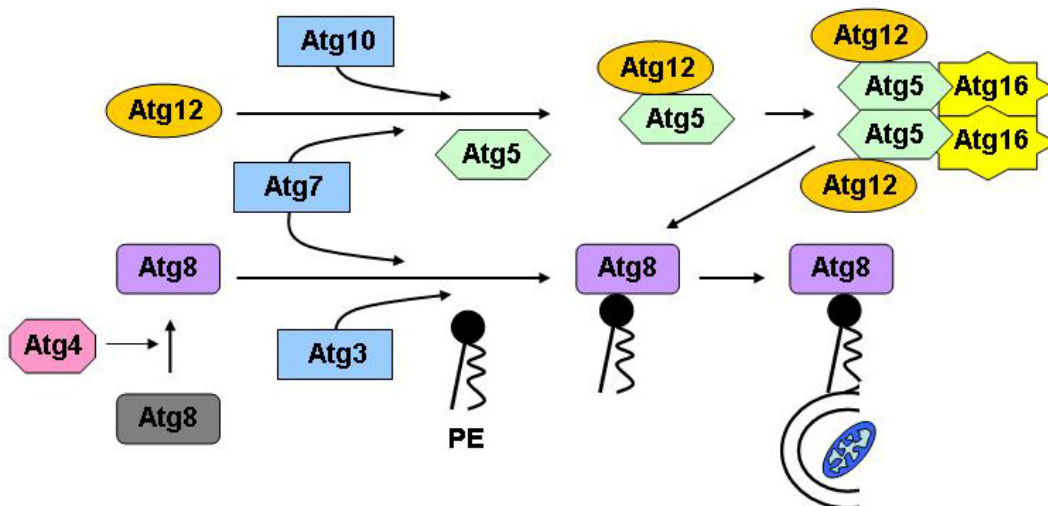


Figura 1.14. Els dos sistemes de conjugació que participen en la formació de l'autofagosoma. El complex Atg12-Atg5-Atg16 és necessari per l'estabilitat del complex Atg8-PE, però el mecanisme encara no està clar (Adaptat de Oshumi, 2001).

1.3.3.2.3.1 El sistema de conjugació Atg12-Atg5

En aquest sistema Atg12 i Atg5 s'uneixen mitjançant un enllaç covalent γ -peptídic (Mizushima, *et al.*, 1998). Perquè aquesta unió tingui lloc són necessàries dues proteïnes, Atg7, que actua com l'enzim activador de l'ubiquitina (E1) (Kim, *et al.*, 1999) i Atg10, que actua com l'enzim conjugador de l'ubiquitina (E2) (Shintani, *et al.*, 1999). A l'igual que en l'UPS, Atg7 activa Atg12, que és transferida a l'Atg10 per ser finalment unida a l'Atg5. El complex Atg12-Atg5 s'uneix a una altra proteïna, l'Atg16 (Mizushima, *et al.*, 1999). Atg16 té la capacitat d'oligomeritzar, formant un complex multimèric d'Atg5, Atg12 i Atg16. Aquest complex està format per un tetràmer a llevats i un octàmer en ratolins (Kuma, *et al.*, 2002; Mizushima, *et al.*, 2003).

1.3.3.2.3.2 El sistema de conjugació Atg8-PE

En el primer pas de la conjugació Atg4 proteolitza l'extrem C-terminal de l'Atg8 perquè sigui accessible a l'Atg7. Atg7 activa Atg8 que és transferida a un altre enzim E2, l'Atg3, per ser finalment unida a la PE. Aquesta unió és reversible, l'Atg4 pot tallar de nou a Atg8 per separar-la de la PE (Kirisako, *et al.*, 2000).

Els dos complexos, Atg12-Atg5 i Atg8-PE, són necessaris per a la formació de l'autofagosoma (Suzuki, *et al.*, 2001), no obstant, només el complex Atg8-PE forma part de l'estructura d'aquest (Kirisako, *et al.*, 1999).

S'han descrit almenys tres homòlegs d'Atg8 en mamífers, GATE-16, GABARAP i LC3. Tots ells són modificats lipídicament i es localitzen a l'autofagosoma (Kabeya, *et al.*, 2004).

LC3 s'utilitza com a marcador d'autofagosomes (Yoshimori, 2004). Aquesta proteïna pot ésser detectada en 2 formes: LC3-I que es troba al citoplasma i LC3-II unida a fosfolípids. La quantitat relativa de LC3-II unida a membrana reflectiria la quantitat d'autofagosomes. S'ha observat que les cèl·lules $ATG5^{-/-}$ no formen LC3-II (Mizushima, *et al.*, 2001).

En la formació de l'autofagosoma també participen 2 complexos quinasa: Atg1 i Vps34/PI3K.

1.3.3.2.3.3 Atg1

Atg1 és una Ser/Thr-quinasa que forma part d'un complex juntament amb d'altres proteïnes com Atg13, Vac8, Atg7 i Cvt9 (Stromhaug, *et al.*, 2001). Aquest complex és dinàmic i en funció de la disponibilitat de nutrients posaria en marxa l'autofàgia o la CVT a llevats (Figura 1.15). Quan hi ha nutrients al medi, Atg13 està hiperfosforilada i la seva associació amb Atg1 inhibida. En aquesta situació la via CVT és afavorida. En canvi, en una situació de deprivació de nutrients (o de sèrum), Atg13 és desfosforilada parcialment i s'uneix a Atg1, afavorint la formació dels autofagosomes. Vac8 interindria en la fosforilació d'Atg13 i per tant en la CVT. Atg1 interacciona amb dues proteïnes més, la primera és la Cvt9 que només sembla intervenir en la CVT i pot interaccionar amb ella mateixa (Kim, *et al.*, 2001). L'altre proteïna és l'Atg17, que participa en el procés autofàgic regulant l'interacció entre Atg1 i Atg13 (Kamada, *et al.*, 2000).

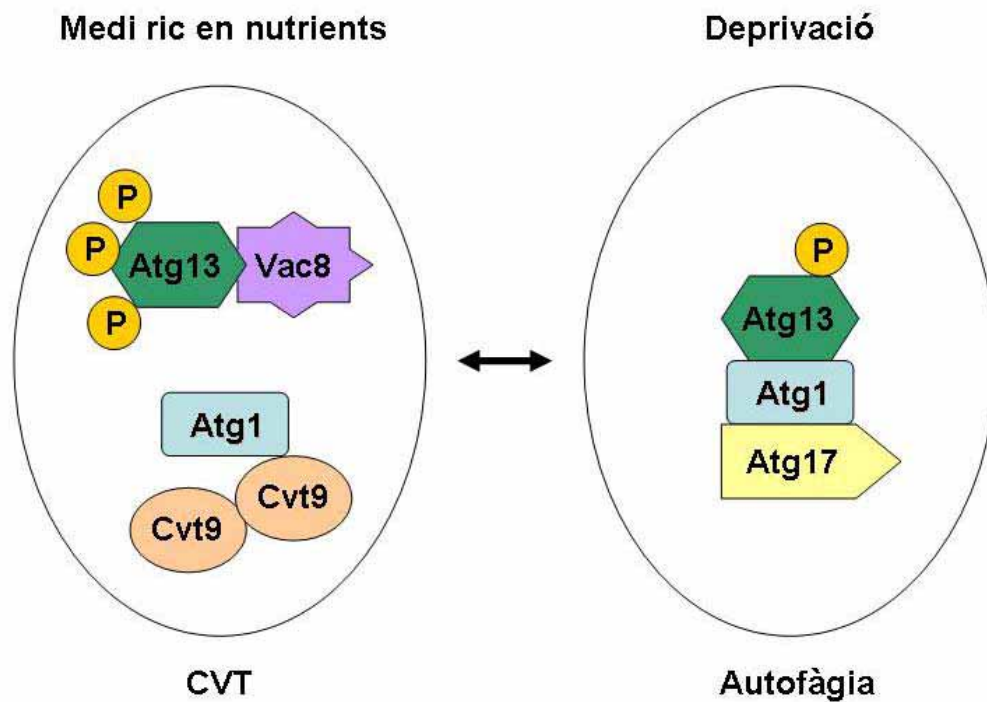


Figura 1.15. El complex Atg1 quinasa i el seu paper en l'autofàgia i la CVT.

El paper d'Atg1 en l'autofàgia no està clar, no obstant, sembla tenir un paper important en la formació de l'autofagosoma (Abeliovich, *et al.*, 2003).

1.3.3.2.3.4 Vps34/PI3K

Nombroses evidències fan pensar que una activitat PI3K tindria un paper molt important en la regulació de la formació dels autofagosomes. Per exemple, un inhibidor de la formació dels autofagosomes com la 3-MA (Seglen, *et al.*, 1982) és a l'hora un inhibidor de l'activitat PI3K (Petiot, *et al.*, 2000; Ito, *et al.*, 2007). Altres inhibidors d'activitats PI3K, com la wortmanina i l'LY294002, també inhibeixen la formació de l'autofagosoma (Blommaart, *et al.* 1997).

Els llevats només presenten un tipus de PI3K, la Vps34 (Herman, *et al.*, 1990). La Vps34 forma dos complexos diferents (Figura 1.16) (Kihara, *et al.*, 2001). El complex I, format per Vps34, Vps15, Atg6 i Atg14, controla l'autofàgia, en canvi, el complex II, format per Vps34, Vps15, Atg6 i Vps38, intervé en la via de la CPY (carboxipeptidasa Y) de llevats.

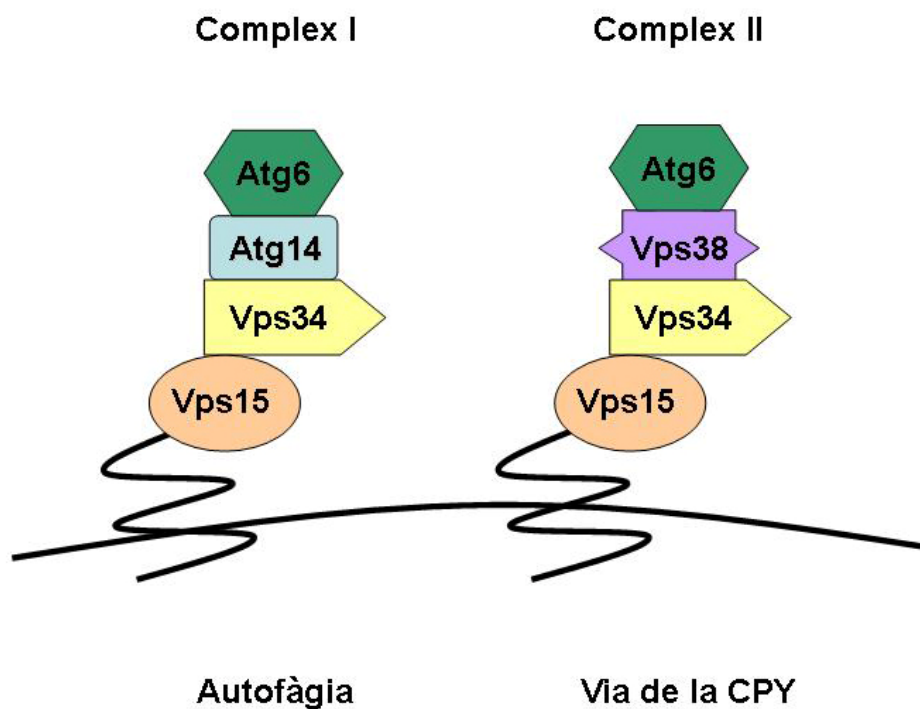


Figura 1.16. Els dos complexos PI3K de llevats.

El complex I dona lloc a fosfatidilinositol 3-fosfats (PtdIns(3)P, *Phosphatidylinositol 3-phosphate*). Els PtdIns(3)P s'uneixen a proteïnes que contenen dominis PX i FYVE

com l'Atg20 i l'Atg24, no obstant també s'uneixen a proteïnes que no contenen aquests dominis com l'Atg18, l'Atg21 i l'Atg27. Es desconeix el paper dels PtdIns(3)P, però sembla ser que intervenen en el reclutament de proteïnes cap a l'autofagosoma (Yorimitsu, *et al.*, 2005).

En mamífers l'autofàgia està regulada per dos PI3Ks, la de classe I i la de classe III (Meijer, *et al.*, 2004). La PI3K de classe III és homòloga a la Vps34 de llevats i també genera PtdIns(3)P. Aquesta PI3K-III té un paper estimulador de l'autofàgia i es localitza a membranes intracel·lulars. La PI3K de classe I és activada per receptors Tyr-quinasa localitzats a la membrana plasmàtica i converteix el PtdIns(4,5)P₂ a PtdIns(3,4,5)P₃, formant part d'una cascada que activa mTor inhibint l'autofàgia.

El paper del PtdIns(3)P a mamífers no està clar, hauria de tenir un paper similar al que té a llevats, no obstant, no s'han trobat homòlegs d'Atg20, Atg21, Atg24 i Atg27 a eucariotes.

L'Atg6 en canvi sí que té un homòleg a mamífers, la beclina-1 que és un supressor de tumors (Liang, *et al.*, 1999).

Atg9 és una proteïna de membrana localitzada al pre-autofagosoma, però no a l'autofagosoma madur, que està relacionada amb Atg1 i Vps34/PI3K (Noda, *et al.*, 2000). Atg9 interacciona amb Atg2 i Atg18 reclutant-les cap al pre-autofagosoma (Yorimitsu, *et al.*, 2005). Pel reclutament d'aquestes proteïnes són necessàries Atg1, Atg13 i el complex I de la PI3K.

Atg9 es pot trobar a d'altres estructures com mitocondris (Reggiori, *et al.*, 2005) i s'han trobat dos homòlegs a mamífers (Yamada, *et al.*, 2005).

1.3.3.2.3.5 Model de la formació de l'autofagosoma

La formació de l'autofagosoma s'iniciaria a partir de l'Atg9 i el complex I de la PI3K que posarien en marxa els complexos Atg12-Atg5-Atg16 i Atg8-PE formant una estructura pre-autofagosomal anomenada PAS (*pre-autophagosomal structure*) i que es pot definir com una estructura híbrida entre la vesícula membranar que s'està formant (fagofor) i el nucli de la maquinària proteica que hi participa (Figura 1.17) (Xie, *et al.*, 2007). El PAS aniria augmentant de mida mitjançant el reclutament de més

complexes Atg12-Atg5-16 i Atg8-PE. El complex Atg12-Atg5-Atg16 tindria un paper estructural, afavorint l'unió dels complexos Atg8-PE. Els lípids necessaris pel creixement de la membrana serien aportats per l'Atg9 que aniria ciclant entre els mitocondris i el PAS. Al final del procés l'Atg9, el complex I de la PI3K i el complex Atg12-Atg5-16 es separarien de l'autofagosoma.

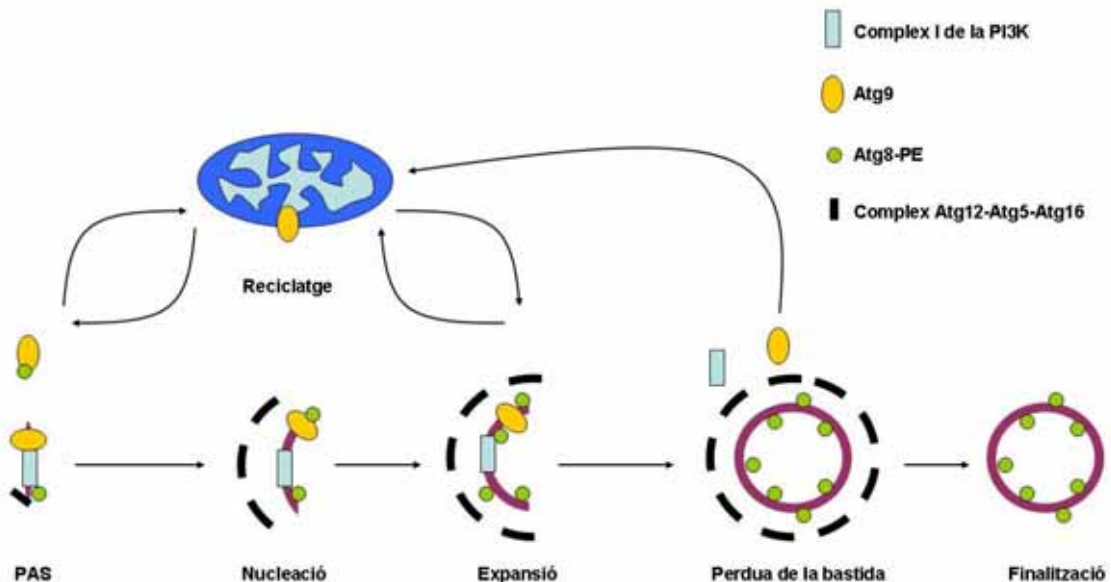


Figura 1.17. Representació de la possible biogènesi de l'autofagosoma (Adaptat de Yorimitsu, *et al*, 2005).

1.3.3.2.4 REGULACIÓ DE L'AUTOFÀGIA

L'autofàgia pot ser iniciada per un gran nombre d'estímuls extracel·lulars i intracel·lulars. Per tant, hi ha d'haver uns mecanismes per captar aquests estímuls i transmetre'ls als factors reguladors que afavoreixen o inhibeixen l'autofàgia segons les necessitats de la cèl·lula.

1.3.3.2.4.1 TOR/mTOR

Hi ha un gran nombre de senyals i vies involucrades en l'inici i control de l'autofàgia. El factor central d'aquestes vies és TOR, la proteïna diana de la rapamicina. TOR és una Ser/Thr-quinasa que regula el creixement cel·lular i el

metabolisme. TOR en condicions normals inhibeix l'autofàgia mitjançant dos mecanismes. Primer, TOR forma part d'una cascada de transducció de senyals amb uns efectors *down-stream* que controlen la transcripció i la traducció de proteïnes (Cardenas, *et al.*, 1999). Segon, sembla que TOR afecta directament o indirectament a les ATGs. Com a conseqüència la formació de l'autofagosoma és alterada (Levine, *et al.*, 2004).

TOR es pot trobar en dos complexos multiproteics diferents. TORC1, que és sensible a la rapamicina i TORC2, que no ho és (Wullschleger, *et al.*, 2006). TORC1 regula la síntesi de proteïnes i l'autofàgia, en canvi, TORC2 regula la formació del citoesquelet d'actina i la polaritat cel·lular.

Les cèl·lules de mamífer presenten un homòleg de TOR, mTOR, que regula l'autofàgia d'una forma similar a l'observada en llevats.

Els complexos TORC1 i TORC2 també es formen a mamífers. mTORC1 es caracteritza per la presència de la proteïna raptor i mTORC2 per la presència de la proteïna rictor.

1.3.3.2.4.1.1 Regulació de TOR/mTOR

Per a l'activació d'mTor és necessària Rheb, una GTPasa petita. L'activitat de Rheb està regulada per un cicle GDP/GTP. Els factors intercanviadors de guanines afavoreixen l'alliberament del GDP de la forma inactiva de Rheb que s'uneix a GTP. Aquesta unió indueix un canvi conformacional, permetent que es complexi amb altres efectors *down-stream* i els activi. Aquest senyal finalitza mitjançant les proteïnes activadores de GTPases que afavoreixen la hidròlisi del GTP, tornant Rheb al seu estat inactiu. TSC2 (*tuberous sclerosis complex 2*) presenta homologia amb les proteïnes activadores de GTPases i inhibeix Rheb. Perquè aquesta inhibició es dugui a terme TSC2 ha d'heterodimeritzar amb TSC1 (Castro, *et al.*, 2003).

La quinasa mTOR està regulada per diferents factors:

- Factors de creixement: La via de mTOR respon als factors de creixement a través de la via de la PI3K. La unió de la insulina o els IGFs (*insulin-like growth factor*) als seus receptors estimulen l'activitat de la PI3K i d'mTOR.

- **Nutrients:** Els nutrients, i en especial els aminoàcids, regulen l'activitat d'mTOR. La deprivació d'aminoàcids, en particular l'absència de Leu, inhibeix l'activitat d'mTOR. Els aminoàcids activarien mTOR inhibint TSC1-TSC2 o estimulants Rheb (Gao, *et al.*, 2002).

- **Energia:** mTOR respon als requeriments energètics de la cèl·lula mitjançant AMPK. L'activació d'AMPK inhibeix la síntesi de proteïnes i estimula processos que generen ATP com l'oxidació d'àcids grassos. AMPK inhibeix mTOR a través de TSC2 (Inoki, *et al.*, 2003).

- **Estrès:** Les cèl·lules responen a estressos ambientals, com la hipòxia, disminuint l'activitat d'mTOR. El senyal d'hipòxia és transduït cap a mTOR mitjançant la proteïna REDD1 que actua *up-stream* de TSC1-TSC2 (Brugarolas, *et al.*, 2004). L'expressió d'aquestes proteïnes en una situació d'hipòxia es veu incrementada pel factor de transcripció HIF-1 α . A més, una hipòxia prolongada disminueix l'ATP, activant AMPK.

Altres estressos que inhibeixen l'activitat d'mTOR són el dany al DNA i les condicions reductores. El dany al DNA actua mitjançant p53, a través de la via AMPK-TSC2 (Feng, *et al.*, 2005).

1.3.3.2.4.1.2 4E-BP1 i p70S6K

mTOR raptor fosforila dos factors que regulen la traducció de les proteïnes, 4E-BP1 i p70S6K (també anomenada S6K) (Fingar, *et al.*, 2002).

4E-BP1 és un factor que inhibeix la traducció de les proteïnes. mTOR raptor fosforila 4E-BP1 inhibint la seva acció.

A diferència de 4E-BP1 l'S6K estimula la traducció de proteïnes. Aquest mecanisme es veu afavorit quan S6K és fosforilada per mTOR raptor.

1.3.3.2.4.2 VIA DE LA PI3K DE CLASSE I

La PI3K de classe I (Figura 1.18) s'activa a l'unir-se a Tyr-P de receptors de factors de creixement o al substrat dels receptors de tipus insulina (IRS, *insulin receptor substrate*) fosforilat en Tyr.

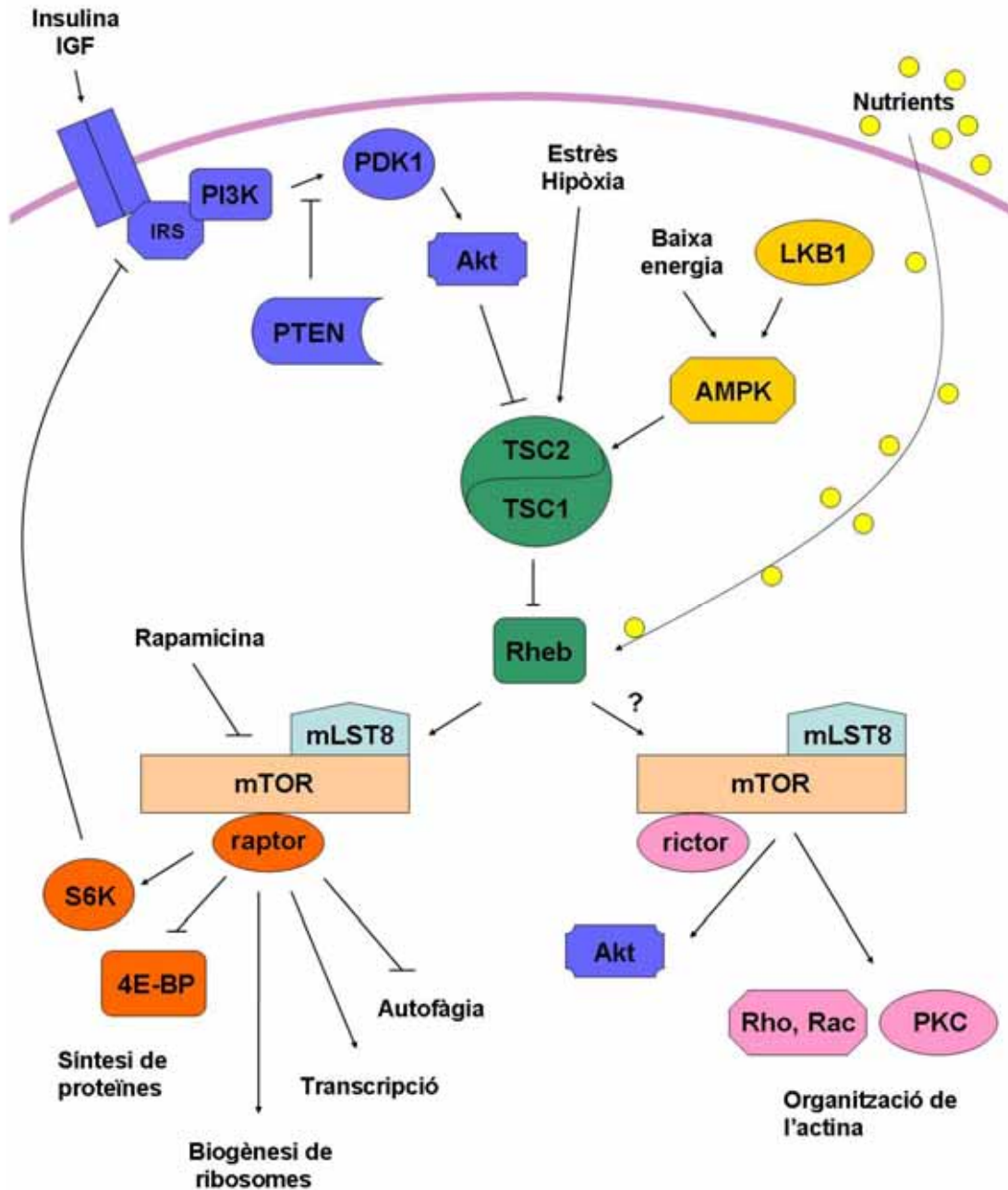


Figura 1.18. Representació de la via PI3K de classe I – AKT – mTOR (Adaptat de Wullschleger, *et al.*, 2006).

La PI3K-I converteix el $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ a $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$, que s'acumula a la membrana. Aquest pas és contrarestat per la proteïna PTEN, que desfosforila $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$ en posició 3. El $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$ recluta PDK1 i AKT a la membrana i, com a conseqüència, PDK1 fosforila AKT. Per a la completa activació d'AKT són necessàries dues fosforilacions: PDK1, que fosforila AKT en un residu de Thr (Thr-308) i una quinasa encara no identificada completament, PDK2, que fosforila AKT en un residu de Ser (Ser-473). Evidències recents indiquen que mTORC2 té activitat PDK2 i fosforila AKT (Hay, 2005).

AKT està relacionada amb mTOR mitjançant TSC1 i TSC2. TSC2 és fosforilat i funcionalment inhibït per AKT. Aquesta inhibició permet actuar a Rheb que activa mTOR.

1.3.3.2.4.3 VIA DE LA PI3K DE CLASSE III

La PI3K de classe III forma un complex amb la beclina-1 que està involucrat en la formació dels autofagosomes i l'inici de l'autofàgia (Kihara, *et al.*, 2001). La 3-MA, la wortmanina i l'LY294002, interfereixen amb aquest procés (Blommaert, *et al.*, 1997). El complex PI3K-III-beclina-1 es localitza majoritàriament a la xarxa trans-Golgi (TGN, *trans-Golgi network*), no obstant pot trobar-se també als endosomes tardans. Aquesta distribució fa pensar que aquest complex participa en la distribució dels components de l'autofagosoma.

1.3.3.2.4.4 ERK

GAIP (*G α -interacting protein*) és un regulador de la senyalització de les proteïnes G que accelera la hidròlisi de GTP a la subunitat α de la proteïna G_{i3} . Quan la proteïna $G_{\alpha i3}$ es troba unida a GTP, el procés autofàgic està inhibït, en canvi, quan es troba unida a GDP és afavorit. Per tant GAIP pot afavorir l'autofàgia (Ogier-Denis, *et al.*, 1995). La fosforilació i activació de GAIP depenen de la via d'ERK1/2, que pot doncs tenir un paper estimulador a l'autofàgia (Ogier-Denis, *et al.*, 2000).

1.3.3.2.4.5 SÍNTESI DE PROTEÏNES

Hi ha evidències que indiquen que durant l'autofàgia hi ha una inhibició parcial de la síntesi de proteïnes. La fosforilació de la proteïna ribosomal S6, un substrat de l'S6K, té un efecte inhibitori sobre l'autofàgia (Blommaert, *et al.*, 1995). A aquest efecte cal afegir que dues quinases d'eIF2 α , GCN2 i PKR, afavoreixen el procés autofàgic inhibint la síntesi proteica (Talloczy, *et al.*, 2001). No obstant, la inhibició global de la síntesi proteica no estimula el procés autofàgic, encara que s'observen processos de vacuolització i petits autofagosomes en el citoplasma (Abeliovich, *et al.*, 2000). Sembla, de fet, que la síntesi proteica sigui necessària per a l'autofàgia.

1.3.3.2.4.6 ALTRES VIES QUE REGULEN L'AUTOFÀGIA

DAPK (*death-associated protein kinase*) i DRP1 (*death-associated related protein kinase 1*) són dues proteïnes calci dependents que indueixen autofàgia (Inbal, *et al.*, 2002), no obstant, el seu mecanisme d'acció no es coneix del tot.

1.3.3.2.5 AUTOFÀGIA I APOPTOSI

L'autofàgia i l'apoptosi no són probablement dues vies independents, si bé aquesta interdependència no està encara del tot demostrada. S'ha descrit l'existència de diferents lligams entre elles, no obstant, aquests lligams encara no es coneixen completament. Per exemple, quan l'apoptosi és inhibida per defectes en la funció de les proteïnes proapoptòtiques BAX i BAK, s'inicia el procés autofàgic a diferents línies cel·lulars (Lum, *et al.*, 2005). També s'ha observat que quan s'inhibeix l'apoptosi a fibroblasts de ratolins mitjançant inhibidors de la caspasa 8, s'indueix autofàgia. A més, els inhibidors de l'autofàgia redueixen el número de cèl·lules mortes per l'apoptosi (Yu, *et al.*, 2004). El procés invers també ha estat descrit, l'ús d'inhibidors de l'autofàgia com la 3-MA o la inhibició mitjançant siRNAs contra gens associats a aquesta, indueix apoptosi en cèl·lules HELA (Boya, *et al.*, 2005). Un altre exemple seria l'inhibició de l'autofàgia a varies línies canceroses mitjançant bafilomicina A1, en aquest cas el procés apoptotic també és induït (Paglin, *et al.*, 2001; Kanzawa, *et al.*, 2003). Fins i tot s'han descrit situacions on els dos processos es poden observar al mateix temps. Així, per exemple, l'anàlisi de cèl·lules de càncer de mama tractades amb tamoxifè,

mitjançant microscòpia electrònica, va permetre veure que algunes cèl·lules estaven desenvolupant un procés apoptòtic, autofàgic o els dos al mateix temps (Bursch, *et al.*, 1996).

Evidències recents fan pensar que la relació entre l'autofàgia i l'apoptosi podria ésser més estreta del que es pensava. Per exemple s'ha vist que molècules proapoptòtiques com p53 i BNIP3 també estan activament relacionades amb l'autofàgia (Crighton, *et al.*, 2006; Daido, *et al.*, 2004), o que factors proautofàgics com Atg5 indueixen apoptosi en determinades circumstàncies (Yousefi, *et al.*, 2006). A més a més, el factor antiapoptòtic Bcl-2 també inhibeix l'autofàgia (Pattingre, *et al.*, 2005).

Malgrat totes aquestes observacions, encara no està clar perquè algunes cèl·lules presenten autofàgia, d'altres apoptosi i d'altres el dos processos. No obstant, sembla que el fet de que es desenvolupi un o l'altre procés, dependria del tipus cel·lular i l'estímul estressant. Per exemple, l'As₂O₃ indueix apoptosi en cèl·lules de leucèmia (Pelicano, *et al.*, 2003) i autofàgia en gliomes malignes (Kanzawa, *et al.*, 2003).

1.3.3.2.6 AUTOFÀGIA I ESTRÈS RETICULAR

En els darrers anys s'ha observat que l'autofàgia també està relacionada amb l'estrès reticular. Quan es produeix una situació d'estrès reticular, l'estructura pre-autofagosomal s'uneix i el transport dels autofagosomes cap a la vacuola/lisosoma incrementa. També cal destacar que l'activitat quinasa de l'Atg1 és elevada durant l'autofàgia induïda per estrès reticular (Yorimitsu, *et al.*, 2006).

Diferents treballs relacionen l'autofàgia amb l'ERAD. L'ATZ (α 1-antitrypsin Z) és la forma mutada de l' α 1-antitripsina, una proteïna que normalment és sintetitzada al fetge. L'ATZ es plega incorrectament i s'acumula al RE causant dany cel·lular. Per prevenir aquest dany, l'ATZ és degradada per l'ERAD. Està descrit que molècules que participen en el procés autofàgic intervenen en l'eliminació dels agregats d'ATZ (Kamimoto, *et al.*, 2005). A més, en un treball recent s'han proposat dos models d'ERAD diferents. L'ERAD1, on intervindrien l'ubiquitina i el proteosoma, i l'ERAD2 on l'autofàgia i els lisosomes jugarien un paper molt important (Fujita, *et al.*, 2007).

Encara que la relació entre aquests processos és clara, encara no s'ha trobat la via que els relaciona. Hi ha grups que parlen de la via d'IRE (Yorimitsu, *et al.*, 2006) i d'altres de la de PERK (Kouroku, *et al.*, 2006).

1.3.3.2.7 α -SINUCLÈÏNA, MALALTIA DE PARKINSON I AUTOFÀGIA

Avui en dia hi ha evidències que indiquen que l'autofàgia pot tenir un paper important en l'eliminació d'agregats proteics a la malaltia de Parkinson i d'altres malalties neurodegeneratives (Martínez-Vicente, *et al.*, 2007).

Depenent del seu estat conformacional i les condicions cel·lulars, l' α -sinucleïna pot ser degradada per l'UPS o per autofàgia (Webb, *et al.*, 2003). De fet, només les formes solubles de la proteïna poden ser degradades pel proteosoma (Betarbet, *et al.*, 2005) i l'acumulació de les formes fibril·lars bloquejaria la seva acció (Stefanis, *et al.*, 2001). Aquestes formes solubles també poden ser degradades mitjançant la CMA. No obstant, les formes patogèniques de l' α -sinucleïna bloquegen l'activitat de la CMA (Cuervo, *et al.*, 2004). A més, diferents modificacions post-traduccionals impedeixen la degradació de l' α -sinucleïna per aquesta via, i poden bloquejar la degradació d'altres substrats de la CMA. La incapacitat per degradar les formes modificades de l' α -sinucleïna afavoriria la seva acumulació al citoplasma i la seva agregació. En aquesta situació les vies de la CMA i de l'UPS estarien bloquejades i s'activaria l'autofàgia (Iwata, *et al.*, 2005; Massey, *et al.*, 2006), eliminant els agregats tòxics de l' α -sinucleïna (Rideout, *et al.*, 2004). Per explicar la mort neuronal s'hipotetitza que en algun moment aquesta autofàgia no és suficient per mantenir l'homeòstasi cel·lular i es produeix una situació de dany neuronal. De fet, el bloqueig de la CMA fa que les cèl·lules es tornin més sensibles a agents estressants (Massey, *et al.*, 2006) i, per tant, es pot produir dany neuronal més fàcilment.

1.4 LES CÈL·LULES SH-SY5Y

El neuroblastoma és el tumor sòlid més comú en els infants i s'origina a partir de precursors de neurones simpàtiques de la cresta neuronal que no arriben a completar la seva diferenciació. Aquestes cèl·lules tenen, per tant, un cert fenotipus catecolaminèrgic, amb més o menys característiques dopaminèrgiques.

Les cèl·lules SH-SY5Y (Figura 1.19) són un subclon de la línia de neuroblastoma humà SK-N-SH. Aquest clon es caracteritza per cossos cel·lulars petits, escàs citoplasma, apèndix citoplasmàtics com neurites i la formació d'agregats cel·lulars. A més a més, expressen TH (Ross, *et al.*, 1983) i, encara que escassament, el DAT (Takahashi, *et al.*, 1994).

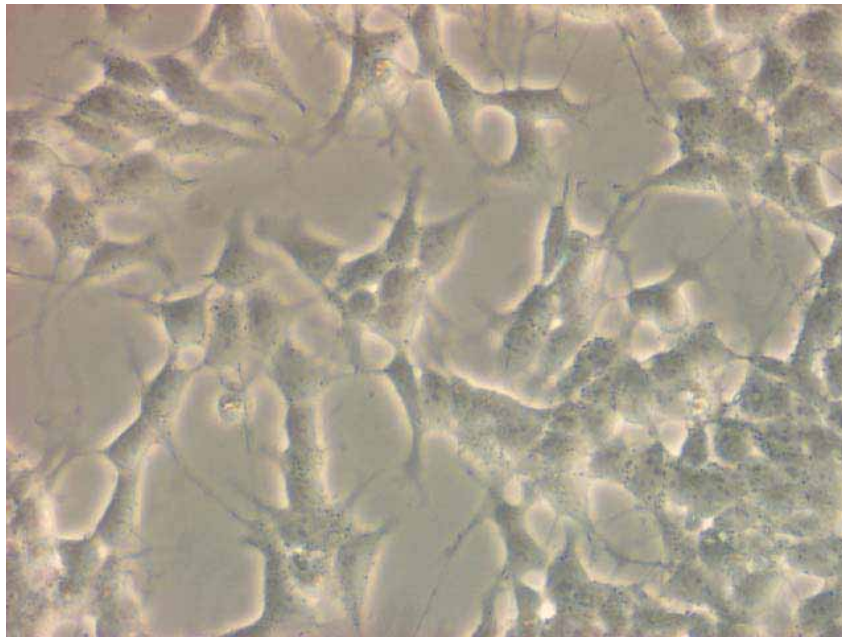


Figura 1.19. Imatge d'un cultiu cel·lular de la línia SH-SY5Y.

La línia cel·lular SH-SY5Y és un bon model per realitzar estudis dels efectes de toxines sobre els mecanismes de síntesi i metabolisme de la DA que solen extrapolarse a la supervivència de les neurones dopaminèrgiques. Estudis d'aquest tipus s'han dut a terme especialment amb MPP⁺, el metabòlit actiu de l'MPTP, i compostos com la 6-OHDA, la selegilina o el paraquat (Zuo, *et al.*, 1995; Itano, *et al.*, 1995; Song, *et al.*, 1997; Yu, *et al.*, 1997; Yang, *et al.*, 2005).

OBJECTIUS

OBJECTIUS

L'objectiu d'aquesta tesi ha estat estudiar les condicions i els mecanismes de toxicitat cel·lular induïts per la dopamina utilitzant com a eina una línia de neuroblastoma humà per la seva proximitat amb la neurona dopaminèrgica, amb la finalitat de proporcionar un model de neurodegeneració d'aquestes neurones en la malaltia de Parkinson que ajudi a entendre el perquè de la seva particular vulnerabilitat i permeti pensar en possibles noves dianes terapèutiques.

Hem desglossat els objectius d'aquesta tesi en 3 punts:

- 1) Estudiar els efectes de la dopamina i els seus derivats sobre la viabilitat de les cèl·lules SH-SY5Y.
- 2) Estudiar els efectes de la dopamina sobre l'expressió de proteïnes en cèl·lules SH-SY5Y.
- 3) Estudiar els processos moleculars en la mort cel·lular induïda per dopamina en cèl·lules SH-SY5Y.

RESULTATS

**EFFECTE DE LA DOPAMINA SOBRE LA VIABILITAT I EL PODER
REDUCTOR DE LES CÈL·LULES SH-SY5Y**

INTRODUCCIÓ

Està descrit que la DA pot potencialment provocar estrès oxidatiu com a conseqüència de la seva metabolització per la MAO o, a l'igual que la 6-OHDA, a través d'un procés no enzimàtic d'autooxidació que depèn del pH. En tots dos casos es produeix H_2O_2 i poden produir-se radicals lliures de l'oxigen, que, si no són degudament eliminats, causen estrès oxidatiu i incrementen la peroxidació de lípids i proteïnes (Lai, *et al.*, 1997; Berg, *et al.*, 2004).

El DOPAC és el principal producte de la MAO. En canvi, l'autooxidació de la DA genera un gran nombre de productes entre els que trobem la dopaquinona i el dopaminocrom (DAcr), que acabaran formant NM (Fedorow, *et al.*, 2005). Aquesta oxidació segueix una corba exponencial segons el pH, siguent molt baixa a pHs acídics, ràpida a pH neutre i molt ràpida a pH bàsic (Sánchez-Rivera, *et al.*, 2003).

Les quinones són agents oxidants que poden reaccionar amb els grups funcionals reduïts, com els residus de Cys, modificant l'estructura de les proteïnes (LaVoie, *et al.*, 1999) i induir dany al DNA (Spencer, *et al.*, 1994) i apoptosi (Emdadul Haque, *et al.*, 2003). A més a més, la facilitat d'oxidar-se de la DA li confereix una certa capacitat antioxidant i, almenys a concentracions baixes, pot tenir un efecte beneficiós per a la plasticitat i supervivència neuronal (Sofic, *et al.*, 2001; Weinreb, *et al.*, 2003). Tenint en compte totes aquestes consideracions, les concentracions intracel·lulars de la DA o els seus derivats oxidats podrien tenir un paper important sobre l'estrès oxidatiu.

RESULTATS

Entrada de la DA i el DAcr en les cèl·lules SH-SY5Y

L'estudi de la captació de $[7,8-^3H]$ -DA revela que la DA, a concentracions de 100 i 500 μM (DA-100 i DA-500), entra ràpidament en les cèl·lules SH-SY5Y assolint el seu màxim a les 6 hores (Figura 3.1.1). Tenint en compte que el contingut de proteïnes i aigua de les cèl·lules és aproximadament del 15% i 70% respectivament, s'ha estimat que la concentració de DA, o dels seus derivats, a l'interior de la cèl·lula després de 24 hores hauria de ser aproximadament de 80 i 270 μM per DA-100 i DA-500 respectivament.

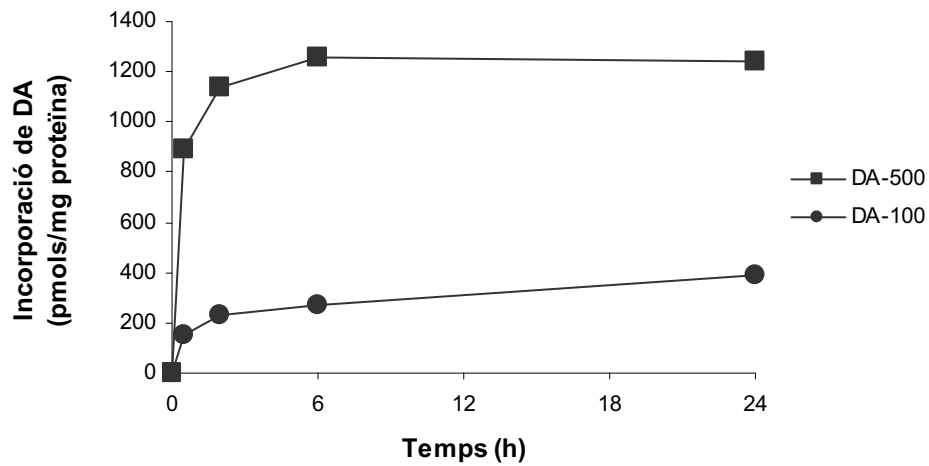


Figura 3.1.1. Time-course de l'entrada de DA a l'interior cel·lular després de la incubació amb DA-100 i DA-500.

A diferència de la DA, el seu derivat oxidat principal, el DAcr, entra menys a l'interior de la cèl·lula i només és detectat quan la concentració extracel·lular és superior a 100 μM (Figura 3.1.2).

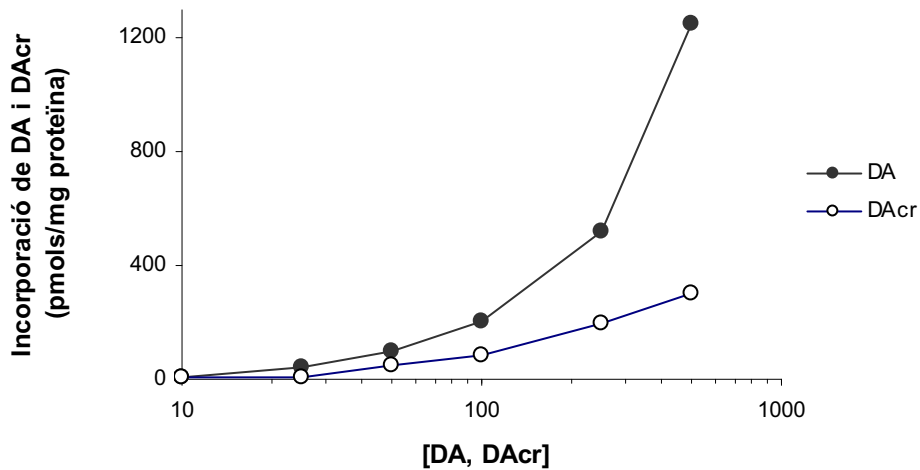


Figura 3.1.2. Representació de la captació de diferents concentracions de [^3H]-DA i [^3H]-DAcr en les cèl·lules SH-SY5Y després de 24 hores d'incubació.

L'anàlisi de l'expressió del DAT, dels receptors D₂ i D₃, i de DARPP32, una molècula que intervé en la senyalització dels receptors D₁ i D₅, utilitzant la tècnica del Western blot, revela que les cèl·lules SH-SY5Y només expressen aquestes proteïnes després d'ésser diferenciades amb àcid retinoic (AR) (Figura 3.1.3).

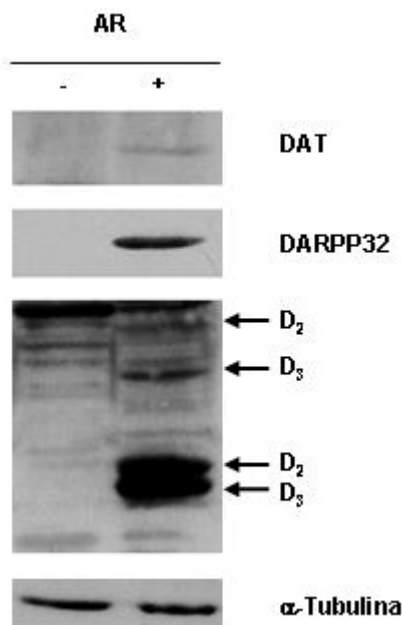


Figura 3.1.3. Western blot de l'expressió del DAT, dels receptors D₂ i D₃, i de DARPP32 en les cèl·lules SH-SY5Y després d'ésser diferenciades amb AR (10 µM) durant una setmana.

Efecte de la DA sobre la proliferació i la viabilitat de les cèl·lules SH-SY5Y

Per establir com l'acumulació intracel·lular de DA afecta a la proliferació i viabilitat cel·lular es van utilitzar diferents aproximacions experimentals. La proliferació cel·lular es va estudiar mitjançant l'incorporació de [³H]-timidina durant 24hores en absència i presència de DA (Figura 3.1.4). Com es pot observar la proliferació no es veu afectada per la DA-100, en canvi, el descens és important amb la DA-500.

Com el resultat de la proliferació cel·lular mesurat mitjançant la incorporació de [³H]-timidina podria estar influenciat per una elevada mortalitat es va estudiar com afectava la DA a les diferents fases del cicle cel·lular (Figura 3.1.5; Taula 3.1.1). El resultat obtingut va ser similar a l'anterior, només la dosi més elevada de DA produeix un increment de la proporció de cèl·lules que es troba a la fases G₀/G₁ i una disminució de la proporció que es troba a les fases G₂/M i S.

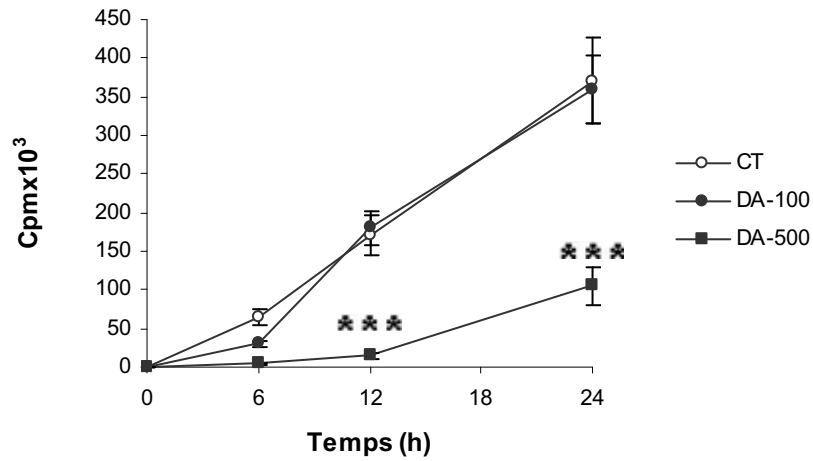


Figura 3.1.4. Time-course de la incorporació de [³H]-timidina després del tractament amb DA. S'observen diferències significatives després del tractament amb DA-500 (**P<0,001) comparat amb els controls. Els valors són la mitjana de 3 experiments ± la MES.

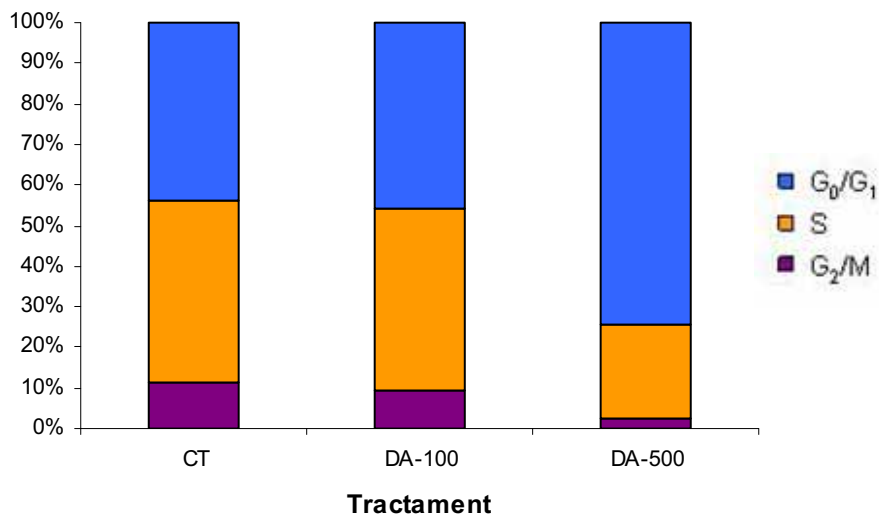


Figura 3.1.5. Representació del percentatge de cèl·lules que es troben a les diferents fases del cicle cel·lular després del tractament amb DA durant 12 hores.

	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
CT	43,81	44,8	11,39
DA-100	45,91	44,75	9,35
DA-500	74,16	23,16	2,68

Taula 3.1.1. Percentatge de cèl·lules que es troben a les diferents fases del cicle cel·lular després del tractament amb DA. S'observen diferències significatives amb la dosi més elevada respecte als controls (*P<0,05).

La viabilitat de les cèl·lules SH-SY5Y quan s'incuben amb DA va ser mesurada mitjançant 2 procediments. Primer les cèl·lules es van observar al microscopi de fluorescència mitjançant una tinció amb taronja d'acridina i bromur d'etidi després del tractament amb DA durant 24h. Aquesta observació permet veure que les cèl·lules estan aparentment bé després de la incubació amb DA-100, i bastant danyades després del tractament amb DA-500 (Figura 3.1.6). No obstant, la viabilitat mesurada per MTT indica un descens de la viabilitat respecte els controls d'un 40% i un 75% després de 24 hores d'incubació amb DA-100 i DA-500 respectivament (Figura 3.1.7). L'addició de tranilcipromina (TCP) 1 mM, inhibidor no específic de les MAOs, no altera l'efecte de la DA-500, en canvi, redueix un 10% l'efecte de la DA-100.

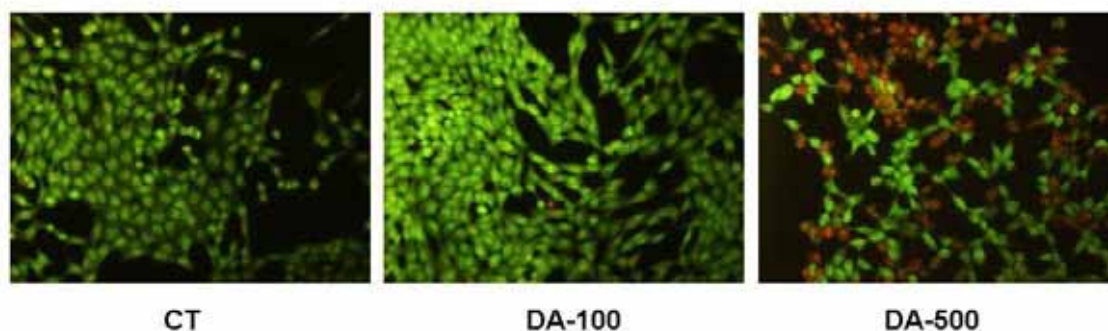


Figura 3.1.6. Observació de la viabilitat cel·lular de les cèl·lules SH-SY5Y després de la incubació amb DA durant 24h mitjançant una tinció amb taronja d'acridina i bromur d'etidi. S'observa una disminució de cèl·lules vives (verdes, taronja d'acridina) i un increment de cèl·lules mortes (vermelles, bromur d'etidi) després del tractament amb DA-500.

Resultats

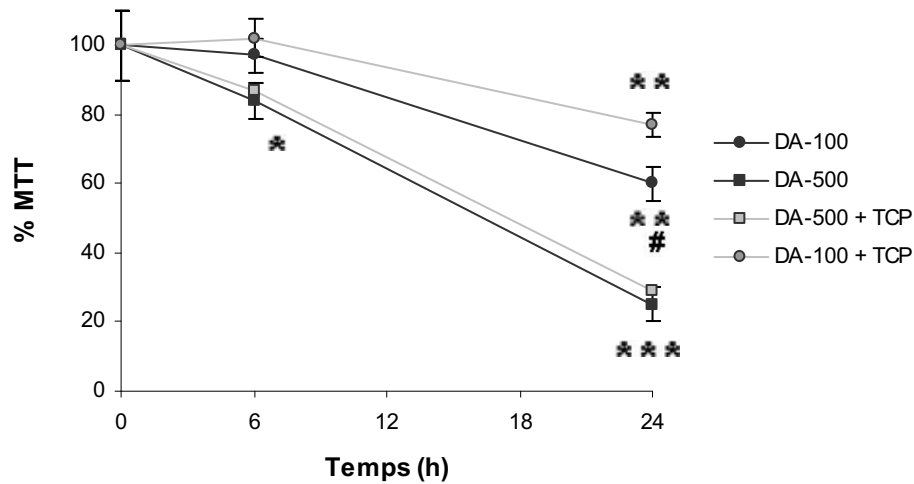


Figura 3.1.7. MTT de les cèl·lules SH-SY5Y després del tractament amb DA. S'observen diferències significatives amb DA-500 a les 6h (* $P < 0,05$) i a les 24 hores (** $P < 0,01$) respecte el control, en canvi amb DA-100 només a les 24h (** $P < 0,01$). El tractament amb 1 mM de TCP només protegeix l'efecte de la DA-100 (# $P < 0,01$). Els valors estan expressats en % respecte al control i són la mitjana de 4 experiments \pm la MES.

L'efecte de la DA-500 a les 24 hores es protegeix si la DA es retira del medi després d'una hora. En canvi, a partir de les 3 hores l'efecte és irreversible (Figura 3.1.8).

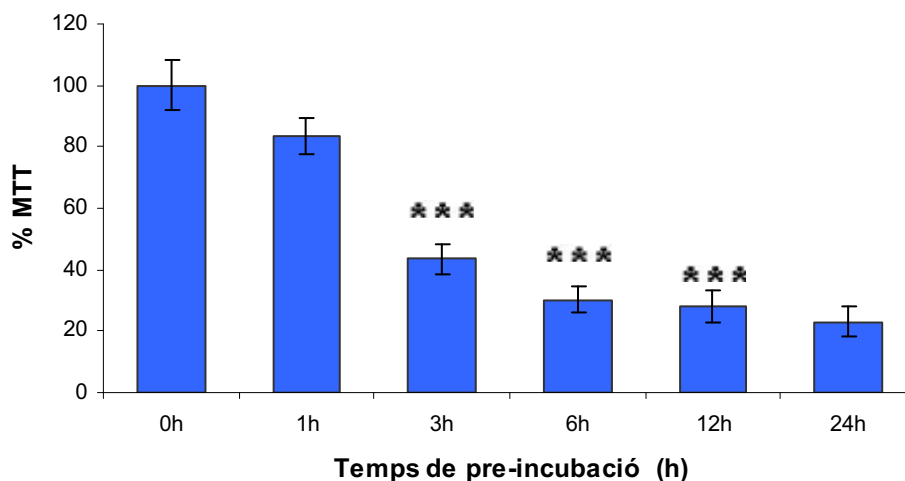


Figura 3.1.8. MTT de l'efecte de la DA-500 a les 24 hores després de la incubació a diferents temps. A partir de les 3 hores hi ha descens de la viabilitat respecte al control (** $P < 0,001$). Els valors estan expressats en % respecte al control i són la mitjana de 4 experiments \pm la MES.

El tractament amb DAcr a la dosi més elevada té el mateix efecte que la DA, en canvi, a la dosi més baixa no té efecte (Figura 3.1.9).

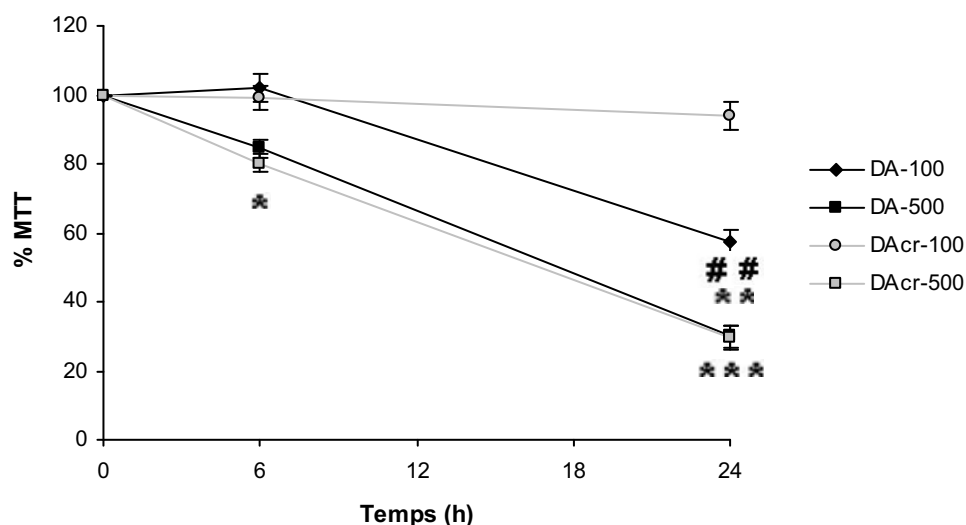


Figura 3.1.9. MTT de les cèl·lules SH-SY5Y després del tractament amb DA i DAcr. S'observen diferències significatives amb DA-500 i DAcr-500 a les 6h (* $P < 0,05$) i a les 24 hores (** $P < 0,01$) respecte al control, en canvi amb DA-100 només a les 24h (** $P < 0,01$). El tractament amb DAcr-100 no té cap efecte si el comparem amb la mateixa dosi de DA a les 24 hores (## $P < 0,01$). Els valors estan expressats en % respecte al control i són la mitjana de 3 experiments \pm la MES.

Metabolització intracel·lular de la DA

Per estimar la metabolització de la DA intracel·lular per la MAO, es va mesurar el contingut del seu principal metabòlit, el DOPAC, mitjançant HPLC, al cap de 24h d'incubació amb DA (Taula 3.1.2). La relació DOPAC/DA és similar a la dels CT en el tractament amb DA-100. En canvi, aquesta relació és molt més baixa amb DA-500, degut a una acumulació de DA i una disminució de DOPAC, indicant que pot haver-hi una saturació de la MAO, una inhibició de l'enzim o els dos efectes.

Efecte del DAcr sobre l'activitat de la MAO-A

Considerant que la DA intracel·lular també es deu estar oxidant de forma no enzimàtica i formant DAcr, es va analitzar l'efecte d'aquest compost sobre l'activitat de

la MAO. Per aquest objectiu l'activitat MAO-A (la principal isoforma descrita en les cèl·lules SH-SY5Y (Yi, *et al.*, 2005)) va ésser mesurada utilitzant mitocondris de rata aïllats i serotonina com a substrat, en presència de diferents concentracions de DAc (Figura 3.1.10). Com es pot observar, l'activitat de la MAO-A és inhibida pel DAc amb una IC₅₀ de 49 µM.

	CT	DA-100	DA-500
DOPAC	45 ± 8	634 ± 80 ***	385 ± 32 *** , #
DA	3 ± 0.5	47 ± 3 ***	1285 ± 171 *** , ###
DOPAC/DA	15,1 ± 5.0	13,5 ± 1,2	0,3 ± 0,06 *** , ###

Taula 3.1.2. Contingut de DA i DOPAC en les cèl·lules SH-SY5Y després de 24 hores de incubació amb DA-100 i DA-500. Els resultat estan expressants en pmol/mg de proteïna. S'observen diferències significatives d'ambdues concentracions respecte als controls (**P<0,001) i de la DA-500 respecte la DA-100 (#P<0,05; ###P<0,001). Els valors són la mitjana de 4 experiments ± la MES.

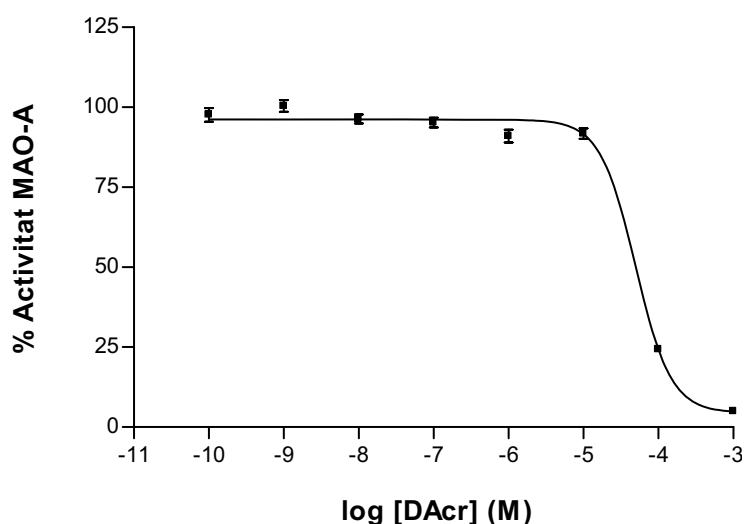


Figura 3.1.10. Inhibició de la activitat de la MAO-A per part del DAc. Els valors són la mitjana de 3 experiments ± la MES.

Activitat mitocondrial en les cèl·lules SH-SY5Y després del tractament amb DA

L'activitat mitocondrial es va determinar mesurant el consum d'oxigen i el potencial de membrana.

El consum d'oxigen, mesurat per respirometria, es redueix un 40 i un 80% després del tractament amb DA-500 durant 6 i 24 hores respectivament (Figura 3.1.11). No hi han canvis significatius amb la DA-100.

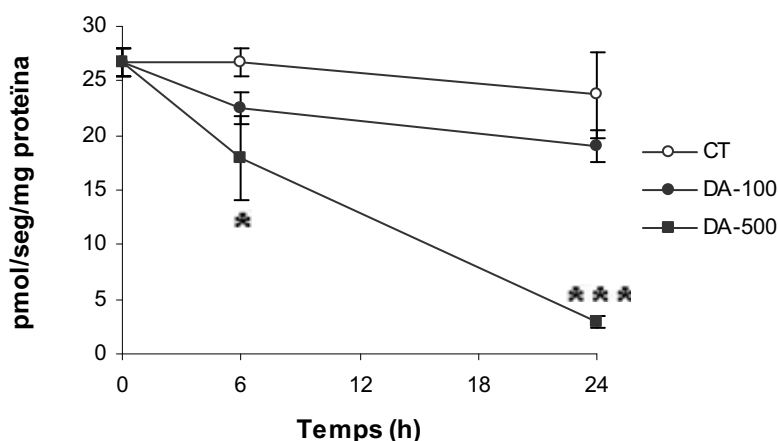
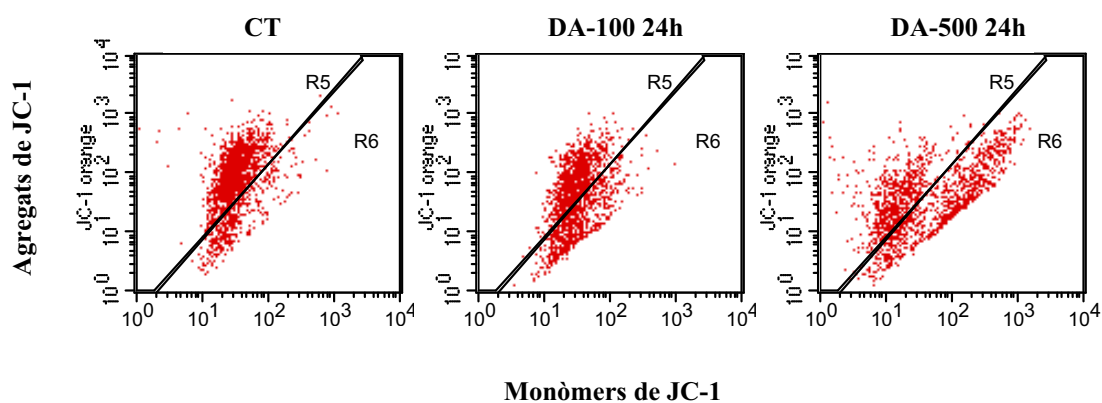


Figura 3.1.11. Consum d'oxigen de les cèl·lules SH-SY5Y resuspeses després del tractament amb DA durant 6 i 24 hores. S'observen diferències significatives amb DA-500 respecte als controls (* $P < 0,05$; *** $P < 0,001$). Els valors són la mitjana de 4 experiments \pm la MES.

El potencial de la membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), mesurat per citometria amb JC-1, també disminueix després del tractament amb DA-500 (Figura 3.1.12).



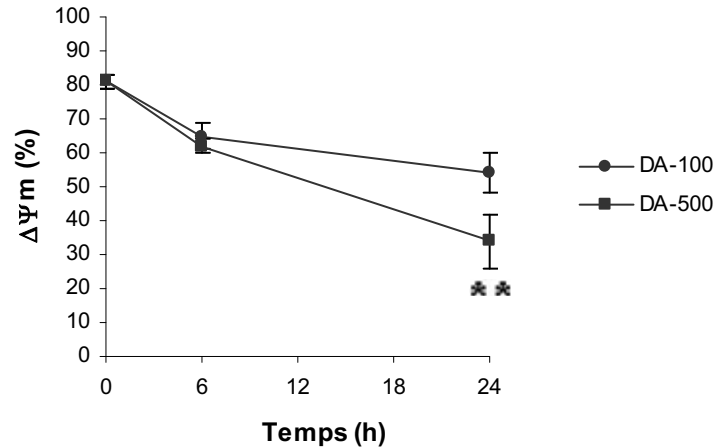


Figura 3.1.12. Mesura del potencial de la membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) després del tractament amb DA durant 24h. S'observen diferències significatives després del tractament amb DA-500 respecte als controls (** $P < 0,01$). Els valors són la mitjana de 3 experiments \pm la MES.

Producció d'espècies reactives d'oxigen

Com a mesura de l'estrès oxidatiu produït per la DA es van utilitzar els nivells de peroxidació que ens indica el marcador fluorescent DCFH-DA. L'efecte de la DA es va comparar amb el d'un potent agent peroxidant com és el tert-butilhidroperòxid (tBOOH, 100 μM), que incrementa fins a 3 cops la intensitat de la fluorescència a les 2 hores (Figura 3.1.13). En aquest període de temps la DA-500 incrementa la fluorescència un 50%, però l'efecte és molt més gran si s'afegeix 1 mM de Fe(III) al medi, que és un catalitzador de l'oxidació de la DA. Curiosament, la DA actua com antioxidant quan s'afegeix en presència de tBOOH.

A temps més llargs (Figura 3.1.14), la DA-500 continua incrementant la peroxidació, però, a l'igual que a temps curts, aquest efecte es veu potenciat per la presència de Fe(III). No obstant, la pèrdua de viabilitat és igual en absència i presència d'aquest compost (Figura 3.1.15).

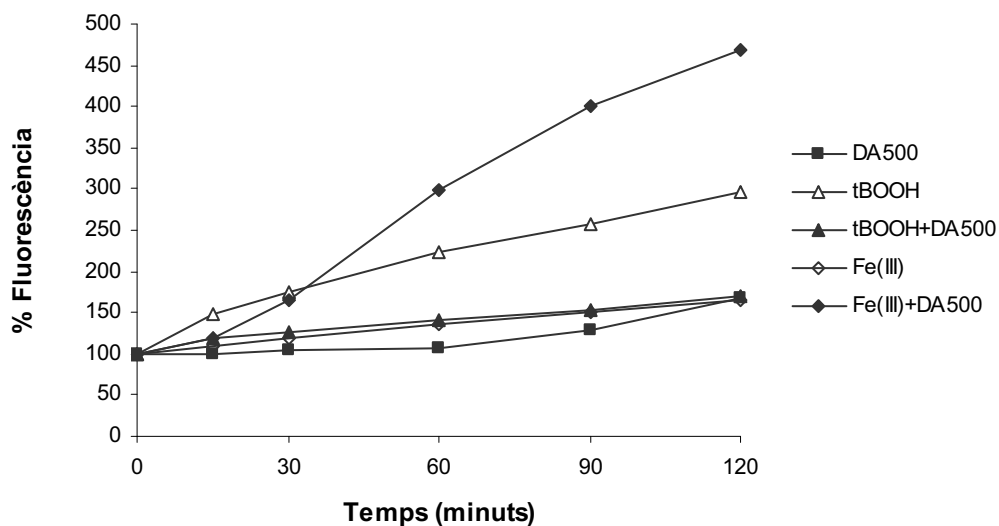


Figura 3.1.13. Mesura de la peroxidació produïda per la DA-500 en presència de tBOOH 100 μM i FeCl_3 1 mM en les cèl·lules SH-SY5Y durant 2 hores.

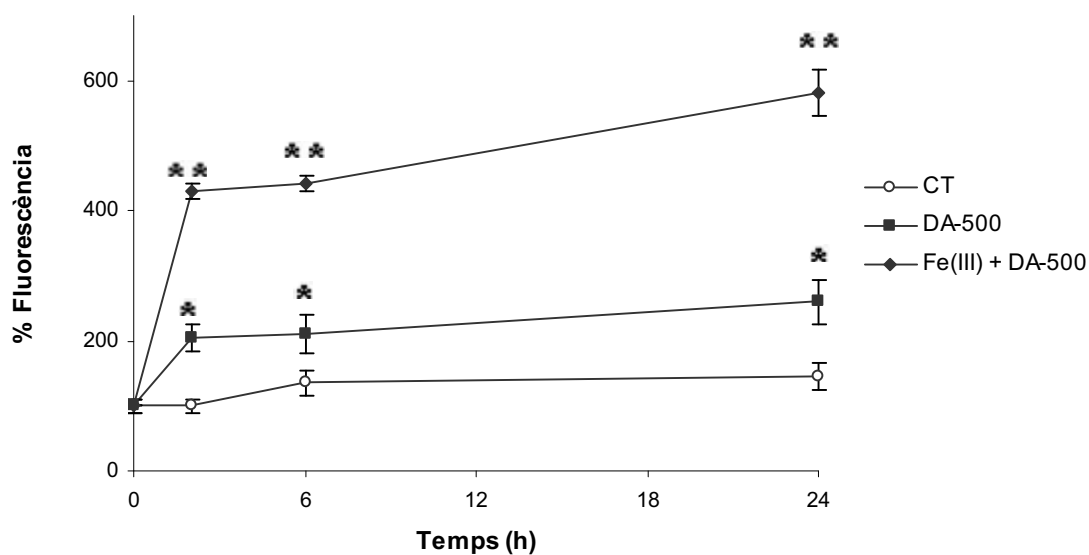


Figura 3.1.14. *Time-course* de la peroxidació produïda per la DA-500 en presència de FeCl_3 1 mM en les cèl·lules SH-SY5Y. S'observen diferències significatives respecte al control (* $P < 0,05$) i (** $P < 0,01$). Els valors són la mitjana de 3 experiments \pm la MES.

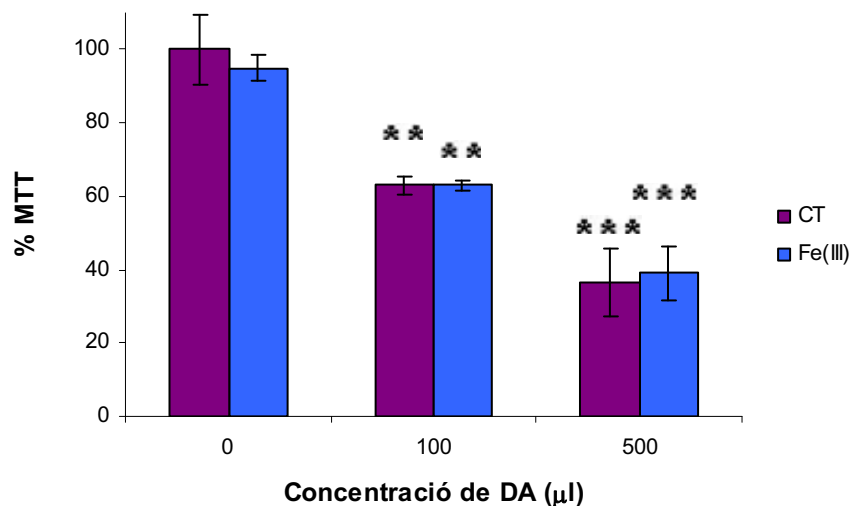


Figura 3.1.15. MTT de l'efecte de la DA en presència de FeCl_3 1 mM a les 24 hores d'incubació. S'observen diferències significatives respecte al temps inicial amb ambdues concentracions de DA (** $P < 0,01$) i (***) $P < 0,001$). Els valors estan expressats en % respecte al control i són la mitjana de 3 experiments \pm la MES.

Efecte de la DA sobre el poder reductor de la cèl·lula

La disminució relativa dels valors de MTT en l'estudi de la viabilitat era superior a la disminució de viabilitat per altres procediments. El MTT representa una mesura del potencial reductor de la cèl·lula, referit al funcionament mitocondrial i a l'estat redox cel·lular en general. Aquests resultats suggerien que la DA podria estar afectant l'equilibri redox de la cèl·lula, donat bàsicament pel contingut de NADH i NADPH (NAD(P)H). Es van estudiar, doncs, les alteracions d'aquests compostos després del tractament amb DA.

Després del tractament amb DA-500, el contingut de NADH i NADPH a l'interior cel·lular, mesurat per HPLC, disminueix a les 6 hores i sobretot a les 24 hores. Aquest efecte és manté si a les 6 hores es treu la DA. El contingut de NADH i NADPH també disminueix després del tractament amb DA-100 durant 24 hores (Figura 3.1.16).

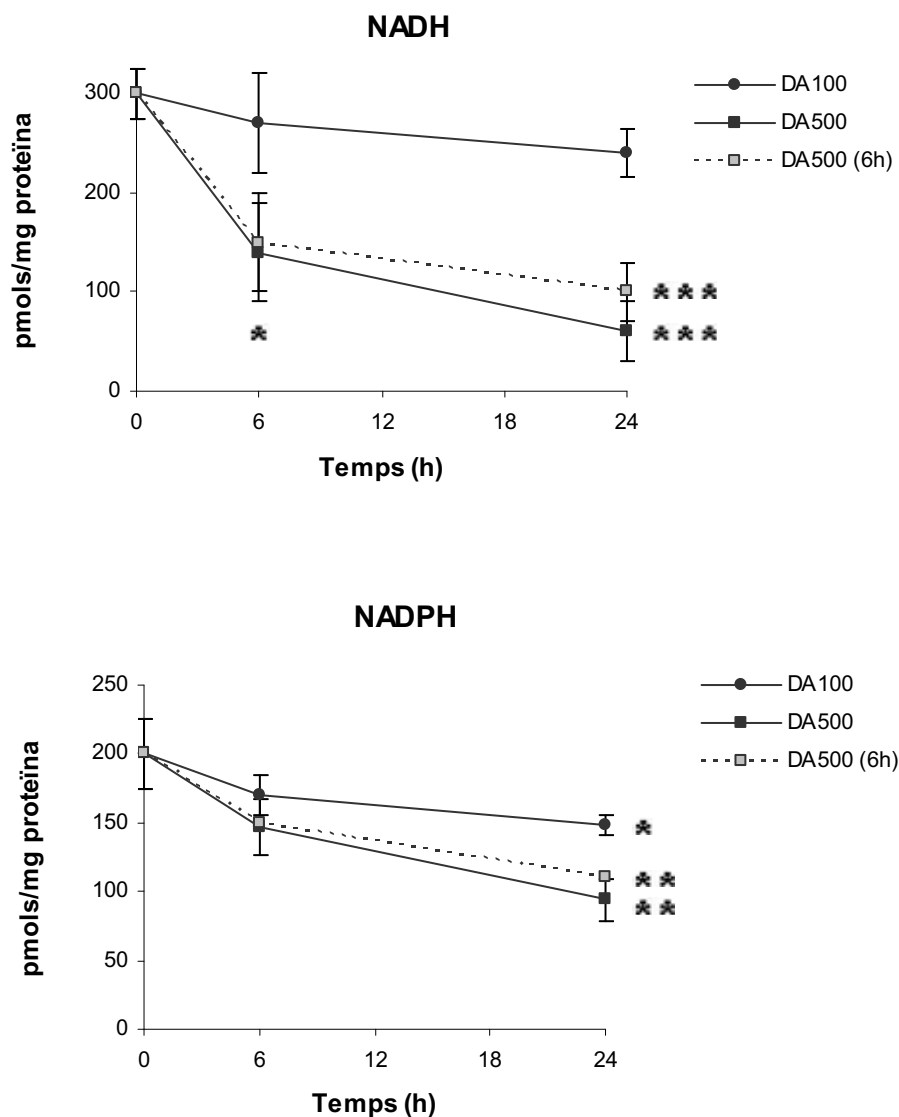


Figura 3.1.16. Contingut de NADH i NADPH en homogenats cel·lulars alcalins després de la incubació amb DA-100 i DA-500. La línia discontinua indica els valors de NADH i NADPH quan la DA-500 es va treure del medi a les 6 hores. Els valors són la mitjana de 4 mostres diferents \pm la MES. Els valors de les mostres no tractades no es van modificar als diferents temps. Les significances, * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ i *** $P < 0,001$, són respecte al control.

El poder reductor d'una cèl·lula ve donat principalment per la relació entre el NADH reduït i el NAD^+ oxidat als mitocondris i, en menor grau, al citoplasma. La relació entre el NADH i el NAD^+ al citoplasma es va determinar a partir del contingut en lactat i piruvat (Berry, 1980; Barron, *et al.*, 2004) (Taula 3.1.3). Es pot observar com la relació lactat/piruvat incrementa amb DA-100 a les 6 hores i amb DA-500 a les 6 i a les 24 hores.

Resultats

		Lac (nmol/mg prot)	Pir (nmol/mg prot)	Lac/Pir
6h	CT	624,5 ± 29,3	33,1 ± 3,7	18,9 ± 3,1
	DA-100	682,8 ± 44,7	25,2 ± 1,7	27,0 ± 2,2 *
	DA-500	702,9 ± 20,4	28,3 ± 1,5	24,8 ± 1,8 *
24h	CT	389,1 ± 25,8	28,5 ± 1,6	13,6 ± 1,1
	DA-100	419,1 ± 96,5	24,9 ± 1,0	16,8 ± 4,2
	DA-500	273,4 ± 21,9 *	7,7 ± 0,3 *	35,5 ± 2,8 *

Taula 3.1.3. Contingut de lactat (Lac), piruvat (Pir) i la relació entre aquests dos factors en les cèl·lules SH-SY5Y després del tractament amb DA-100 i DA-500 durant 6 i 24 hores. Els valors són la mitjana de 3 experiments diferents ± la MES. La significança *P<0,05 és respecte al control.

La relació entre la concentració de NADPH i la de NADP⁺ es considera proporcional a la relació entre les formes reduïda (GSH) i oxidada (GSSG) del glutatió (Adams, *et al.*, 2001) (Taula 3.1.4). Com es pot observar, tant la DA-100 com la DA-500, redueixen significativament la relació GSH/GSSG a les 24 hores. Aquesta reducció és conseqüència principalment d'un increment de la forma oxidada.

		GSH (nmol/mg prot)	GSSG (nmol/mg prot)	GSH/GSSH
6h	CT	29,4 ± 6,2	2,9 ± 0,8	10,2 ± 0,4
	DA-100	28,5 ± 3,7	3,4 ± 1,0	8,3 ± 0,8
	DA-500	20,6 ± 3,2 *	3,2 ± 1,0	6,5 ± 0,9 *
24h	CT	25,9 ± 5,8	2,4 ± 0,5	10,7 ± 1,3
	DA-100	25,7 ± 5,1	5,2 ± 0,5 *	4,9 ± 0,4 *
	DA-500	21,7 ± 5,0 *	7,0 ± 0,3 *	3,1 ± 0,4 *

Taula 3.1.4. Contingut de GSH, GSSG i la relació entre aquests dos factors en les cèl·lules SH-SY5Y després del tractament amb DA-100 i DA-500 durant 6 i 24 hores. Els valors són la mitjana de 3 experiments diferents ± la MES. La significança *P<0,05 és respecte al control.

El NADH i el NAD⁺ total i citoplasmàtic es van determinar per HPLC i per espectrofotometria. Com la diferència entre el total i el citoplasmàtic (corregits per la proteïna total) ha de correspondre principalment al mitocondrial (el contingut al nucli és molt baix respecte als altres dos compartiments), es va establir la relació entre aquests dos factors al mitocondri (Taula 3.1.5). Es pot observar com la relació NADH/NAD⁺ incrementa al citoplasma però disminueix als mitocondris després del tractament amb DA-500 durant 24 hores. No obstant, el NADH citoplasmàtic només representa menys de l'1% del total, amb lo qual aquest augment no té repercussió en el contingut total.

	CT	DA-100	DA-500
NADH _T	300 ± 25	240 ± 22 *	60 ± 12 **
NAD ⁺ _T	2860 ± 370	2650 ± 360	3020 ± 630
(NADH/NAD ⁺) _T	0,105 ± 0,013	0,091 ± 0,015	0,020 ± 0,002 ***
NADH _{cit}	1,30 ± 0,12	1,05 ± 0,10	3,70 ± 0,44 *
NAD ⁺ _{cit}	870 ± 122	570 ± 230	950 ± 250
(NADH/NAD ⁺) _{cit}	0,0015 ± 0,0001	0,0017 ± 0,0001	0,0039 ± 0,0001 *
NADH _{mit}	298 ± 30	239 ± 25	56 ± 6 **
NAD ⁺ _{mit}	1990 ± 130	2080 ± 173	2070 ± 190
(NADH/NAD ⁺) _{mit}	0,15 ± 0,02	0,11 ± 0,02	0,03 ± 0,00 **

Taula 3.1.5. Contingut de NAD⁺ i NADH (pmol/mg proteïna) i la relació NADH/NAD⁺ a la cèl·lula (T), al citoplasma (cit) i en els mitocondris (mit) en les cèl·lules SH-SY5Y després de 24 hores de tractament amb DA-100 i DA-500. S'observen diferències significatives *P<0,05; **P<0,01 i ***P<0,001 respecte als controls. Els valors són la mitjana de 3 experiments diferents ± la MES.

L'efecte de la DA en presència de NAD(P)H es va estudiar sense cèl·lules mitjançant l'anàlisi de la desaparició de NAD(P)H a 340nm i l'oxidació de la DA a 492nm. Els resultats van ser similars amb NADH i NADPH.

El contingut de NAD(P)H (100 μM) disminueix ràpidament en presència de DA (Figura 3.1.17). Aquest efecte és més dràstic quan el NADH s'incuba amb DAcr en lloc de DA.

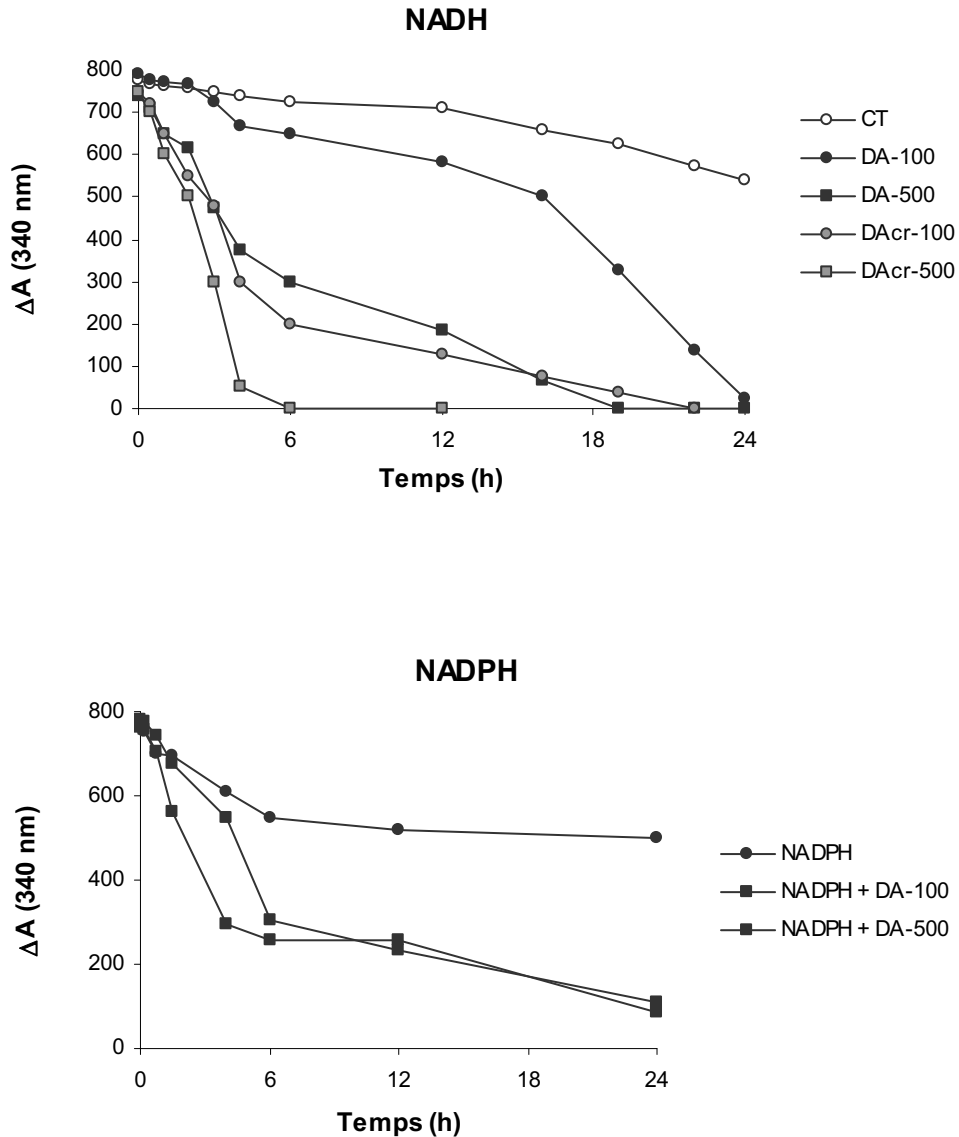


Figura 3.1.17. Disminució de l'absorbància a 340 nm en una solució que conté NAD(P)H 100 μ M en presència de DA i DAcr.

La disminució de NADH en presència de DA-500 és protegida amb GSH 5 mM i incrementa en presència de FeCl_3 1 mM. En canvi, la addició dels dos compostos, FeCl_3 i GSH, només confereix una protecció parcial (Figura 3.1.18).

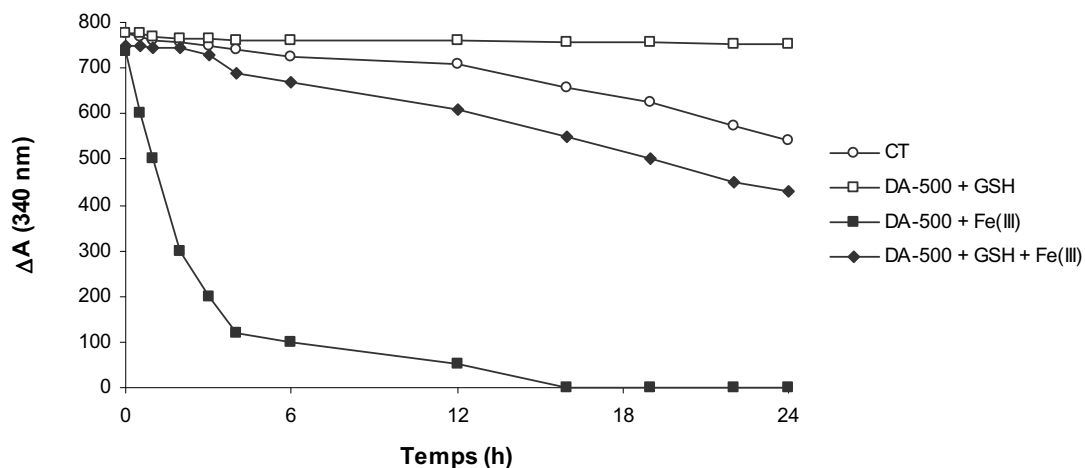
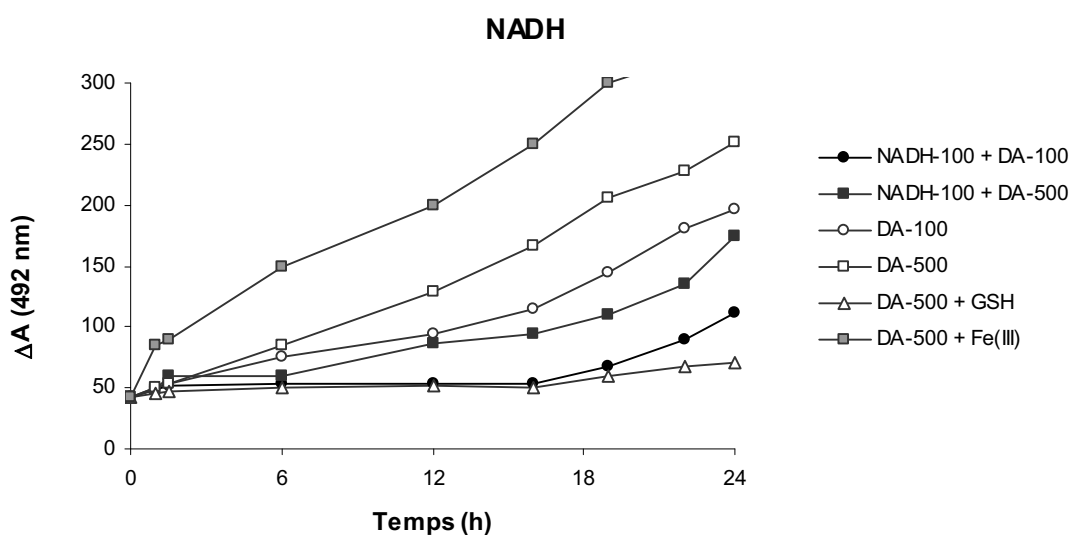


Figura 3.1.18. Disminució de l'absorbància a 340 nm en una solució que conté NADH 100 μ M en presència de DA-500, FeCl₃ 1 mM i GSH 5 mM.

A l'estudiar l'oxidació de la DA es va observar que és baixa quan hi ha NAD(P)H al medi, quan el NAD(P)H disminueix l'oxidació de la DA s'incrementa (Figura 3.1.19). Com es pot observar el Fe (III) afavoreix l'oxidació de la DA, en canvi, el GSH la protegeix.



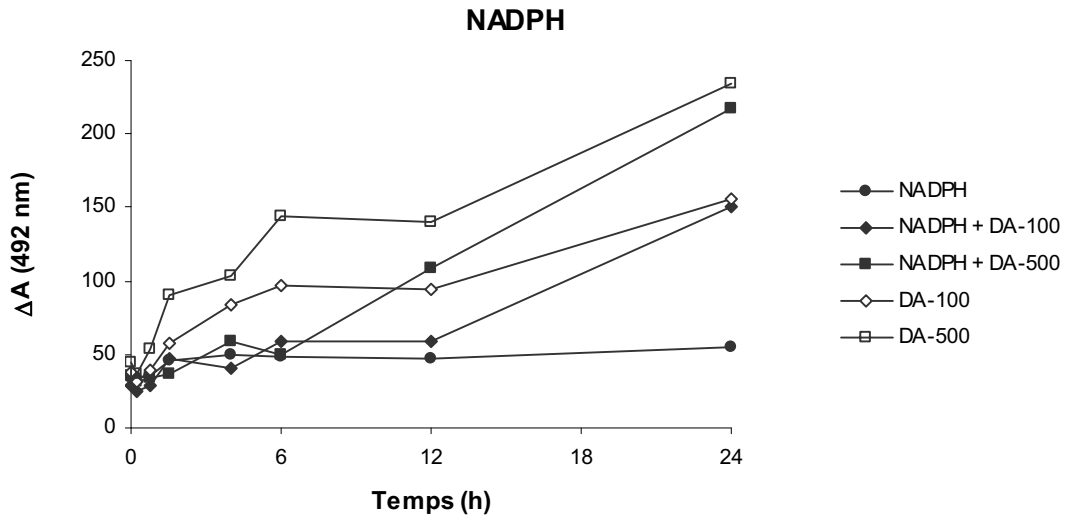


Figura 3.1.19. Increment de l'absorbància a 492 nm en una solució que conte NAD(P)H 100 μ M en presència de DA, FeCl_3 1 mM i GSH 5 mM.

DISCUSSIÓ

En aquesta part dels resultats s'ha descrit la toxicitat de la dopamina a concentracions extracel·lulars de 100 i 500 μ M (DA-100 i DA-500). Aquestes concentracions extracel·lulars són molt superiors a les que podem trobar a la *substantia nigra* i l'estriat, on trobem concentracions de l'ordre de nM en condicions basals (Santiago, *et al.*, 1996). No obstant, la concentració total de DA a l'estriat està al voltant de 70 μ M, la concentració de DA a les terminacions nervioses és de l'ordre de 0,1mM, la concentració intravesicular de DA està entre 1 i 10mM, i, finalment, la concentració de DA intersinàptica que s'assoleix durant la fase d'alliberament també s'estima entre μ M i mM (Kopin, 1993; West, *et al.*, 2003; Eisenhofer, *et al.*, 2004). L'objectiu d'aquest estudi, per tant, va ser descriure els efectes de la DA intracel·lular no vesiculada en un rang de concentracions que es podria donar intracel·lularment si la DA no fos emmagatzemada correctament a les vesícules o aquestes patissin alguna alteració que les fes buidar-se intracel·lularment.

Hem vist que la DA entra i s'acumula en les cèl·lules SH-SY5Y. Aquesta entrada probablement és deguda a la participació de transportadors de baixa afinitat per a la dopamina, com per exemple el transportador de noradrenalina (Seitz, *et al.*, 2000), els transportadors de cations orgànics no específics (OCTs) (Eisenhofer, 2001) o mitjançant una endocitosis independent de receptor (Offen, *et al.*, 1999). L'expressió

del DAT sembla ser molt baixa en aquestes cèl·lules i per tant la velocitat de transport a través d'aquests ha de ser molt lenta (Jiang, *et al.*, 2004). A més, les cèl·lules SH-SY5Y, només expressen receptors de DA després de la diferenciació amb àcid retinoic, amb lo qual no resultaven ser candidats per explicar el procés tòxic aquí descrit.

Durant els experiments realitzats hem observat que la concentració més elevada de DA (DA-500) tindria efectes citotòxics en les cèl·lules SH-SY5Y. Aquest resultat és similar al trobat per altres autors (Pifl, *et al.*, 2001).

La DA-100 no va ser suficient en el nostre model per afectar la proliferació cel·lular o la viabilitat, mesurades mitjançant la captació de [³H]-timidina i la tinció amb taronja d'acridina i bromur d'etidi respectivament. No obstant, es va observar un descens de la viabilitat utilitzant la tècnica del MTT. Aquesta discrepància en els resultat es pot atribuir a les diferències entre els dos processos per mesurar la viabilitat. El bromur d'etidi no marca les cèl·lules que mantenen una integritat de la membrana plasmàtica, en canvi, el MTT és un paràmetre molt sensible al poder reductor de la cèl·lula, que reflexa la funció mitocondrial i l'estat redox de la cèl·lula (Berridge, *et al.*, 1993). Els resultats del MTT probablement sobreestimen l'efecte de la DA sobre la viabilitat cel·lular, indicant una alteració en l'estat redox de la cèl·lula fins i tot quan la viabilitat cel·lular és encara preservada, com amb la DA-100.

L'efecte de la DA sobre la viabilitat cel·lular pot ésser atribuït principalment a la DA que s'acumula a l'interior de la cèl·lula. Encara que un efecte directe de l'oxidació extracel·lular de la DA sobre la membrana plasmàtica no es pot descartar, pensem que és poc important, ja que la peroxidació dels lípids de la membrana no és massa alta i sobre tot l'efecte sobre la viabilitat no es preserva quan la DA s'elimina del medi a partir de 3 hores d'incubació. A més, antioxidants extracel·lulars com la catalasa no protegeixen de la toxicitat de la DA (Gómez-Santos, *et al.*, 2003).

La inhibició de l'activitat de la MAO amb TCP només té un lleuger efecte protector amb la DA-100. Això ens fa pensar que la MAO té un paper poc important en la toxicitat de la DA. Assumint que la toxicitat de la DA es deu a la seva transformació no enzimàtica, l'increment en la peroxidació causat per la DA-500 va ser relativament petit comparat amb el produït pel tBOOH 100 µM, per pensar que la producció de peròxids pot ésser la causa directa de la mort cel·lular. A més, l'increment produït pel tBOOH és

reduït sensiblement en presència de la DA, indicant que la DA pot tenir un paper antioxidant en presència de compostos més oxidants (Sofic, *et al.*, 2001).

Quan les cèl·lules s'incuben amb DA-100, l'activitat MAO és possiblement suficient per metabolitzar aquesta DA fins a DOPAC. Això s'observa a la Taula 3.1.2 a partir de la qual podem deduir que la concentració de DA a l'interior cel·lular és aproximadament de 7 μM i la de DOPAC 90 μM després de 24 hores d'incubació amb DA-100. En canvi després del tractament amb DA-500 una gran part de la DA no és metabolitzada, indicant una saturació o una inhibició de la MAO. Com hem vist, un dels principals productes de l'autooxidació de la DA, el DAc, inhibeix l'activitat de la MAO-A amb una IC_{50} de 49 μM , concentració que pot ben ser assolida al voltant dels mitocondris amb DA-500. La inhibició de la MAO afavoriria l'acumulació de DA i evitaria l'increment de peròxids com a conseqüència del metabolisme enzimàtic d'aquesta, reduint l'estrès oxidatiu i potenciant la viabilitat, com es veu amb la DA-100 més el TCP.

La DA també sembla alterar la funció mitocondrial pròpiament dita. El consum d'oxigen queda reduït a un 20% i el potencial mitocondrial a un 50% després del tractament amb DA-500 durant 24 hores. Ha estat descrit que la DA redueix el consum d'oxigen en suspensions de mitocondries lliures (Ben-Shachar, *et al.*, 2004). Alteracions en el complex I i el DAc semblen estar implicades en aquest procés (Ben-Shachar, *et al.*, 2004; Zoccarato, *et al.*, 2005). Cal remarcar que la DA s'oxida més fàcilment en un medi lleugerament bàsic, com el que hi ha a la matriu mitocondrial (pH 7,9-8,0).

Les mesures de NADH i NADPH indiquen que la DA disminueix el poder reductor de la cèl·lula. Aquest efecte es manté a les 24 hores encara que la DA s'hagi tret del medi a les 6 hores d'incubació, indicant que la dopamina intracel·lular produeix canvis permanents. La falta del subministrament de H per part del NADH afectaria als mitocondris, produint una situació d'hipòxia-like i un descens de la producció aeròbica d'ATP (Ben-Shachar, *et al.*, 2004). Com a la hipòxia, la glicòlisis anaeròbica s'incrementa, com s'observa a les relacions citoplasmàtiques [lactat]/[piruvat] i [NADH]/[NAD⁺] (Berry, *et al.*, 1980; Barron, *et al.*, 2004).

Els antioxidants que actuen intracel·lularment tenen un paper molt important en la prevenció de l'oxidació de la DA i la seva toxicitat. De fet, l'àcid ascòrbic i la N-acetilcisteïna (NAC), a concentracions suficientment altes per incrementar la seva

presència a l'interior cel·lular, protegeixen la cèl·lula front a la toxicitat de la DA (Gómez-Santos, *et al.*, 2003). Encara no sabem perquè el contingut de GSH intracel·lular no és suficient per evitar la toxicitat de la DA, no obstant, la presència d'un catalitzador de l'oxidació de la DA, com el Fe (III), afavoreix l'oxidació de la DA i fa disminuir l'efecte protector del GSH. Cal destacar que a la *substantia nigra* hi ha una concentració de Fe (III) semblant a la utilitzada (Zecca, *et al.*, 2004).

L'acció antioxidant del GSH depèn de la relació [GSH]/[GSSG]. Hem vist que amb DA-100 i DA-500 aquesta relació disminueix a les 24 hores. Aquest efecte és degut principalment a l'acumulació de la forma oxidada GSSG, en canvi la síntesi de la GSH, que esperariem trobar disminuïda per l'acumulació de NADP⁺ i per l'unió a dopaquinones (Emdadul Haque, *et al.*, 2003), està incrementada, almenys amb DA-100, molt possiblement per l'efecte estimulador de la seva síntesi com a resposta de la disminució de la relació GSH/GSSG (Soltaninassab, *et al.*, 2000)

La relació [GSH]/[GSSG] es considera indicativa de la relació [NADPH]/[NADP⁺] perquè: $2\text{GSH} + 2\text{NADP}^+ \leftrightarrow \text{GSSG} + 2\text{NADPH}$. Aquesta reacció està catalitzada per la glutatió peroxidasa quan es produeix GSSG, i per la glutatió reductasa quan es produeix GSH. Per tant, es pot considerar que la relació [NADPH]/[NADP⁺] disminueix després de 24 hores de tractament amb DA. Això afectaria als mecanismes que depenen del NADPH, com la NADPH oxidasa, NADPH diaforases i les bombes de H⁺ dependents de NADPH al reticle endoplasmàtic i als lisosomes.

El potencial reductor de la conversió de DA a DAcr és de -0,240 V (Shen, *et al.*, 1996). Els potencials reductors pel NADH i NADPH, són -0,320 i -0,322 V respectivament. Donats aquests valors i considerant que les concentracions intracel·lulars de NADH (entre 50 i 100 μM) són similars o inferiors que les concentracions intracel·lulars de DA després de 24 hores de tractament, es va analitzar l'oxidació del NAD(P)H en una solució en presència de DA i DAcr, i es va observar que el NAD(P)H és ràpidament oxidat.

Tenint en compte aquests resultats podem suposar que té lloc la següent seqüència de reaccions:



El NAD(P)H s'oxidaria en presència de les formes oxidades de la dopamina com el DAcr i les dopaquinones, regenerant la forma reduïda de la DA en un cicle que disminuiria el contingut intracel·lular de NAD(P)H (Figura 3.1.20). L'existència d'un cicle similar a ha estar descrita a la literatura (Graumann, *et al.*, 2002).

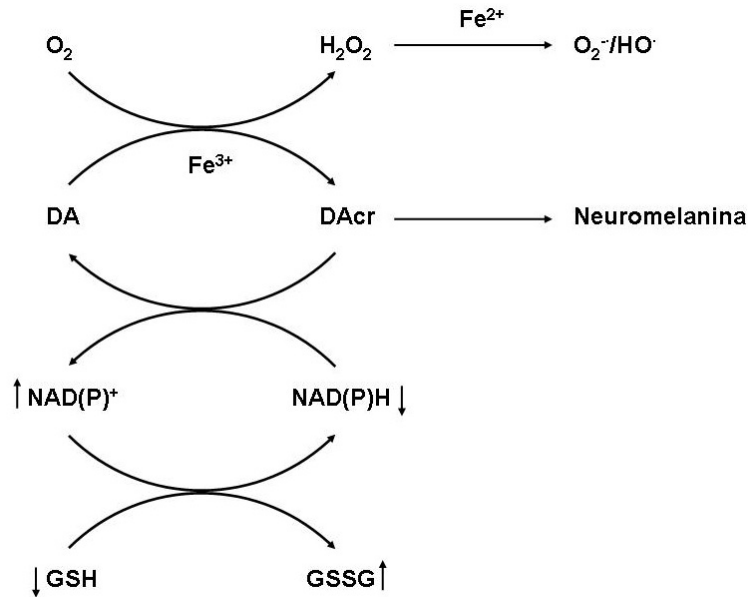


Figura 3.1.20. Diagrama proposat per l'efecte de la DA sobre el potencial reductor de la cèl·lula. La DA s'oxidaria en presència d' O_2 originant H_2O_2 . La DA oxidada seria reduïda pel contingut intracel·lular de NAD(P)H en un cicle on els nivells de NAD(P)H disminuirien i els nivells de glutatió oxidat (GSSG) incrementarien.

Aquets resultats recolzen la hipòtesi de que l'acumulació de DA, principalment en les neurones dopaminèrgiques de la via nigro-estriatal, podria tenir un gran risc quan els sistemes antioxidants de la cèl·lula o els mecanismes que impedeixen l'acumulació d'aquesta no funcionen o es troben disminuïts.

**EFFECTE DE LA DOPAMINA SOBRE L'EXPRESSION DE
PROTEINES EN CEL·LULES SH-SY5Y**

INTRODUCCIÓ

En un treball anterior del nostre laboratori es va observar que la DA induïa mort cel·lular en la línia de neuroblastoma humà SH-SY5Y, acompanyada de l'aparició d'estructures autofàgiques. Durant aquest procés hi ha una activació de les vies de la JNK i de p38. Contemporàniament a l'activació d'aquesta resposta cel·lular també hi ha un increment de l' α -sinucleïna (Gómez-Santos, *et al.*, 2003).

Amb l'objectiu d'esbrinar els mecanismes responsables d'aquesta mort es va realitzar un *microarray* proteòmic de 400 proteïnes implicades en mort cel·lular a partir de cèl·lules SH-SY5Y tractades amb DA. Mitjançant aquest procediment es va observar que l'expressió de 33 proteïnes estava significativament incrementada i que l'expressió de 29 proteïnes estava significativament disminuïda després del tractament amb DA-500 durant 12h (Taula 3.2.1) (Els resultats complets del *microarray* es troben al final del capítol, Taula 3.2.2).

GADD153 és la segona proteïna més augmentada per la DA i ens varem centrar en ella perquè és un homòleg del factor de transcripció C/EBP β , proteïna que també augmentava al *microarray* i que varem trobar interessant pel fet de que C/EBP β presenta fins a 8 potencials caixes d'interacció en el promotor de l' α -sinucleïna (Touchman, *et al.*, 2001).

En mamífers, la família de factors de transcripció C/EBP (*CCAAT/enhancer binding proteins*) consta de 6 membres ($\alpha, \beta, \gamma, \delta, \epsilon$ i ζ). Aquests factors es caracteritzen per la presència d'un domini del tipus cremallera de Leu a l'extrem C-terminal, molt conservat entre els diferents membres de la família i que participa en la formació d'homodimers i heterodimers. En canvi l'extrem N-terminal, que és un domini transactivador, presenta més diferències.

S'ha descrit que els membres d'aquesta família participen en la regulació de diferents aspectes de la diferenciació cel·lular com la proliferació, l'expressió de gens i la regulació del cicle cel·lular (Lekstrom-Himes, *et al.*, 1998).

Inicialment C/EBP β va ésser descrit en cèl·lules del fetge (Descombes, *et al.*, 1990). Posteriorment es va veure que tenia un paper molt important en la diferenciació

de limfòcits (Muller, *et al.*, 1995) i adipòcits (Cao, *et al.*, 1991). També s'expressa a cervell (Sterneck, *et al.* 1998).

L'activitat transcripcional de C/EBP β estaria controlada per fosforilació (Nakajima, *et al.*, 1993; Buck, *et al.*, 1999). A més a més, està descrit que GADD153 pot ser un dominant negatiu de C/EBP β , no obstant, GADD153 prefereix formar homodímers (Ron, *et al.*, 1992).

Entre les proteïnes regulades per C/EBP β trobem mediadors de la inflamació com IL-1b, IL-6 i TNF- α (Poli, 1999).

GADD153 és un factor de transcripció que va ser identificat durant la recerca de gens induïts per estímuls genotòxics com la radiació ultraviolada (Fornace, *et al.*, 1988). No obstant això, sembla que està relacionat principalment amb processos de mort cel·lular en situacions d'estrès reticular (Fawcett, *et al.*, 1996). El mecanisme pel qual l'estrès al RE produeix mort cel·lular és encara desconegut, no obstant, GADD153, situat *downstream* d'ATF4, pot tenir un paper important (Zinszner, *et al.*, 1998). Els mediadors situats *downstream* d'aquest efecte encara no es coneixen, però s'ha demostrat que alguns del efectes tòxics produïts per GADD153 són resultat de la inducció de GADD34 (Marciniak, *et al.*, 2004).

Ha estat descrit que la deleció de GADD153 té un paper protector de l'apoptosi induïda per l'òxid nítric en les cèl·lules β del pàncrees (Oyadomari, *et al.*, 2001) i en models de parkinsonisme (Silva, *et al.*, 2005). En relació amb això s'ha vist que la sobreexpressió de GADD153 sensibilitza les cèl·lules a la toxicitat produïda per l'estrès reticular (McCullough, *et al.*, 2001).

Un altre factor situat *downstream* de GADD153 és ERO1, que codifica per una oxidasa del RE que podria estar relacionada amb la producció de ROS observada en situacions d'estrès reticular (McCullough, *et al.*, 2001; Marciniak, *et al.*, 2004).

GADD153 és un homòleg de C/EBP β i presenta els mateixos dominis funcionals. El domini en cremallera de Leu permet a GADD153 homodimeritzar i heterodimeritzar amb altres membres de la família C/EBP (Ron, *et al.*, 1992). A més a més, GADD153 presenta dos residus de Ser adjacents (79 i 82) que poden servir de substrat a la família de p38 (Wang, *et al.*, 1996).

GADD153 s'expressa a tots els teixits en condicions basals però a nivells baixos. GADD153 es troba al citosol quan la cèl·lula no està estressada, en canvi a conseqüència d'un estrès, la seva expressió s'indueix i s'observa preferentment al nucli (Ron, *et al.*, 1992).

La inducció de la transcripció de GADD153 en una situació d'estrès reticular pot ésser conseqüència de qualsevol de les tres vies que participen en la senyalització de l'estrès (PERK, ATF6 i IRE1) (Oyadomari, *et al.*, 2004).

En un altre treball del nostre laboratori es va confirmar també l'augment de l'expressió del TNFR1 (receptor de TNF α), la proteïna que més variava en el *microarray* (Gómez-Santos, *et al.*, 2007).

Nom	$R_{DA/C} \pm MES$	Nom	$R_{DA/C} \pm MES$
TNFR1	(9.0 \pm 1.2)	Csk	(3.2 \pm 0.6)
GADD153	(7.5 \pm 0.2)	IFN- α Ra	(3.0 \pm 0.5)
DR3	(7.2 \pm 1.1)	C-IAP-2	(2.9 \pm 0.5)
INOS	(6.7 \pm 0.5)	TRAF5	(3.0 \pm 0.3)
ICSBP	(6.5 \pm 0.5)	IRF2	(2.9 \pm 0.1)
STAM	(5.9 \pm 0.9)	PDGF Ra	(2.8 \pm 0.5)
PP1, 2A, 2B	(5.0 \pm 0.4)	Hdlg	(2.8 \pm 0.8)
TRAF6	(4.9 \pm 0.2)	Bim	(2.7 \pm 0.6)
TRADD	(4.8 \pm 1.0)	DAXX	(2.6 \pm 0.7)
IRF1	(4.5 \pm 0.6)	Caspase-3	(2.6 \pm 0.8)
PARP	(4.2 \pm 0.3)	PAR4	(2.6 \pm 0.8)
IRAK	(4.1 \pm 0.8)	CD28	(2.3 \pm 0.5)
NFATC	(4.0 \pm 0.4)	Ikappa B-r	(2.3 \pm 0.5)
Sam68	(4.0 \pm 0.9)	C-IAP1	(2.0 \pm 0.3)
Nip3	(3.9 \pm 0.2)	C/EBP β	(1.9 \pm 0.6)
Axl	(3.8 \pm 0.7)	AKT1/2	(1.9 \pm 0.7)
GAK	(3.8 \pm 0.7)		
<hr/>			
BLCAM	(0.2 \pm 0.02)	Bcl-w	(0.3 \pm 0.08)
Connexin43	(0.2 \pm 0.04)	FGFR4	(0.3 \pm 0.08)
Dynamin II	(0.2 \pm 0.05)	IL1R1	(0.3 \pm 0.05)
E2F1	(0.2 \pm 0.05)	L1	(0.3 \pm 0.05)
EphA4	(0.2 \pm 0.05)	Max	(0.3 \pm 0.06)
FGFR3	(0.2 \pm 0.05)	Patched 1/2	(0.3 \pm 0.06)
FLASH	(0.2 \pm 0.07)	MGMT	(0.4 \pm 0.03)
HDAC1	(0.2 \pm 0.07)	P36	(0.4 \pm 0.05)
GSK3 α	(0.2 \pm 0.07)	P45 skp2	(0.4 \pm 0.05)
Integrin α 1	(0.2 \pm 0.05)	Ran	(0.4 \pm 0.07)
Integrin β 3	(0.2 \pm 0.04)	IL2 R β	(0.4 \pm 0.08)
PSD-95	(0.2 \pm 0.05)	Syntaxin6	(0.4 \pm 0.09)
Blk	(0.2 \pm 0.03)	Phospholipase D	(0.4 \pm 0.1)
cFgr	(0.2 \pm 0.03)	SHC	(0.5 \pm 0.03)
Bcl-3	(0.3 \pm 0.03)		

Taula 3.2.1. Llista de proteïnes significativament modificades en les cèl·lules SH-SY5Y després del tractament amb DA-500 durant 12h. Entre parèntesis està la ràtio entre les cèl·lules tractades i els controls no tractats \pm la MES.

RESULTATS

Efecte dependent de la dosi de DA en l'expressió de GADD153, C/EBP β i α -sinucleïna

Els increments en l'expressió de GADD153 i C/EBP β després del tractament amb DA van ser confirmats per Western blot (Figura 3.2.1). Com es pot observar, l'increment de GADD153 només és important amb concentracions elevades de DA (500 μ M). En canvi, l' α -sinucleïna mostra un increment gradual i dependent de la dosi després del tractament amb DA, mentre que l'expressió de C/EBP β ja es veu incrementada a baixes concentracions de DA (10 μ M).

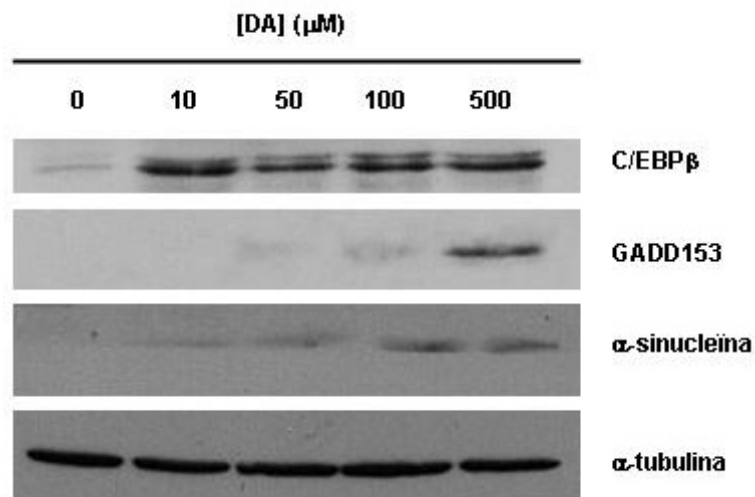


Figura 3.2.1. Western-blot de l'expressió de C/EBP β , GADD153 i α -sinucleïna després de 6h de tractament amb diferents concentracions de DA.

Time-course de l'efecte de la DA

Un cop comprovats els increments d'aquestes proteïnes ens varem plantejar comprovar a quins temps tenien lloc els increments amb les dosis de DA-100 i DA-500. GADD153 augmenta lleugerament amb DA-100 i de forma important amb DA-500 a partir de les 6 hores. En canvi, C/EBP β incrementa principalment després de 12h de tractament i aquest increment és més gran amb DA-100. A l'igual que C/EBP β ,

l'augment de l' α -sinucleïna entre les 6 i les 24 hores és més gran amb DA-100 que amb DA-500 (Figures 3.2.2 i 3.2.3).

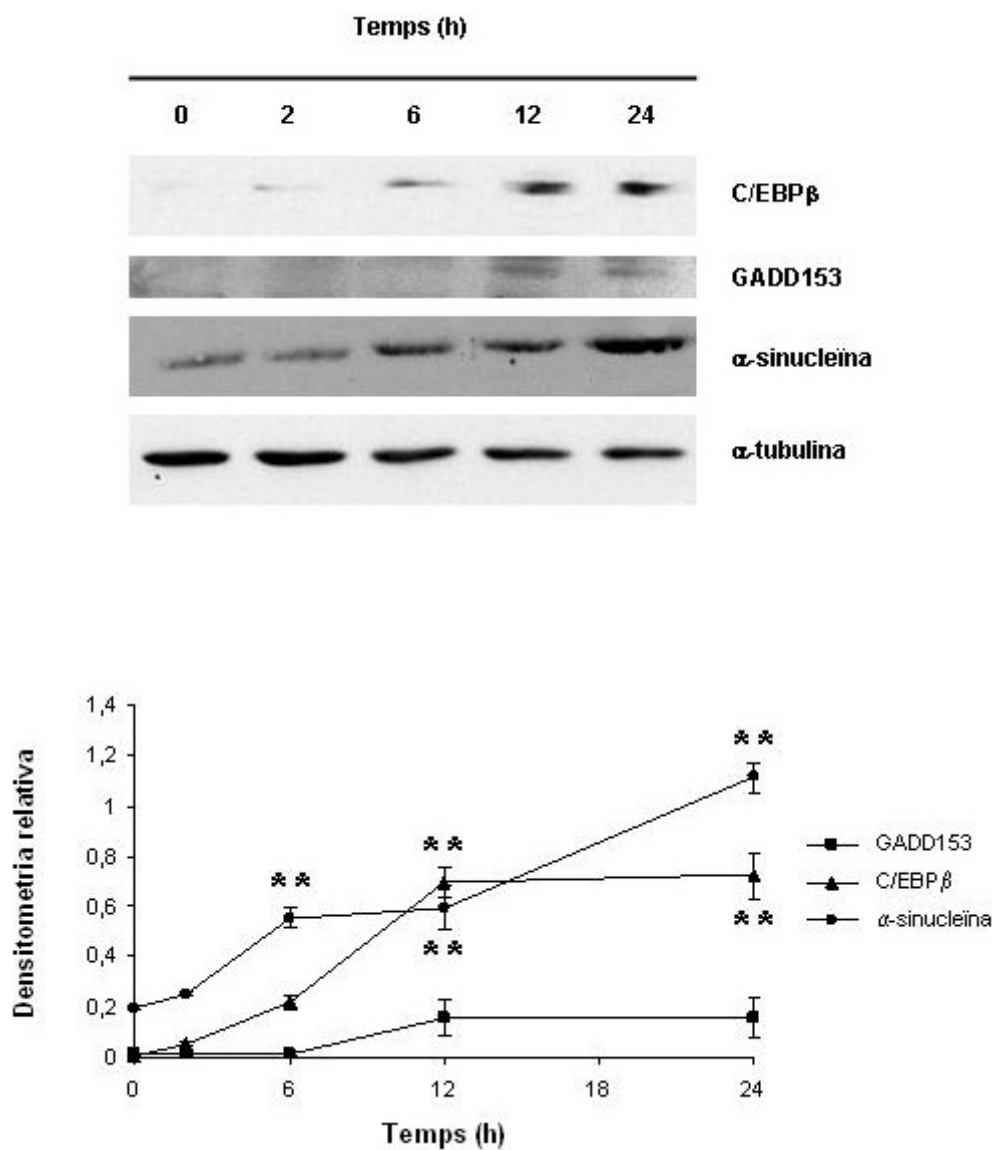


Figura 3.2.2. *Time-course* i densitometria de l'expressió per Western blot de C/EBP β , GADD153 i α -sinucleïna després del tractament amb DA-100. Les densitometries estan en relació a l' α -tubulina de cada proteïna. Els resultats són la mitjana de 3 experiments \pm la MES. La significança $**P < 0,01$ és respecte als controls (temps 0).

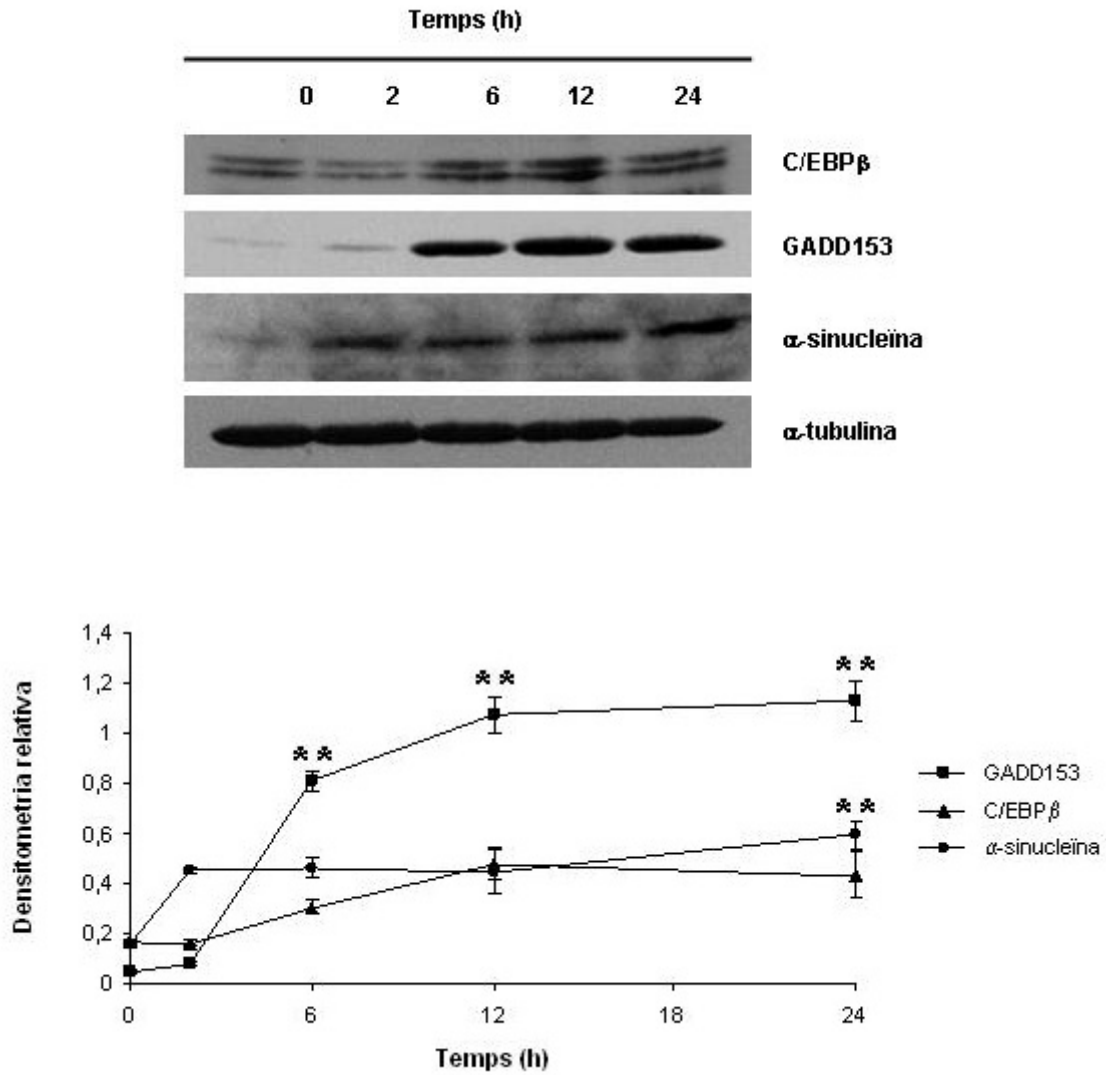


Figura 3.2.3. *Time-course* i densitometria de l'expressió per Western blot de C/EBPβ, GADD153 i α-sinucleïna després del tractament amb DA-500. Les densitometries estan en relació a l'α-tubulina de cada proteïna. Els resultats són la mitjana de 3 experiments ± la MES. La significança **P<0,01 és respecte als controls (temps 0).

Efecte de la DA-100 sobre l'expressió de C/EBPβ

L'increment en l'expressió de C/EBPβ induït per la DA-100 és dependent de la síntesi proteica, ja que és bloquejat amb cicloheximida (CHX), i està disparat per un procés d'oxidació, ja que no hi ha increment quan les cèl·lules es tracten conjuntament amb l'antioxidant N-acetilcisteïna (Figura 3.2.4). L'inhibidor d'autofàgia 3-MA no ens evita l'increment de C/EBPβ.

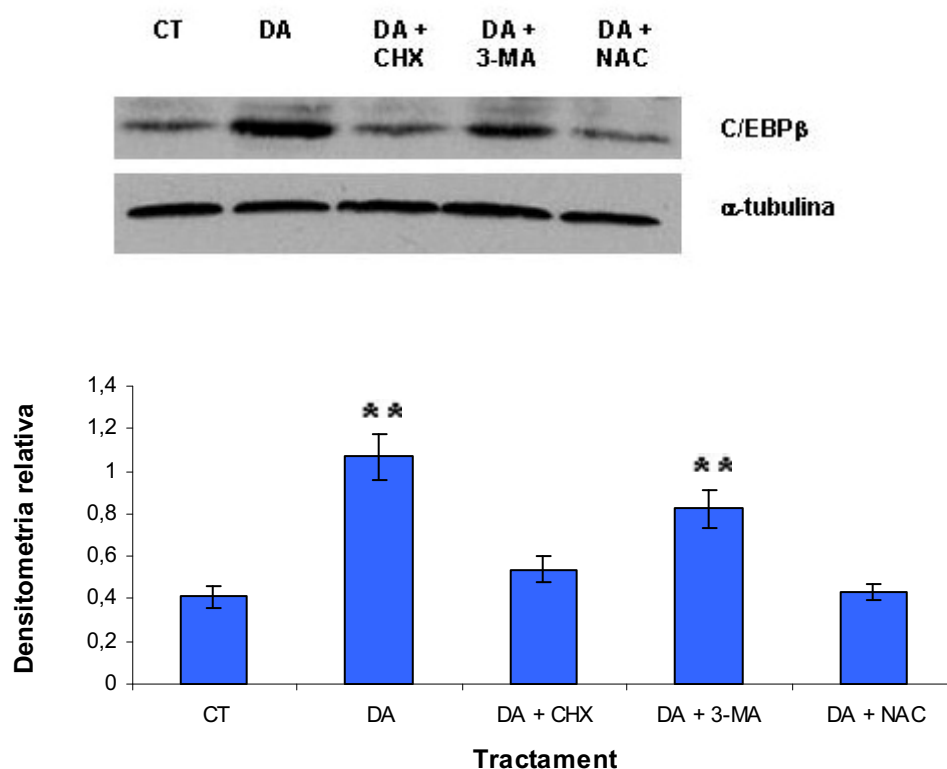
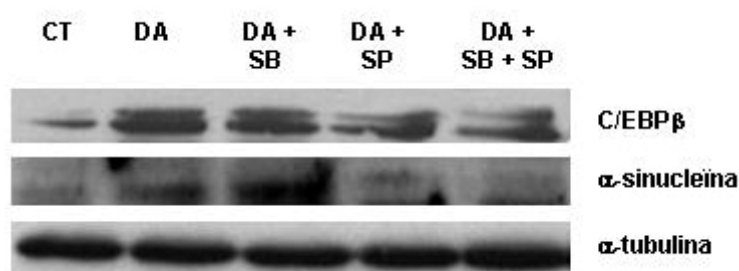


Figura 3.2.4. Efecte de la cicloheximida (CHX, 1 μ g/ml), 3-metiladenina (3-MA) i N-acetilcisteïna (NAC) en l'expressió de C/EBP β després de 8 hores de tractament amb DA-100. Els resultats són la mitjana de 3 experiments \pm la MES. La significança $**P < 0,01$ és respecte al control.

Els increments de C/EBP β i α -sinucleïna induïts per DA-100 es veuen reduïts amb SP600125 (inhibidor de la JNK). En canvi, el SB203580 (inhibidor de p38) no té cap efecte (Figura 3.2.5).



Resultats

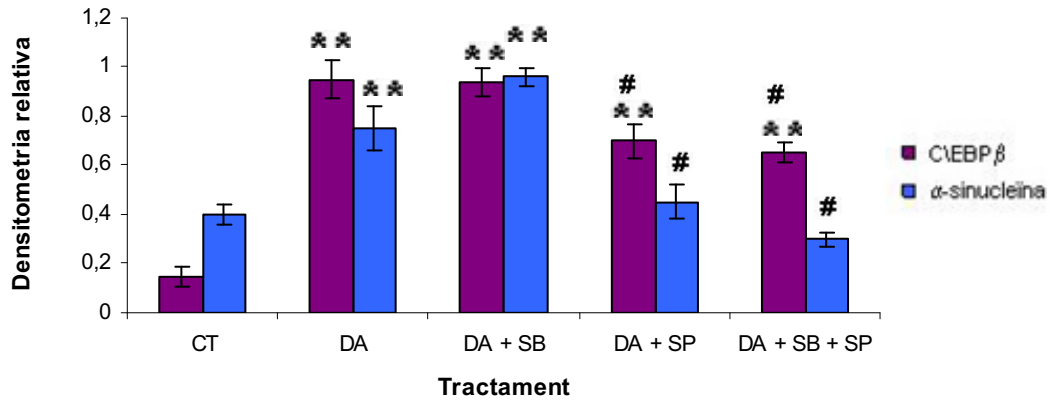


Figura 3.2.5. Efecte del SP600125 (SP, 10 μ M) i del SB203580 (SB, 30 μ M) en l'expressió de C/EBP β i α -sinucleïna després de 8 hores de tractament amb DA-100. Els resultats són la mitjana de 3 experiments \pm la MES. Les significances **P<0,01 i #P<0,05 són respecte al control i al tractament amb DA respectivament.

Efecte de la DA-500 sobre l'expressió de GADD153 i l'estrès reticular

L'increment de GADD153 també és dependent de la síntesi proteica i d'un procés d'oxidació, ja que no augmenta en presència de CHX ni de N-acetilcisteïna (Figura 3.2.6). L'inhibidor d'autofàgia 3-MA no evita l'increment de GADD153.

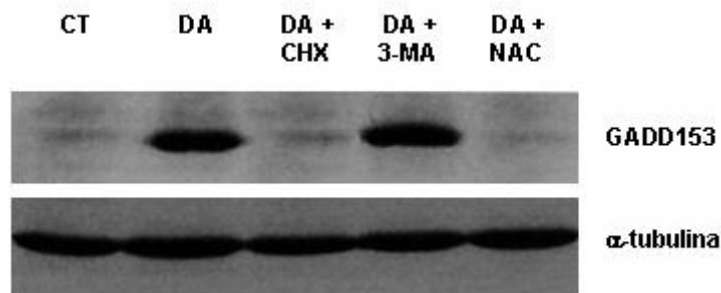


Figura 3.2.6. Efecte de la cicloheximida (CHX, 1 μ g/ml), 3-metiladenina (3-MA, 10 mM) i N-acetilcisteïna (NAC, 2,5mM) en l'expressió de GADD153 després de 8 hores de tractament amb DA-500.

Com GADD153 està relacionada amb una situació d'estrès reticular, es va estudiar l'efecte de la DA-500 sobre l'expressió de la txaperona de reticle endoplasmàtic grp78/Bip, l'expressió de la qual incrementa després d'una situació d'estrès reticular (Figura 3.2.7). Com es pot observar, l'increment de GADD153 es correlaciona, almenys a les 12h, amb un increment en la proteïna grp78/BiP. La fosforilació d'eIF2 α , un factor que resulta activat *up-stream* a la via de GADD153 després del tractament amb 6-OHDA i MPP⁺ (Ryu, *et al.*, 2002; Conn, *et al.*, 2002), no es veu modificada pel tractament amb DA.

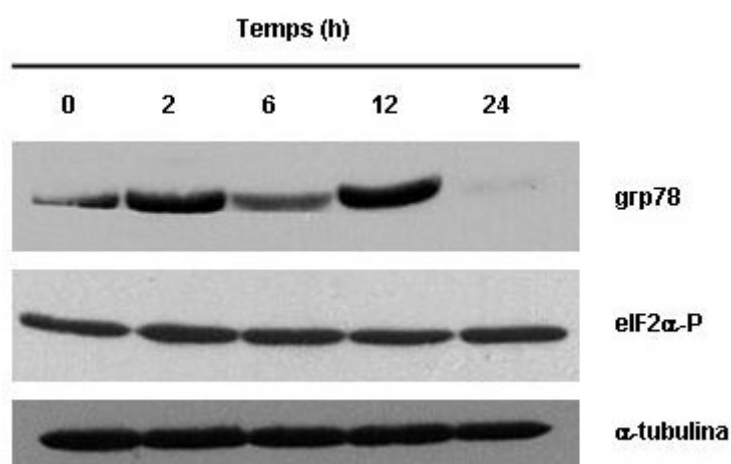


Figura 3.2.7. *Time-course* de l'expressió per Western blot de grp78 i eIF2 α -P després del tractament amb DA-500.

Dos compostos causants d'estrès reticular es van utilitzar com a controls positius, taspigargina (disminueix les reserves de calci emmagatzemades al reticle endoplasmàtic) i tunicamicina (inhibidor de la glicosilació de proteïnes). Aquests dos compostos causen un marcat increment en l'expressió de GADD153 i grp78 (Figura 3.2.8).

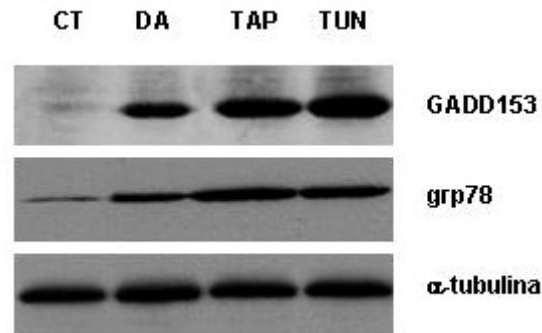


Figura 3.2.8. Efecte de la DA-500, la tapsigargina (TAP, 5 μ M) i la tunicamicina (TUN, 30 μ M) sobre l'expressió de GADD153 i grp78 després de 8 hores de tractament.

ATF6, un altre factor implicat en la senyalització de l'estrès reticular i l'expressió de GADD153, no es modifica després del tractament amb DA-500 (Figura 3.2.9).

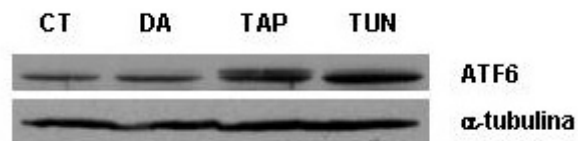


Figura 3.2.9. Efecte de la DA-500, la tapsigargina (TAP, 5 μ M) i la tunicamicina (TUN, 30 μ M) sobre l'expressió d'ATF6.

Com que alteracions en el reticle endoplasmàtic poden induir alteracions en l'homeòstasi del calci, es va analitzar l'efecte de la DA sobre el calci intracel·lular mitjançant el marcador Fluo-4 (Figura 3.2.10). Com es pot observar, la DA produeix un increment del calci intracel·lular.

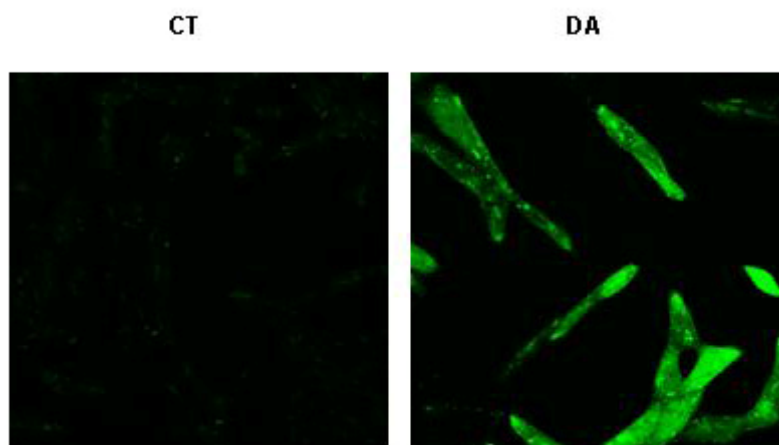


Figura 3.2.10. Visualització mitjançant microscòpia confocal de l'efecte de la DA-500 sobre el calci intracel·lular després de 12h de tractament.

Finalment la inhibició de l'activitat de p38 i JNK al mateix temps, respectivament amb SB203580 i SP600125, però no la de cadascuna per separat, produeix una inhibició en l'increment de GADD153 després del tractament amb DA-500 (Figura 3.2.11).

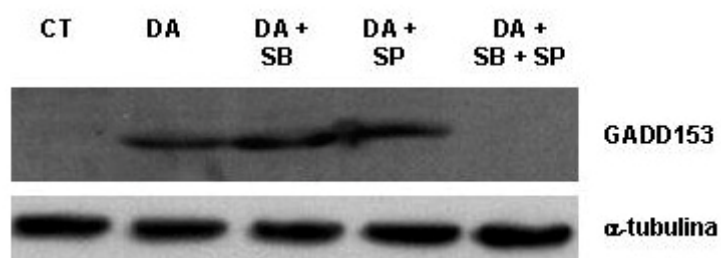


Figura 3.2.11 Efecte del SP600125 (SP, 10 μ M) i del SB203580 (SB, 30 μ M) sobre l'expressió de GADD153 després de 8 hores de tractament amb DA-500.

Transfecció de C/EBP β i GADD153

La sobreexpressió de C/EBP β en les cèl·lules SH-SY5Y transfectades amb un plàsmid que conté el gen de la C/EBP β humana produeix un increment en l'expressió d' α -sinucleïna (Figura 3.2.12). Aquest efecte no s'observa en les cèl·lules

transfectades amb GADD153 (Figura 3.2.13) i que presenten una sobreexpressió d'aquesta proteïna, indicant que l'increment de C/EBP β pot ser suficient per explicar l'increment de l' α -sinucleïna. L'increment en C/EBP β no produeix un increment en GADD153.

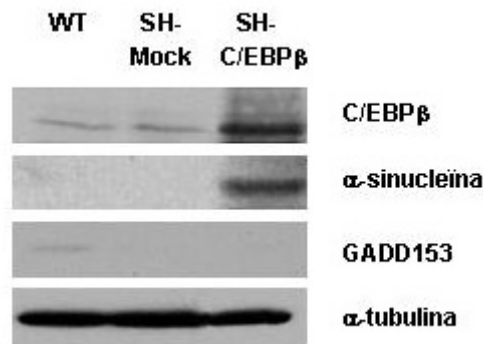


Figura 3.2.12. Efecte de la sobreexpressió de C/EBP β mitjançant un plàsmid que conté el gen per C/EBP β (SH-C/EBP β) en l'expressió de C/EBP β , α -sinucleïna i GADD153.

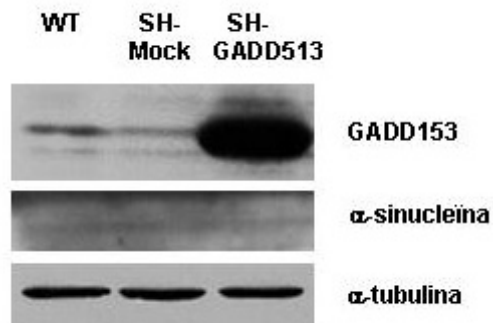


Figura 3.2.13. Efecte de la sobreexpressió de GADD153 mitjançant un plàsmid que conté el gen per GADD153 (SH-GADD153) en l'expressió d' α -sinucleïna i GADD153.

DISCUSSIÓ

De les proteïnes que presentaven variacions al *microarray* proteòmic, ens varem centrar en C/EBP β i GADD153, aquesta última és una de les que més s'altera i s'han descrit alteracions quan les cèl·lules es tracten amb 6-OHDA (Ryu, *et al.*, 2002), DA (Stokes, *et al.*, 2002) i MPP⁺ (Conn, *et al.*, 2002).

Hem vist que la DA incrementa l'expressió de GADD153 i C/EBP β , però de forma diferent depenent del temps i la concentració.

L'increment de C/EBP β és significatiu després de 6h de tractament amb DA a concentracions entre 10 i 500 μ M. La concentració d' α -sinucleïna també augmenta després del tractament amb concentracions superiors a 50 μ M. L'increment de C/EBP β i α -sinucleïna entre les 6 i les 24h de tractament amb la DA-500 és menor que amb la DA-100, indicant que alguns mecanismes que intervenen en aquesta resposta poden estar malmesos amb aquestes concentracions de DA. En canvi, l'increment en GADD153 és baix amb la DA-100 i alt amb la DA-500. La sobreexpressió de C/EBP β és suficient per incrementar l'expressió d' α -sinucleïna, però no la de GADD153, indicant que l'increment de C/EBP β causat per la DA podria ésser el responsable de l'increment en l' α -sinucleïna. A més, l'inhibició de la JNK pel SP600125 redueix l'increment de C/EBP β i α -sinucleïna induït per DA, indicant que la fosforilació induïda per JNK estaria involucrada en l'expressió de C/EBP β i α -sinucleïna.

GADD153 és un factor de transcripció, l'expressió del qual esta relacionada amb l'estrès reticular (Oyadomari, *et al.*, 2004). L'increment de grp78/BiP, una txaperona característica del reticle endoplasmàtic, per la DA-500 i pels inductors d'estrès reticular tunicamicina i taspigargina, indica que l'estrès reticular pot intervenir en la toxicitat per DA, com prèviament s'havia vist per la 6-OHDA i el MPP⁺ (Holtz, *et al.*, 2003; Ghribi, *et al.*, 2003). L'increment dels nivells de calci intracel·lulars observat podria ser causa o conseqüència d'aquest estrès. Com es pot observar a la figura 3.2.7 la proteïna grp78 pràcticament desapareix a les 24h, aquest fet podria indicar que la cèl·lula ja ha entrat completament en un procés de mort amb la pèrdua de l'activitat del reticle endoplasmàtic.

Alteracions en el reticle endoplasmàtic s'han relacionat amb autofàgia (Novikoff, *et al.*, 1978) i la DA-500 produeix autofàgia en les cèl·lules SH-SY5Y (Gómez-Santos, *et al.*, 2003). Malgrat tot, l'inhibició de l'autofàgia amb 3-MA no evita l'increment de GADD153, indicant que els mecanismes que produeixen l'increment de GADD153 podrien estar *upstream* al lloc d'acció de la 3-MA. La fosforilació d'eIF2 α ha estat descrita *upstream* de l'activació de GADD153 i de l'activació de l'autofàgia a través de PERK (Talloczy, *et al.*, 2001). No obstant, eIF2 α està altament fosforilat en condicions basals en les cèl·lules SH-SY5Y i no sembla que s'activi més amb DA. ATF6 tampoc es veu afectat després del tractament amb DA.

GADD153 és un dels senyals *downstream* de p38-MAPK (Wang, *et al.*, 1996), no només per fosforilació proteica si no també a nivell transcripcional (Oh-Hashi, *et al.*, 2001). El paper de la fosforilació en els mecanismes intracel·lulars de la DA ha estat demostrat per l'activació de quinases de resposta a l'estrès, JNK i p38-MAPK, com a resposta al tractament amb DA i la supressió d'alguns efectes d'aquesta catecolamina mitjançant la inhibició de JNK i p38 (Gómez-Santos, *et al.*, 2003). La inhibició dels dos (JNK i p38) és necessària per prevenir l'increment de GADD153 per la DA-500. Nosaltres proposem que l'activació de GADD153 aniria per ambdues vies.

El paper de GADD153 com a factor o cofactor de transcripció amb C/EBP β és controvertit, podria haver-hi cooperació positiva o negativa (Fawcett, *et al.*, 1996; Friedman, 1996), o, simplement, no haver-n'hi (Ubeda, *et al.*, 1996). Sembla ser que la heterodimerització de les formes fosforilades de GADD153 i C/EBP β activa nombrosos gens anomenats DOC (*stress-induced gens downstream of GADD153*) (Wang, *et al.*, 1998). No podem descartar la possibilitat de que l' α -sinucleïna sigui un d'aquests DOC. L'increment de GADD153 (i probablement l'increment d' α -sinucleïna), podria ésser una resposta a les agressions que està patint la cèl·lula, com ha estat demostrat pel MPP⁺ (Conn, *et al.*, 2002) i el peroxonitrit (Oh-Hashi, *et al.*, 2001). Si l'agressió no es pot parar, les cèl·lules iniciarien un programa de mort cel·lular per apoptosi i/o autofàgia.

Proteïna	R _{DA/C}	MES		Proteïna	R _{DA/C}	MES
p14-3-3	n.d.			IRS-1	0,8	0,22
c-Abl	1,5	0,6		ISGF3 gamma	1	0,16
ACINUS	n.d.			Jak1	1	0,11
ACINUS-p23	n.d.			Jak2	0,6	0,4
AFAP	n.d.			Jak3	1	0,3
AIF	1,3	0,13		JNK 1,2,3	0,5	0,4
AKT 1/2	1,9	0,68		p-JNK 1,2,3	1,5	0,5
ALK	1,5	0,3		c-Jun	1	0,3
Amphi-physin	1,1	0,16		KAP	n.d.	
Ankyrin	2,2	0,9		c-Kit	1,1	0,11
Bin 1	0,8	0,3		L1	0,3	0,05
Annexin VI	1	0,08		LGI1	1	0
ANT	1	0,08		LIFR	1	0
Apaf1	2	0,9		Mad-1	1	0,08
APC	1	0,3		MAD2A/MAD2B	1	0,32
ARC	1,2	0,16		Maspin	1	0,5
Axl	3,8	1,1		Max	0,3	0,06
B7-1	1,3	0,22		MDA-7	1	0,3
B7-2	1	0,27		MDM2	1	0,3
Bad	n.d.			Mdr(H-241)	1	0,9
BAK	0,5	0,3		MEF2	1	0,16
BAX	1,1	0,05		MEK1	1	0,5
BOK	1	0,3		MEKK1	n.d.	
NBK	1	0,05		MEKK2	1,4	0,41
Bag-1	1,1	0,1		Menin	1	0,22
BCL-2	n.d.			Met	1	0,11
Bcl-w	0,3	0,08		MGMT	0,4	0,03
Bcl-xS/L	n.d.			MMp-3	n.d.	
A1	1,2	0,3		MMp-9	n.d.	
Mcl-1	1,5	0,9		Mos	n.d.	
Bcl-3	0,3	0,03		Myc (c-Myc)	1	0,05
Bcl-6	1,1	0,08		MyoD	1	0,14
BID	1,3	0,05		NCK 1,2	1	0,05
Bim	2,7	0,61		NF-1	1	0,3
BM28	1	0,19		NF1GRP	1	0,5
BMX	1,2	0,03		NF2	1	0,11
BRAMP2	1	0,13		NFATC 1/2/3/4	4	0,4
BAP1	1	0,05		NF-kappa B 50	1	0,5
BARD1	1	0,3		NF-kappa B 52	0,8	0,14
BRCA1	1	0,3		NF-kappa B p65	0,4	0,3
BRCA2	1	0,08		Ikappa B-a	n.d.	

Resultats

Proteïna	R _{DA/C}	MES		Proteïna	R _{DA/C}	MES
Brk	1,3	0,08		p-Ikappa B-a	n.d.	
Brc	1	0,3		Ikappa B-b	n.d.	
BRUCE	n.d.			Ikappa B-r	2,3	0,5
Btk	n.d.			Ikappa B-e	n.d.	
C/EBP beta	1,9	0,6		Ikappa B kinase a	1	0,11
Cadherin-5	1,1	0,05		Ikappa B kinase b	1	0,22
E-Cadherin	n.d.			Nibrin	1	0,27
N-Cadherin	1	0,03		NIK	1	0,19
P-Cadherin	n.d.			nip1	1	0,3
BLCAM	0,2	0,02		nip2	1	0,5
HCAM	n.d.			nip3	3,9	0,2
ICAM-1	1,7	0,08		eNOS	1	0
PECAM-1	1	0,05		iNOS	6,7	0,5
VCAM-1	1	0,2		nNOS	0,4	0,3
CAS	1,1	0,2		Notch 1/2/3/4	1	0,03
Caspase1	1	0,3		Ntk	0,5	0,35
Caspase2	n.d.			Nurr 1	1,2	0,5
Caspase3	2,6	0,8		Ob Receptor	1	0,05
Caspase4	1	0,3		p16	1	0,3
Caspase5	0,4	0,08		p19Skp1	n.d.	
Caspase6	1	0,3		p21WAF1/CIP1	1	0,16
Caspase7	1	0,22		p27	n.d.	
Caspase8	1	0,22		p35	n.d.	
Caspase9	1	0,08		p36	0,4	0,05
Caspase10	1,1	0,3		p38 MAPK $\beta/\gamma/\delta/\alpha$	1,5	0,6
a-Catenin	1	0,33		p45 skp2	0,4	0,05
b-Catenin	n.d.			p53	0,4	0,3
r-Catenin	1,8	0,8		p55 CDC	1	0,5
c-Cbl	n.d.			p57 (kip2)	1	0,08
CBP	1,3	0,05		P63	1	0,08
CD 3 epsilon	n.d.			P73	1	0,5
CD27	n.d.			p130Cas	0,9	0,3
CD28	2,3	0,5		p300	n.d.	
CD29	1	0,16		Patched 1/2	0,3	0,06
CD30	1	0,24		PAR-4	2,6	0,8
CD40	2,4	1,2		PARP 1/2/3	4,2	0,3
CD45	0,7	0,3		Pax-5	1	0,27
Cdc6	1,3	0,3		Paxillin	0,7	0,5
Cdc25A	1,1	0,08		PCNA	1	0,13
Cdc34	n.d.			PDGF Receptor a	2,8	0,05
CDC42GAP	n.d.			PDGF Receptor b	1	0,11

Proteïna	R _{DA/C}	MES		Proteïna	R _{DA/C}	MES
Cdk1/Cdc2	0,8	0,3		Phospholipase Cr	1	0,3
Cdk2	0,7	0,5		Phospholipase D	0,3	0,14
Cdk4	0,6	0,3		PI3Kinase P85	1	0,5
Chk	n.d.			PKC a,b,c	0,8	0,25
C-IAP1	2	0,3		PLK 1/2/3/4	0,4	0,3
C-IAP2	2,9	0,5		PP1,2A,2B,PPX	5,7	0,4
CIDE-A	1,1	0,08		pp120	1	0,05
CIDE-B	1,3	0,5		PSD-95	0,2	0,05
Clathrin	0,9	0,3		PTEN	0,5	0,35
Clusterin	1	0,11		SH-PTP	1	0,27
Connexin26	1	0,11		PTP1B	1	0,05
Connexin43	0,2	0,04		SH-PTP2	1,2	0,23
Cortactin	0,4	0,33		PYK2	1	0,05
CPAN	1,1	0,03		Rab3 A/B/C/D	1,4	0,5
CREB	1,3	0,5		Rab5 A/B/C	1	0,05
CREM-1	1,1	0,27		Rab11	1	0,3
Crk	1	0,27		Rab27 A/B	0,4	0,3
Csk	3,2	0,6		Rac1	1	0,08
CUL-1	n.d.			RACK1	0,9	0,15
Cyclin A1/A2	n.d.			Rad51	1	0,05
Cyclin B1/B2/B3	n.d.			Rad52	n.d.	
Cyclin D3	n.d.			cRaf-1	1	0,27
Cyclin E1/E2	1,3	0,5		RAIDD	1	0,24
Cyclin H	2,6	1,5		RalA	1	0,11
Cytochrome C	1,1	0,5		Ran	0,4	0,07
DAXX	2,6	0,7		Rap1	1	0,27
DCC	3	2,2		Rap2	1	0,35
Desmoglein	1,2	0,24		RARr	1	0,19
DFF45/ICAD	n.d.			RXR a,b,r	1	0,14
DIVA	1	0,14		Ras	1	0,03
DMBT1	1,2	0,23		Ras-GAP	n.d.	
DMC1	1,1	0,08		Rb (p107)	1,2	0,5
DcR1	1	0,46		Rb (p110)	0,8	0,16
DcR2	0,4	0,3		Rb2 (130)	1	0,03
DR3	7,2	1,1		RBBP	1,1	0,3
DR4	1,1	0,3		Rbx1 & 2	1	0,16
DR5	1	0,19		cRel	1	0,07
Dynamin	0,6	0,3		RelB	1	0,16
Dynamin II	0,2	0,05		Ret	1	0,14
E2F1	0,2	0,05		RhoA	1,9	0,8
EGFR	1	0,3		RICK	n.d.	

Resultats

Proteïna	R _{DA/C}	MES		Proteïna	R _{DA/C}	MES
Egr-1	1	0,5		RIP	1	0,08
Egr-2	0,9	0,14		Ron a	1	0,11
Egr-3	1	0,14		Rsk1	1,2	0,11
Elongin A	0,5	0,4		Sam68	4	0,9
EphA1	2,1	1,1		E-Selectin	1	0,38
EphA4	0,2	0,05		L-Selectin	1	0,22
EphB1	1	0,08		P-Selectin	1	0,3
eps8	1	0,5		SHC	0,5	0,03
erbB2	n.d.			SHIP	0,9	0,5
erbB3	1	0,08		Sik	1	0,16
erbB4	0,4	0,25		SIVA	1	0,03
ERK1	1,3	0,4		Smad 1,2,3	1	0,05
ERK2	1,4	0,3		Smad4	1	0,05
Estrogen R a	1,1	0,5		SOCS1	1	0,14
Ets-1/2	1,1	0,3		SODD	1	0,11
Ezrin	1	0,03		Sos1/2	1	0,05
FADD	1	0,19		Sp1	1	0,08
FAF-1	1	0,02		sp2	0,8	0,05
FAK	1	0,19		Spectrin	n.d.	
Fas	0,9	0,11		Blk	0,2	0,03
FasL	n.d.			cFgr	0,2	0,03
FAST	n.d.			fyn	0,4	0,3
FGFR1	0,4	0,3		Lck	1	0,2
FGFR2	n.d.			Lyn	1	0,05
FGFR3	0,2	0,05		c-Src	1	0,3
FGFR4	0,3	0,08		Yes	1	0,03
FHIT	n.d.			SRF	1	0,11
FLASH	0,2	0,07		STAM	5,9	0,9
FLIPs/l	1	0,35		Stat1	1	0,03
Flt-3/2	1	0,5		pStat1	0,9	0,5
Flt-4	n.d.	0,24		Stat2	1	0,14
c-Fos	0,6	0,51		Stat3	1	0,11
Frizzled	1	0,03		pStat3	1	0,22
GADD34	0,4	0,27		Stat4	1	0,22
GADD45	1,2	0,08		Stat5a	1	0,03
GADD153	7,5	0,16		Stat5b	1	0,03
GAK	3,8	0,7		Stat6	1	0,05
GATA-1	1,1	0,08		SURVIVIN	0,8	0,05
GATA-2	1	0,14		Syk	n.d.	
GATA-3	1,2	0,4		Syntaxin6	0,4	0,09
G-CSF R	1,2	0,5		TANK	n.d.	

Proteïna	R _{DA/C}	MES		Proteïna	R _{DA/C}	MES
gp130	1,2	0,3		TCRa	n.d.	
Granzyme B	1,1	0,3		TCRb	0,9	0,3
GRB 2	1	0,16		TDAG51	0,4	0,3
GRB 7	n.d.			TGFb R1	0,9	0,5
GRB 14	1	0,19		TGFb R2	0,9	0,3
GRK 2	1	0,8		Thyroid R al	1	0,22
GSK-3 alpha	0,2	0,07		TIA-1	0,9	0,24
HDAC1	0,2	0,07		TIAR	1	0,16
hdlg	2,8	0,8		TNFR1	9	1,2
Ne-dlg	2,7	1,4		TNFR2	1	0,05
hIL-4 sR	n.d.			TOSO	1	0,03
hILP	1	0,08		TRADD	4,8	1
Hrk	1	0,11		TRAF1	1	0,05
HS 1	1,1	0,5		TRAF2	1	0,03
HSP-70	1	0,3		TRAF3	n.d.	
ICSBP	6,5	0,5		TRAF4	1	0,08
Id1	1	0,14		TRAF5	3	0,3
IEXs/I	1	0,16		TRAF6	4,9	0,2
IFN- α R a	3	0,5		TRAIL	0,9	0,3
IFN- γ R a	1	0,11		TrkA, B, C	1,5	0,6
IL1 R1	0,3	0,05		TSG101	2,9	1,9
IL2 Ralpha	n.d.			TTK	1,9	1
IL2 Rbeta	0,4	0,08		Tuberin	1,2	0,5
IL2 Rgamma	n.d.			Tyk2	1	0,11
IL3	1	0,08		VASP	1	0,19
IL4R a	1	0,11		Vav	1	0,16
ING1-p33	1	0,3		VDAC1	0,6	0,4
Insulin R b	1	0,3		VDR	1	0,14
Integrin a 1	0,2	0,05		VEGF R1	1	0,08
Integrin a 5	1	0,3		VEGF R2	1	0,22
Integrin a V	1	0,05		VHL	1	0,11
Integrin b 1	n.d.			WT1	1	0,3
Integrin b 3	0,2	0,04		XRCC4	1	0,08
IRAK	4,1	0,8		YY1	1	0,07
IRF1	4,5	0,6		ZAP70 K	1	0,22
IRF2	2,9	0,11		ZO-1	1	0,05

Taula 3.2.2. *Microarray* proteòmic complet de les cèl·lules SH-SY5Y després del tractament amb la DA-500 durant 12h.

n.d.: no detectat

La taula es pot consultar a http://www.ub.edu/dpfisii/grups_recerca/recerca/microarray.xls

**PROCESSOS MOLECULARS EN LA MORT INDUÏDA PER
DOPAMINA EN CÈL·LULES SH-SY5Y**

INTRODUCCIÓ

La malaltia de Parkinson es caracteritza per la pèrdua selectiva de neurones dopaminèrgiques a la *substantia nigra*. No es coneixen encara ni la causa de la mort ni els mecanismes de neurodegeneració de les neurones dopaminèrgiques, fet que dificulta poder trobar noves estratègies farmacològiques. L'auge dels estudis sobre els mecanismes d'apoptosi ha fet suposar que darrera qualsevol neurodegeneració hi ha un desencadenant de mort programada en forma d'apoptosi. Hi ha pocs estudis histològics en *substantia nigra* de pacients amb PD que descriguin la morfologia de les neurones degenerants. De fet, quan s'ha diagnosticat la malaltia, i encara més quan es realitza l'autòpsia, la degeneració de la *substantia nigra* ja ha tingut lloc. Algún estudi ultraestructural indica la presència d'elements característics de l'autofàgia i l'apoptosi a la *substantia nigra* (Anglade, *et al.*, 1997). Nombroses evidències indiquen que l'estrès oxidatiu i la DA podrien tenir un paper molt important en l'origen d'aquesta malaltia (Barzilai, *et al.*, 2001; Betarbet, *et al.*, 2002).

S'ha observat que un increment de la DA citosòlica, com a conseqüència del tractament amb metanfetamines, indueix estrès oxidatiu i autofàgia en neurones dopaminèrgiques (Larsen, *et al.*, 2002). Aquest procés autofàgic induït per les metanfetamines pot anar acompanyat d'apoptosi (Kanthasamy, *et al.*, 2006). A més, el MPP⁺, un agent causant d'un parkinsonisme farmacològic, indueix autofàgia en cèl·lules SH-SY5Y (Zhu, *et al.*, 2007).

Resultats previs del nostre laboratori indiquen que la DA indueix autofàgia en cèl·lules SH-SY5Y (Gómez-Santos, *et al.*, 2003). La microscòpia electrònica de les cèl·lules adherides revela que el nucli de les cèl·lules manté la seva integritat i la cromatina es manté dispersa després del tractament amb DA. Aquestes observacions no eren consistents amb un procés apoptòtic. No obstant, el citoplasma mostra vacuolització amb acumulació de mitocondris en les zones lliures de vacuoles. Moltes d'aquestes vacuoles contenen un material electrodens i són semblants a les vesícules autofàgiques. A més, la 3-MA, un inhibidor de l'autofàgia (Selgen, *et al.*, 1982), reverteix aquests canvis. Cal destacar que d'altres resultats obtinguts pel nostre laboratori indicaven que aquest efecte es produïa sense sortida del citocrom C. A més a més, l'inhibidor de caspases Z-VAD.fmk, no revertia l'elevada mortalitat observada després del tractament amb DA-500.

RESULTATS

Comprovació de l'efecte de la DA sobre l'aparició d'estructures autofàgiques en cèl·lules SH-SY5Y

Abans de profunditzar en l'estudi dels mecanismes de mort cel·lular induïts per la DA, es van realitzar diferents experiments per confirmar l'aparició d'estructures autofàgiques després del tractament amb DA (Figura 3.3.1). Com es pot observar, les cèl·lules tractades amb DA presenten estructures autofàgiques acompanyades d'una vacuolització citoplasmàtica.

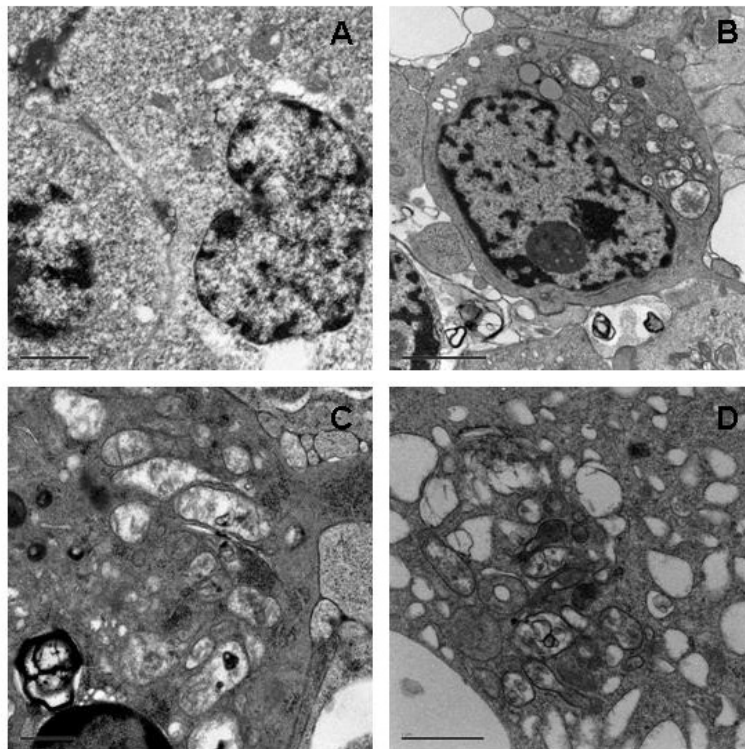


Figura 3.3.1. Microscòpia electrònica d'una cèl·lula SH-SY5Y sense tractar (A) i després del tractament amb DA-500 durant 12h (B, C i D).

Efecte de la dopamina sobre el marcador d'autofagosomes LC3

Com la visualització de les cèl·lules adherents per microscòpia electrònica revelava l'activació d'un procés autofàgic, ens varem proposar comprovar si l'aparició d'aquesta vacuolització era contemporània a l'increment de la forma unida a autofagosomes

d'LC3, LC3-II. Amb aquest objectiu es va estudiar per Western blot el comportament d'aquesta proteïna front a la DA. Com es pot veure, el tractament amb DA incrementa significativament LC3-II (Figura 3.3.2).

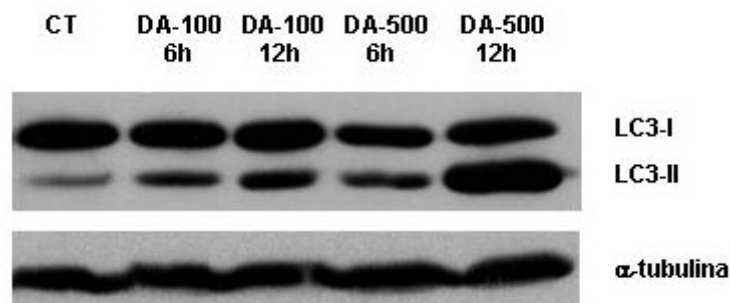


Figura 3.3.2. Efecte de la DA en l'expressió d'LC3-I/LC3-II.

El pretractament amb l'antioxidant N-acetilcisteïna reverteix l'efecte de la DA sobre LC3 (Figura 3.3.3). En canvi, un agent inductor de peroxidació com el tBOOH no indueix un increment d'LC3-II (Figura 3.3.4).

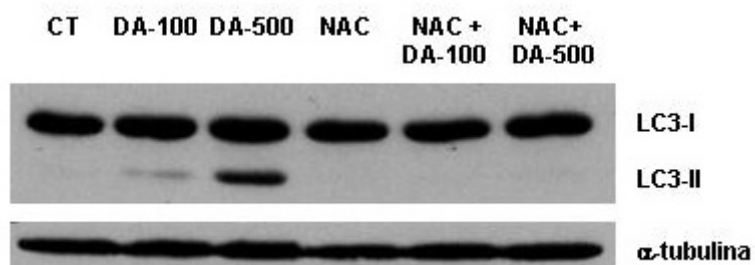


Figura 3.3.3. Efecte de la N-acetilcisteïna (NAC, 10 mM) sobre l'increment d'LC3-II produït per la DA a les 12 hores de tractament.

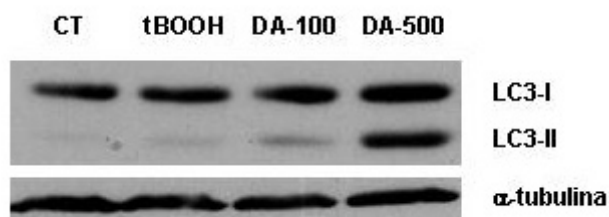


Figura 3.3.4. Efecte del tBOOH (100 μ M) i la DA sobre el marcador d'autofagosomes LC3-II després de 12 hores de tractament.

Com la DA incrementa la forma d'LC3 que es troba unida als autofagosomes, varem estudiar l'efecte del pretractament amb inhibidors clàssics del procés autofàgic, encara que els seus mecanismes d'acció no estan gaire definits, tals com la bafilomicina-A1 i la 3-MA. La bafilomicina-A1 per si mateixa ja incrementa LC3-II i potencia l'efecte de la DA-500 (Figura 3.3.5). Amb la 3-MA varem veure que, a diferència de l'autofàgia induïda per deprivació de sèrum, no es reverteix l'increment d'LC3-II i sembla, al menys amb DA-100, potenciar-se l'efecte de la DA sobre LC3-II (Figura 3.3.6).

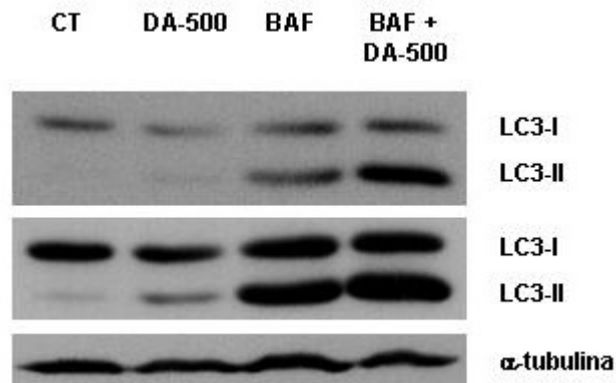


Figura 3.3.5. Efecte de la bafilomicina-A1 (BAF, 100 nM) sobre l'increment d'LC3-II produït per la DA-500 després de 12h de tractament. Les dues imatges corresponen a diferents temps d'exposició d'un mateix experiment.

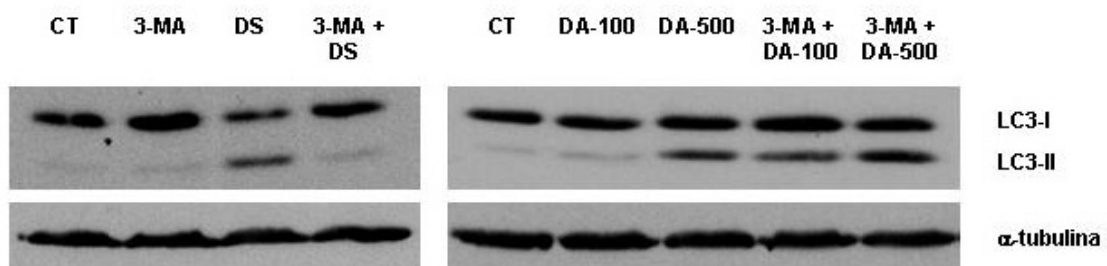


Figura 3.3.6. Efecte de la deprivació de sèrum (DS) i la DA sobre l'expressió d'LC3-I/LC3-II després de 12h de tractament. El tractament amb 3-MA (10 mM) reverteix l'efecte de la deprivació de sèrum, en canvi, no hi ha protecció de l'efecte de la DA.

Efecte de la DA sobre l'expressió de diferents ATGs

Un cop comprovat l'increment d'LC3-II (Atg8), ens varem plantejar si el procés autofàgic desencadenat per la DA necessitava de l'increment en l'expressió d'altres ATGs. Per això varem triar 3 de les ATGs més indicatives en el procés de formació de l'autofagosoma, l'Atg5, la beclina-1 (homòloga de l'Atg6 de llevats) i l'Atg12. A partir del resultat obtingut per Western blot podem veure que la DA no produeix canvis importants en el contingut d'aquestes proteïnes (Figura 3.3.7).

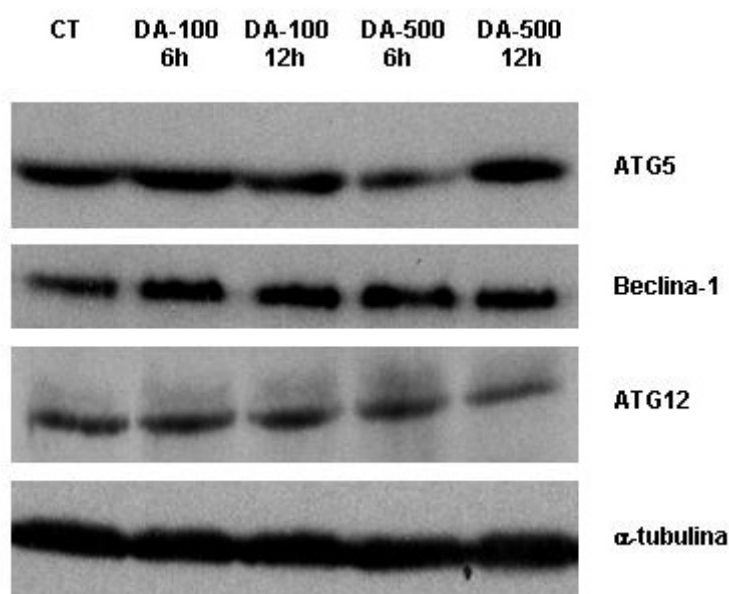


Figura 3.3.7. Expressió d'Atg5, beclina-1 i Atg12 després del tractament amb DA.

Efecte de la DA sobre la via de senyalització PI3K classe I - AKT - mTOR

Està descrit que la via PI3K classe I-AKT-mTOR (PI3K-I) tindria un paper fonamental en la regulació de l'autofàgia (Kondo, *et al.*, 2005). Per aquest motiu varem decidir comprovar si la DA estava afectant aquesta via de senyalització mirant el seu efecte sobre diferents components d'aquesta. Com es pot observar (Figura 3.3.8), la DA produeix un increment en la fosforilació d'AKT en la Ser-473, essent aquest increment més important amb DA-500. La fosforilació a la Thr-308, també incrementa després del tractament amb DA-500.

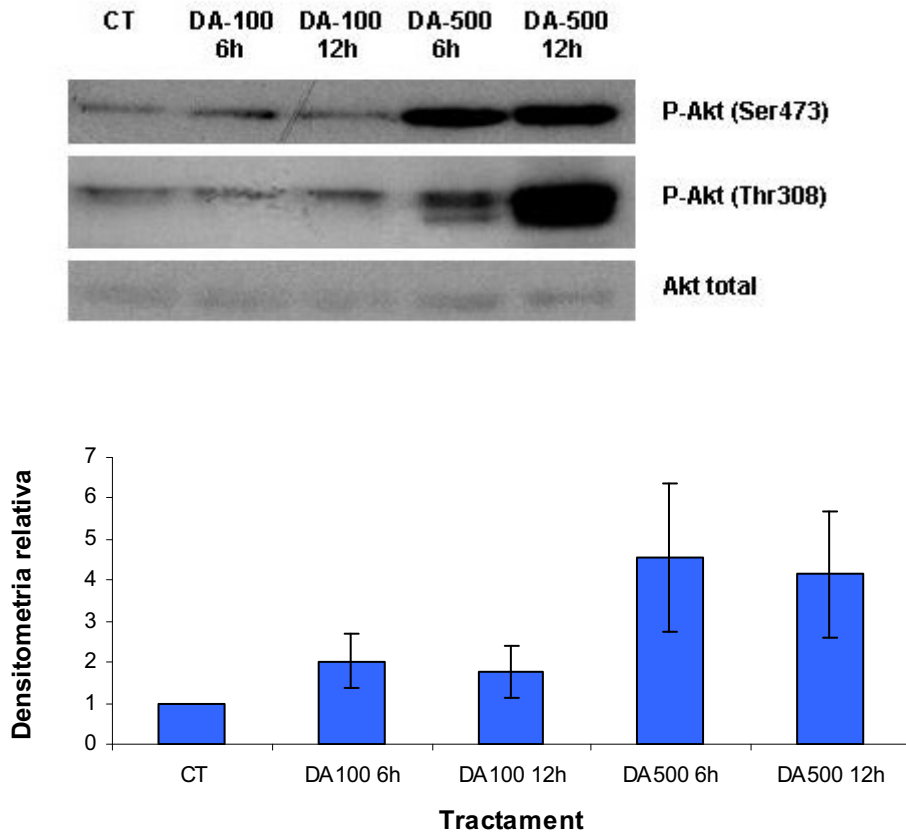


Figura 3.3.8. Efecte de la DA sobre la fosforilació d'AKT a la Ser-473 i la Thr-308. La densitometria relativa respecte al control correspon a la fosforilació d'AKT a la Ser-473, per mostrar que en alguns experiments es van observar diferències després del tractament amb DA-100 respecte al control. Estan representades les mitjanes de 3 experiments \pm la MES.

El factor d'aquesta via més relacionat amb l'autofàgia és mTOR. Com es pot veure (Figura 3.3.9.), la DA produeix un descens en la fosforilació d'mTOR a la Ser-2448.

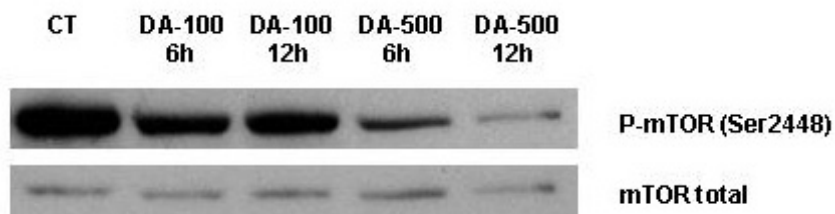


Figura 3.3.9. Efecte de la DA sobre la fosforilació d'mTOR a la serina 2448.

La fosforilació d'S6K, un factor situat *downstream* d'mTOR, disminueix després del tractament amb DA (Figura 3.3.10).

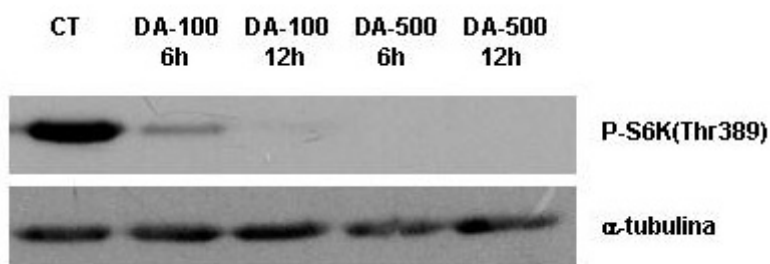


Figura 3.3.10. Efecte de la DA sobre la fosforilació d'S6K a la Thr-389.

Finalment, l'expressió de PTEN no es veu modificada després del tractament amb DA (Figura 3.3.11).

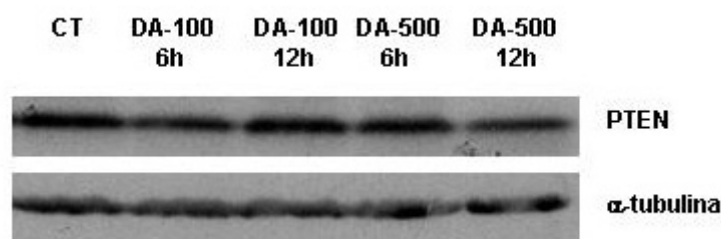


Figura 3.3.11. Efecte de la DA sobre l'expressió de PTEN.

Efecte de la inhibició de l'activitat PI3K i d'mTOR

Després de comprovar que l'increment d'LC3-II observat tenia lloc al mateix temps que una alteració de la via de la PI3K-I varem voler comparar l'efecte de la DA amb el de diferents inhibidors que actuen sobre aquesta via, com l'LY294002 (inhibidor de PI3Ks) i la rapamicina (inhibidor d'mTOR). De forma semblant a la DA, l'LY294002 i la rapamicina produeixen una disminució de la fosforilació d'S6K i un increment d'LC3-II, després de 12 hores de tractament (Figures 3.3.12 i 3.3.13).

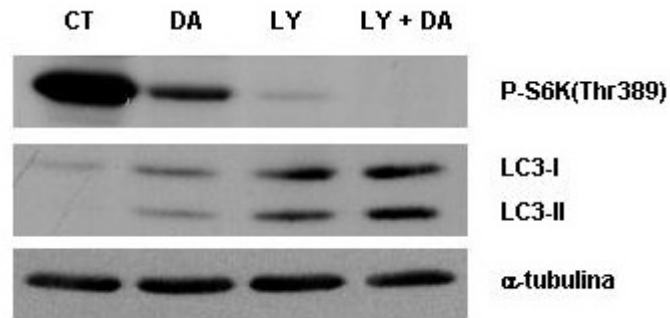


Figura 3.3.12. Efecte de la DA (100 μ M) i l'LY294002 (LY, 20 μ M) sobre la fosforilació d'S6K a la Thr-389 i el contingut d'LC3-I/LC3-II.

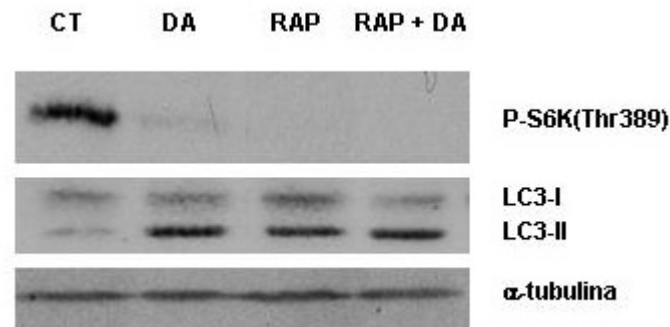


Figura 3.3.13. Efecte de la DA (100 μ M) i la rapamicina (RAP, 10 nM) sobre la fosforilació d'S6K a la Thr-389 i el contingut d'LC3-I/LC3-II.

Efecte de l'IGF-1 sobre la disminució en la fosforilació d'S6K i l'increment d'LC3-II produïts com a conseqüència del tractament amb DA

Està descrit que l'autofàgia produïda per l'absència de sèrum al medi es pot revertir amb IGF-1, un factor que estimula la via PI3K-AKT-mTOR (Gu, *et al.*, 2004). Per aquesta raó varem estudiar l'efecte del tractament amb DA sobre LC3-II i fosfo-S6K quan les cèl·lules havien estat pre-tractades amb IGF-1 50 nM durant 1 hora. Encara que l'IGF-1 sembla revertir la disminució de fosfo-S6K a la concentració de DA-100 (Figura 3.3.14), l'increment d'LC3-II no es revertit significativament. Amb la concentració de DA-500 l'IGF-1 no té efecte.

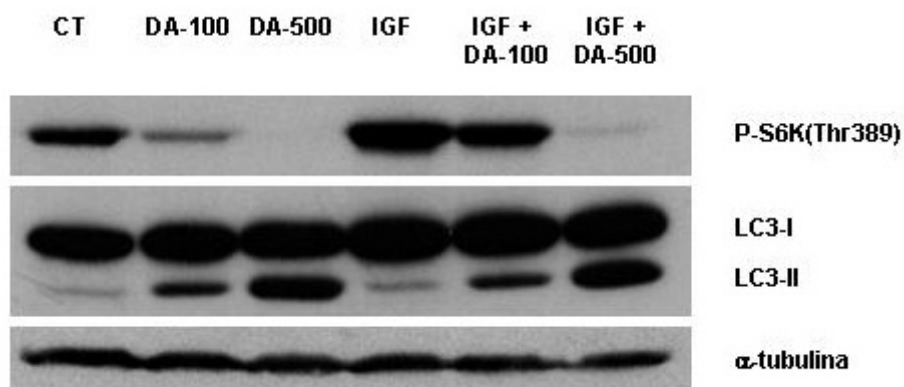
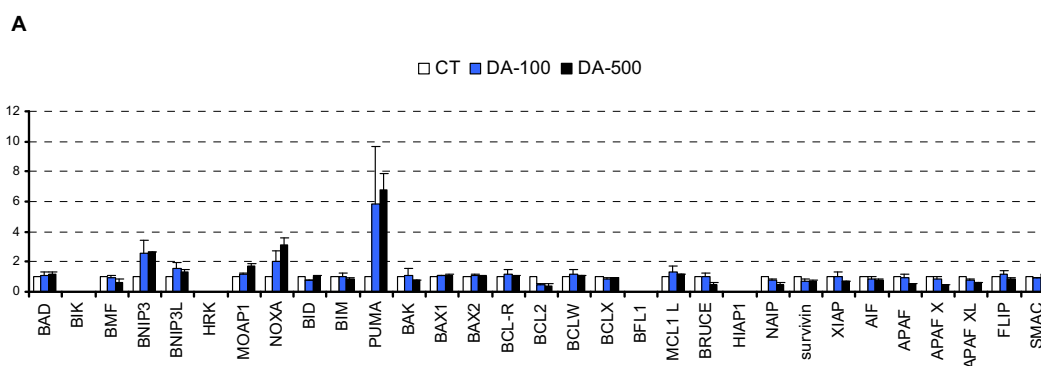


Figura 3.3.14. Western blot de l'efecte del pretractament amb IGF-1 (IGF, 50nm) sobre l'increment d'LC3-II i el descens de la fosforilació d'S6K a la Thr-389, produïts pel tractament amb DA durant 12h.

Estudi de l'expressió dels mRNA de diferents gens relacionats amb l'apoptosi com a conseqüència del tractament amb DA

Per estudiar l'efecte de la DA sobre l'expressió de diferents gens relacionats amb l'apoptosi es va utilitzar la tècnica de l'RT-MLPA, que permet a partir de 200 ng d'RNA estudiar l'expressió de fins a 45 gens. En la figura 3.3.15 s'observa que el tractament amb DA produeix increments superiors al 100% en els nivells de l'mRNA de BNIP3, PUMA i NOXA. Curiosament aquestes cèl·lules presenten uns nivells basals d'expressió del factor antiapoptòtic BCL-2 molt baixos però una elevada expressió del factor proapoptòtic BAX, sense haver però uns nivells basals mesurables d'apoptosi.



Resultats

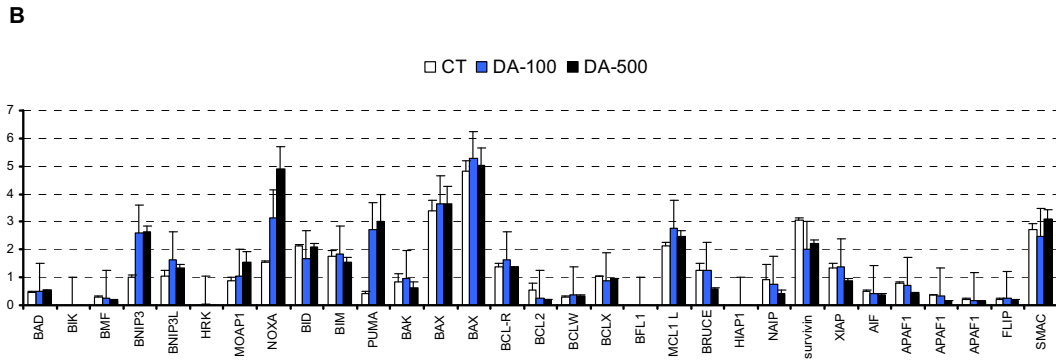


Figura 3.3.15. Perfil de l'expressió de diferents gens relacionats amb l'apoptosi després del tractament amb DA-100 durant 12h i DA-500 durant 6h. S'observen els nivells relatius dels diferents mRNAs (A) normalitzats respecte a GUS (β -glucoronidasa) i (B) sense normalitzar.

Estudi del contingut i activació de diferents proteïnes relacionades amb l'apoptosi com a conseqüència del tractament amb DA

Com en l'estudi realitzat mitjançant l'RT-MLPA es va veure que la DA incrementava l'expressió de PUMA i NOXA, varem decidir comprovar si l'increment produït a nivell transcripcional també es produïa a nivell traduccional. Amb aquest objectiu es van realitzar diferents Westerns blots per estudiar els nivells de PUMA després del tractament amb DA. Com es pot observar a la figura 3.3.16, els nivells de PUMA incrementen tant amb DA-100 com amb DA-500, no obstant l'increment és més ràpid amb la dosi més elevada.

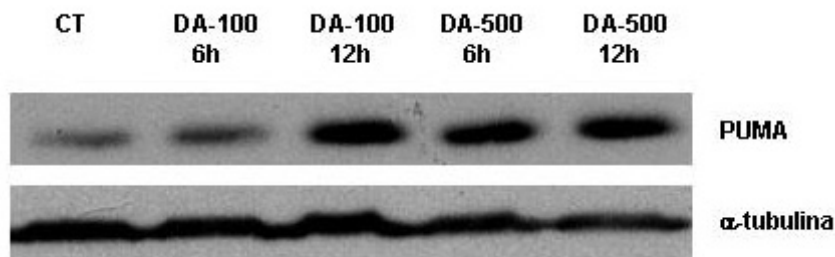


Figura 3.3.16. Efecte de la DA sobre l'expressió de PUMA.

PUMA i NOXA són dos factors relacionats amb p53 (Chipuk, *et al.*, 2006). L'estudi de l'expressió de p53 revela que es produeixen tant increments en els nivells de proteïna totals com en la fosforilació de la Ser en posició 15 (Figura 3.3.17).

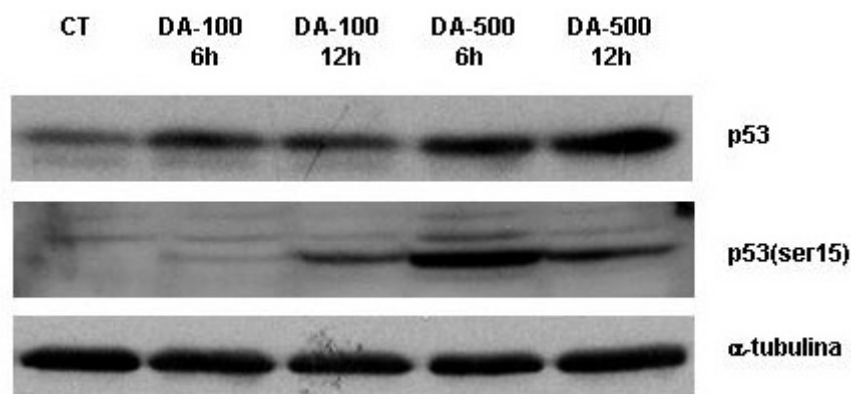


Figura 3.3.17. Efecte de la DA sobre l'expressió de p53 i la fosforilació d'aquesta proteïna.

L'increment de p53, PUMA i NOXA fa pensar que la DA està induint un procés apoptòtic. Per aquest motiu es va estudiar com la DA afecta a l'activació de diferents caspases i a d'altres factors relacionats amb l'apoptosi.

L'estudi de l'activació de les caspases executores 3 i 7, ens permet veure que hi ha una activació reduïda d'aquestes caspases, essent només apreciable una petita activació amb la dosi més elevada de DA (Figura 3.3.18).

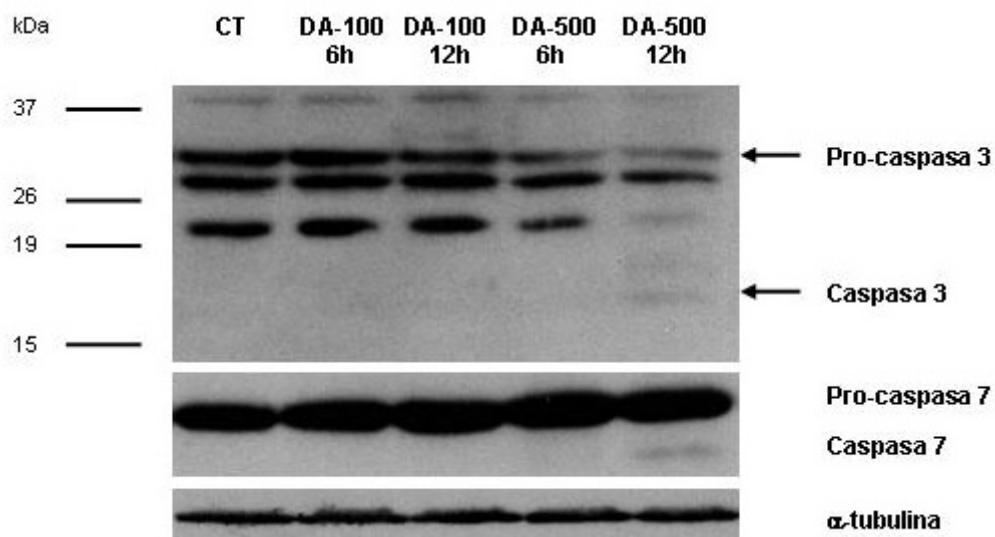


Figura 3.3.18. Efecte de la DA sobre l'activació de les caspases 3 i 7. La caspasa 3 té un pes de 17 kDa, en canvi la forma de procaspasa 3 pesa 32 kDa.

El Western blot de l'activació de PARP, un altre factor relacionat amb l'apoptosis (Fischer, *et al.*, 2003), revela un resultat semblant al de les caspases executores, l'activació de PARP és petita i només amb la dosi més elevada de DA (Figura 3.3.19).

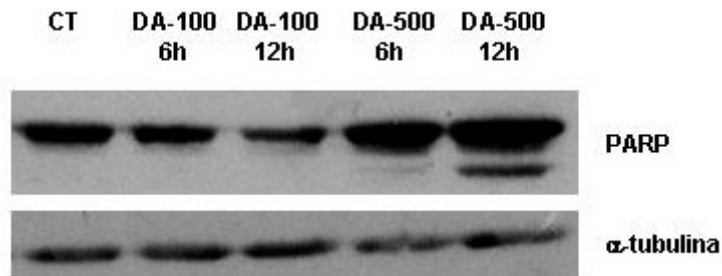


Figura 3.3.19. Efecte de la DA sobre l'activació de PARP. L'activació de PARP té lloc quan apareix la línia inferior.

Finalment, els nivells de BAX i BCL-2 no semblen modificarse després del tractament amb DA (Figura 3.3.20), en concordància amb el que ja ens indicava l'RT-MLPA.

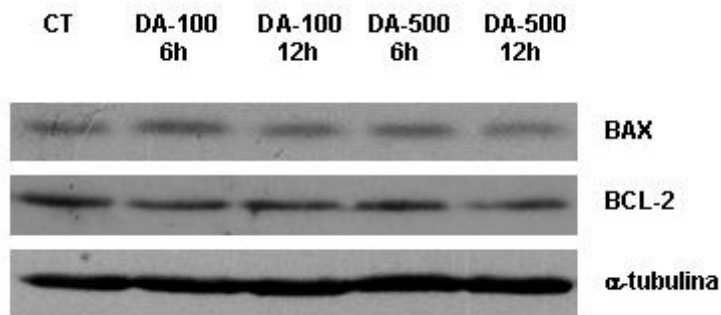


Figura 3.3.20. Efecte de la DA sobre l'expressió de BAX i BCL-2.

Estudi de l'efecte de la DA sobre l'expressió de BNIP3

Un altre dels factors que incrementa clarament l'RT-MLPA és BNIP3 (anteriorment coneguda com a NIP3), un membre de la subfamília BH3-only de BCL-2. L'increment de BNIP3 ens va semblar interessant perquè està descrit que la sobreexpressió de BNIP3 produeix mort cel·lular de forma independent a les caspases, amb una elevada

vacuolització citoplasmàtica i autofàgia mitocondrial (Vande Velde, *et al.*, 2000). A més, l'expressió de BNIP3 està incrementada en diferents línies de glioma maligne que presenten autofàgia com a conseqüència del tractament amb As₂O₃ (Kanzawa, *et al.*, 2005) i ceramida (Daido, *et al.*, 2004). Haviem observat un increment de BNIP3 ja amb el *microarray* proteòmic i aquest augment va ser confirmat per Western blot (Figura 3.3.21). En canvi, BNIP3L (també conegut com a NIX), que també augmenta en l'MLPA, no incrementa a nivell de proteïna (Figura 3.3.22). De fet, BNIP3L no sembla estar relacionada amb l'autofàgia (Kanzawa, *et al.*, 2005).

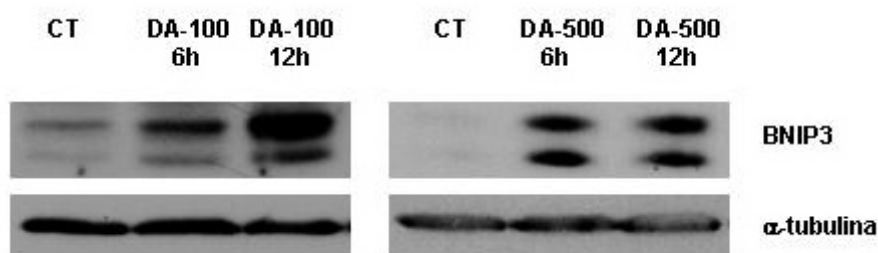


Figura 3.3.21. Efecte de la DA sobre l'expressió de BNIP3.

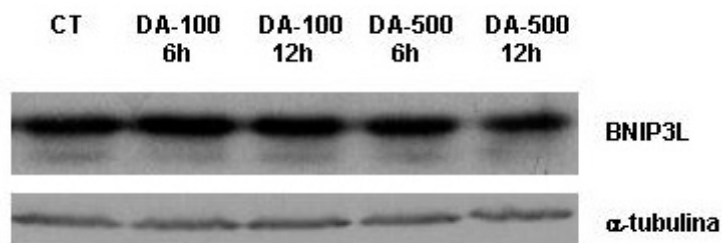


Figura 3.3.22. Efecte de la DA sobre l'expressió de BNIP3L.

BNIP3 ha estat descrita com una proteïna mitocondrial. La localització mitocondrial va ser confirmada per Western blot (Figura 3.3.23), no obstant, la DA produeix un increment tant en la fracció mitocondrial com en la citoplasmàtica.

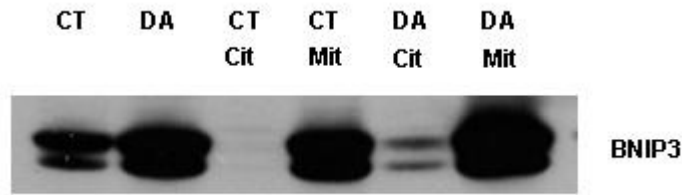


Figura 3.3.23. Western blot de la localització de BNIP3, citoplasmàtica (Cit) o mitocondrial (Mit), després de 12h de tractament amb DA-100.

Està descrit que l'expressió de BNIP3 està regulada principalment per HIF-1 (*hypoxia-inducible factor*), el qual s'uneix a un HRE (*hypoxia responsive element*) situat al promotor de BNIP3 (Lee, *et al.*, 2006).

HIF-1 és una proteïna formada per 2 subunitats, α i β (Wang, *et al.*, 1995). HIF-1 β s'expressa de forma constitutiva, en canvi HIF-1 α presenta una vida mitja molt baixa. En condicions de normòxia HIF-1 α és hidroxilada als residus Pro-402 i Pro-564 per prolil hidroxilases. Quan HIF-1 α es troba hidroxilada és reconeguda per la proteïna Von Hippel-Lindau (VHL) que actua com una lligasa E3, afavorint l'ubiquïtinització d'HIF-1 α i, per tant, la seva degradació per part del proteosoma. En condicions d'hipòxia les hidroxilases no poden actuar. Com a conseqüència d'aquest fet, la proteïna VHL no pot dirigir la ubiquïtinització d'HIF-1 α que s'acumularà i es translocarà al nucli on s'unirà a HIF-1 β . Finalment aquest complex s'uneix als HRE que es troben als gens diana (Bardos, *et al.*, 2005).

El tractament amb DA incrementa els nivells d'HIF-1 α a temps molt curts, essent suficient 2 hores per observar un increment (Figura 3.3.24).

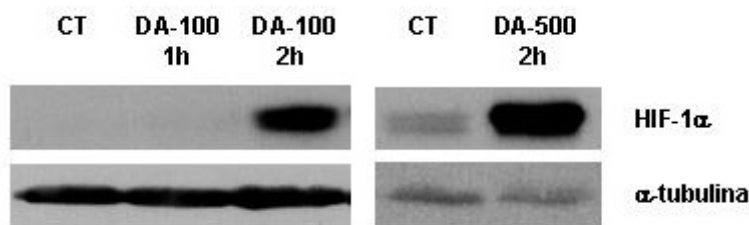


Figura 3.3.24. Efecte de la DA sobre l'expressió d'HIF-1 α .

Aquest increment és revertit amb l'antioxidant N-acetilcisteïna (Figura 3.3.25).

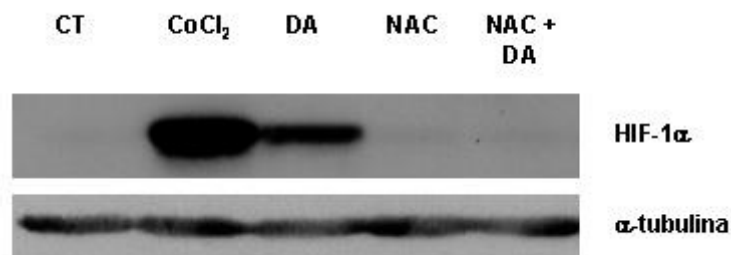
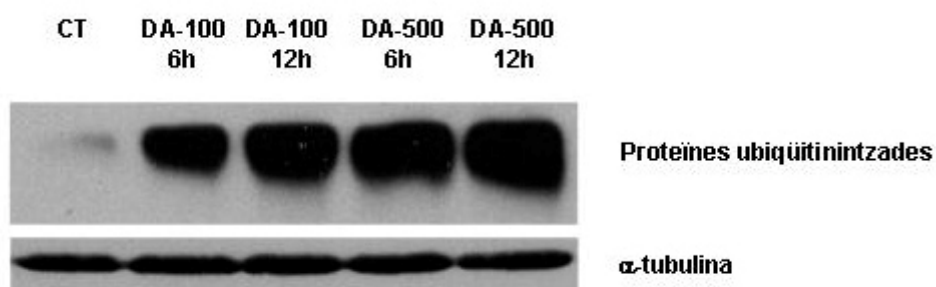


Figura 3.3.25. Western blot de l'efecte de la N-acetilcisteïna (NAC, 10 mM) i la DA-100 sobre l'expressió d'HIF-1 α després de 2 hores de tractament. El CoCl₂ (200 μ M) es va utilitzar com a control positiu de la inducció d'HIF-1 α .

Efecte de la DA sobre l'activitat del proteosoma

Com els nivells de HIF-1 α depenen de l'activitat del proteosoma (Salceda, *et al.*, 1997), varem estudiar l'efecte de la DA sobre aquesta activitat mesurant l'acumulació de proteïnes ubiquïtinitzades (Figura 3.3.26). Com es pot veure, la DA produeix un elevat increment en l'acumulació de proteïnes ubiquïtinitzades. Aquest increment és revertit si es realitza un pretractament amb N-acetilcisteïna una hora abans d'afegir la DA. A l'igual que HIF-1 α l'acumulació de proteïnes ubiquïtinitzades és detectable a temps molt curts.



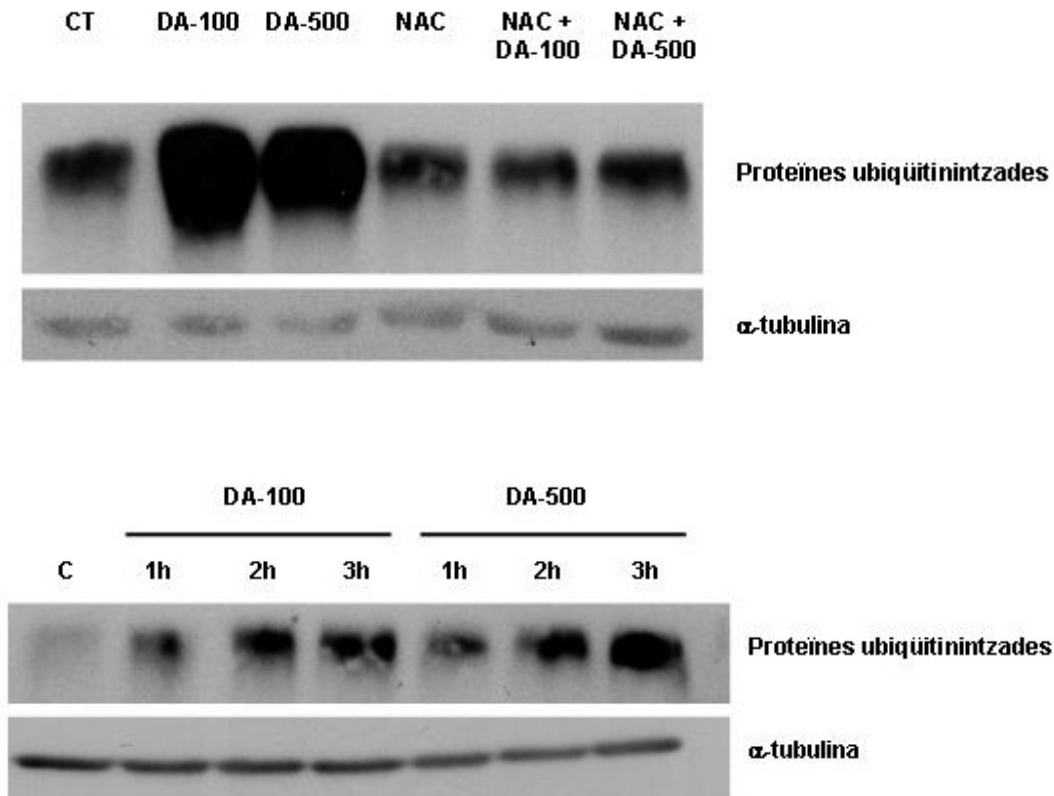


Figura 3.3.26. Western blots de l'efecte de la DA i de la N-acetilcisteïna (NAC, 10 mM) sobre l'acumulació de proteïnes ubiquitinintzades.

DISCUSSIÓ

Encara que l'autofàgia inicialment va ser estudiada com a resposta a una situació d'escassetat de nutrients, avui en dia, un gran nombre d'estudis relacionen processos autofàgics amb malalties. En aquestes circumstàncies la resposta autofàgica podria ser conseqüència d'alteracions en proteïnes i/o orgànuls. Nosaltres hem observat la presència de vesícules autofàgiques en les cèl·lules SH-SY5Y, com a conseqüència del tractament amb DA.

L'aparició d'una elevada vesiculació al citoplasma de les cèl·lules després del tractament amb DA coincideix en el temps amb un increment de la forma unida a autofagosomes d'LC3, LC3-II. La quantitat d'LC3-II es correlaciona amb la presència d'autofagosomes i es considera un bon indicador de la formació d'aquestes estructures (Mizushima, *et al.*, 2007). Per tant, l'increment de la forma LC3-II és proporcional a

l'increment del número d'autofagosomes. No obstant, LC3-II es degrada durant el procés autofàgic pels enzims lisosomals (Tanida, *et al.*, 2005). Aquest fet explicaria l'increment observat en LC3-II després del tractament amb bafilomicina-A1. La bafilomicina-A1 impedeix la unió entre autofagosoma i lisosoma, com a conseqüència d'aquest fet s'interfereix la degradació d'LC3-II i s'afavoreix la seva acumulació. De fet, un elevat increment d'LC3-II, com a conseqüència del tractament amb bafilomicina-A1 en les cèl·lules SH-SY5Y, ja ha estat descrit a la literatura (Zhu, *et al.*, 2007), indicant que aquesta línia cel·lular presenta un elevat *turn-over* lisosomal d'LC3-II en condicions basals.

Nombroses evidències indiquen que una situació d'estrès oxidatiu podria induir processos autofàgics (Kiffin, *et al.*, 2006). El fet de que l'increment d'LC3-II sigui revertit amb N-acetilcisteïna indica que l'autofàgia produïda per la DA és conseqüència de l'oxidació d'aquesta. No obstant, una situació d'elevada peroxidació com la causada pel tBOOH no incrementa LC3-II. Aquest fet ens fa pensar que el més important en l'increment d'LC3-II seria la síntesi i acumulació de les diferents formes oxidades de la DA.

A diferència de l'increment observat en LC3-II, no s'han trobat diferències en l'expressió de l'Atg5, de la beclina-1 i de l'Atg12 després del tractament amb DA. Aquest fet és compatible amb el paper d'aquestes proteïnes durant l'autofàgia. L'acció d'aquestes proteïnes depèn de la interacció entre elles i amb altres proteïnes (Oshumi, 2001; Kihara, *et al.*, 2001; Pattingre, *et al.*, 2005) i, per tant, no seria necessari un increment d'aquestes durant el procés autofàgic. No obstant, cal tenir en compte que aquestes proteïnes s'expressen de forma basal i probablement tenen un paper diferent al del procés autofàgic.

L'estudi de la via de la PI3K-I, revela un descens en la fosforilació de l'S6K. Aquest descens és indicatiu d'una disminució de l'activitat d'mTOR (Fingar, *et al.*, 2002). Estudis recents involucren S6K en la fosforilació d'mTOR a la Thr-2446 i a la Ser-2448 (Chiang, *et al.*, 2005; Holz, *et al.*, 2005), no obstant, es desconeix el paper d'aquestes fosforilacions sobre l'activitat d'mTOR. El descens en la fosforilació d'mTOR en la Ser-2448 seria conseqüència de la inhibició de l'S6K produïda pel tractament amb DA. L'estudi de l'activitat d'AKT, mitjançant el Western blot de les formes fosforilades a la Ser-473 i la Thr-308, mostra un increment de les dues fosforilacions després del tractament amb DA. Com s'ha comentat a la introducció, es pensa que el complex mTORC2 (mTOR rictor) és el responsable de la fosforilació en la Ser-473 (Hay, 2005).

Com que el complex responsable de la fosforilació d'S6K és mTORC1 (mTOR raptor) (Wullschleger, *et al.*, 2006), la DA sembla inhibir mTOR raptor, estimulant el procés autofàgic. Aquesta inhibició pot afavorir l'activitat d'mTOR raptor, que fosforilarà AKT en la Ser-473. La disminució en la fosforilació de S6K també podria explicar l'increment en la fosforilació a la Ser-308 d'AKT, degut a la pèrdua del *feed-back* negatiu exercit per S6K-P sobre IRS-1.

L'increment en la fosforilació d'AKT ens fa pensar que la inhibició d'mTOR per part de la DA tindria lloc *downstream* d'AKT, possiblement a nivell de TSC1/TSC2. Una possibilitat seria mitjançant l'activació d'AMPK com a conseqüència d'una caiguda dels nivells de l'ATP o per acció de p53 (Feng, *et al.*, 2005). Efectivament descensos dels nivells d'ATP com a conseqüència del tractament amb DA estan descrits a la bibliografia (Premkumar, *et al.*, 2002; Ben-Shachar, *et al.*, 2004) i són del tot esperables en una situació de disminució del consum d'oxigen. No obstant, tampoc es pot descartar una inhibició d'mTOR com a conseqüència de l'increment d'HIF-1 α (Brugarolas, *et al.*, 2004) o per les alteracions en l'estat redox de la cèl·lula causades per la DA (Sarbasov, *et al.*, 2005).

La inhibició de la via de la PI3K-I mitjançant LY249002 i rapamicina produeix un increment en LC3-II i un descens en la fosforilació d'S6K. L'estimulació d'aquesta via mitjançant el tractament amb IGF-1 manté S6K fosforilada després del tractament amb DA-100, però no té efecte sobre l'increment d'LC3-II. Aquest fet, juntament amb l'efecte del pre-tractament amb 3-MA, que reverteix l'efecte sobre LC3-II en una situació de privació de sèrum però no després del tractament amb DA, ens fa pensar que l'increment d'LC3-II produït per la DA és degut a l'acció de la DA sobre diferents dianes i probablement sobre diferents vies i que, per tant, els mecanismes que participen en la inducció del procés autofàgic com a conseqüència del tractament amb DA són diferents als d'una situació de privació de serum.

Mitjançant la tècnica de l'RT-MLPA es va observar que la DA produïa un increment en l'expressió dels mRNA de PUMA i NOXA, dos gens situats *downstream* de p53 (Chipuk, *et al.*, 2006). L'estudi mitjançant Western blot va confirmar l'increment de PUMA i ens va permetre veure un increment tant en la forma total de p53 com en la forma fosforilada a la Ser-15 després del tractament amb DA. Encara que tradicionalment p53 s'ha relacionat amb processos de mort cel·lular per apoptosi, estudis recents relacionen aquest factor també amb processos autofàgics. El paper de p53 a l'autofàgia pot venir de la seva capacitat d'inhibir mTOR mitjançant l'activació

d'AMPK i la participació del complex TSC1/TSC2 (Feng, *et al.*, 2005) i/o mitjançant l'activació de gens proautofàgics com DRAM (Crichton, *et al.*, 2006). A més a més, p53 regula l'expressió de diferents proteïnes que inhibeixen la via PI3K-I, com poden ser AMPK β 1, PTEN, TSC2 i IGF-BP3 (Feng, *et al.*, 2007). L'increment de p53 i les seves modificacions postraduccionals poden ser degudes a múltiples causes, tals com el dany al DNA o la hipòxia cel·lular (Horn, *et al.*, 2007). La fosforilació de p53 a la Ser-15 afavoreix la seva estabilitat, ja que s'altera la seva interacció amb Mdm2, un factor que afavoreix l'eliminació de p53 per la via del proteosoma (Shieh, *et al.*, 1997). p53 pot ser fosforilada a la Ser-15 per ATM (Banin, *et al.*, 1998) o per AMPK (Jones, *et al.*, 2005). El paper d'aquesta fosforilació no està clar (Xu, 2003). Sembla que aquesta fosforilació afavoreix l'arrest del cicle cel·lular, però s'ha observat també en cèl·lules que presenten processos de mort cel·lular després del tractament amb H₂O₂ (Chen, *et al.*, 2003).

A part de l'increment de p53 s'han observat altres fenòmens que fan pensar que les cèl·lules SH-SY5Y també presenten processos apoptòtics després del tractament amb DA. No obstant, els increments en l'activació de PARP i de les caspases executores 3 i 7 són molt petits i només s'observen amb la dosi més elevada de DA. A més a més, cal tenir en compte que els processos autofàgic i apoptòtic no són excloents i l'un podria necessitar de l'altre (Crichton, *et al.*, 2006; Xu, *et al.*, 2006).

A part de l'increment en PUMA i NOXA, l'RT-MLPA va revelar un increment de l'expressió de BNIP3 i BNIP3L. L'increment de la proteïna BNIP3 va ser confirmat per Western blot. En canvi BNIP3L no incrementa a nivell de proteïna. Possiblement l'increment de BNIP3 sigui conseqüència de l'increment observat en HIF-1 α després del tractament amb DA, ja que HIF és el principal regulador de l'expressió de BNIP3 (Lee, *et al.*, 2006). Tot i que no estan clars els seus mecanismes d'acció, BNIP3 sembla tenir un paper important en l'autofàgia induïda per hipòxia (Tracy, *et al.*, 2007). BNIP3 és una proteïna BH3-only (Ray, *et al.*, 2000), de la família de BCL-2. A part del seu paper en la protecció de l'apoptosi, BCL-2 sembla ser també un regulador de l'autofàgia, interaccionant amb la beclina-1 (Patingre, *et al.*, 2005). Quan BCL-2 es troba unida a la beclina 1 el procés autofàgic està inhibit. En canvi, quan la beclina 1 no es troba unida a BCL-2 s'afavoriria l'interacció entre la beclina 1 i PI3K-III, induïnt-se l'autofàgia (Figura 3.3.27).

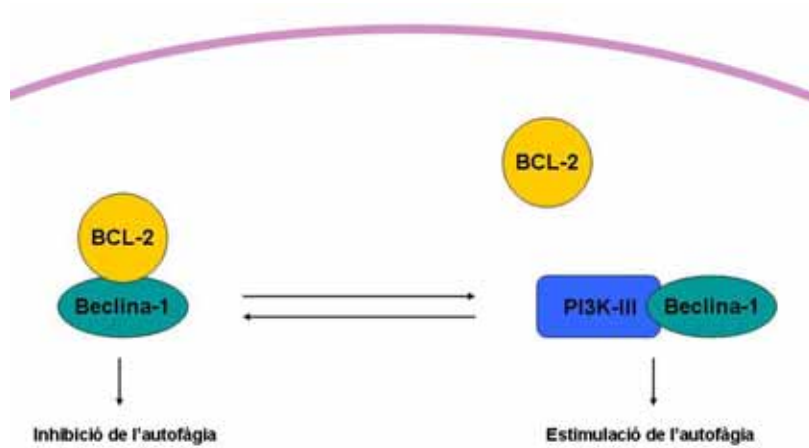


Figura 3.3.27. Model de la interrelació entre BCL-2 i la beclina 1 a l'autofàgia (adaptat de Pattingre, *et al.*, 2006).

Com BNIP3 és un membre de la família de BCL-2 i pot interaccionar amb aquesta (Ray, *et al.*, 2000), nosaltres proposem que l'increment de BNIP3 produït per HIF-1 α alteraria la interacció entre BCL-2 i la beclina 1 (dos proteïnes que no es modifiquen després del tractament amb DA, però que s'expressen en les cèl·lules SH-SY5Y) afavorint l'unió de la beclina 1 a la PI3K-III i l'autofàgia (Figura 3.3.28).

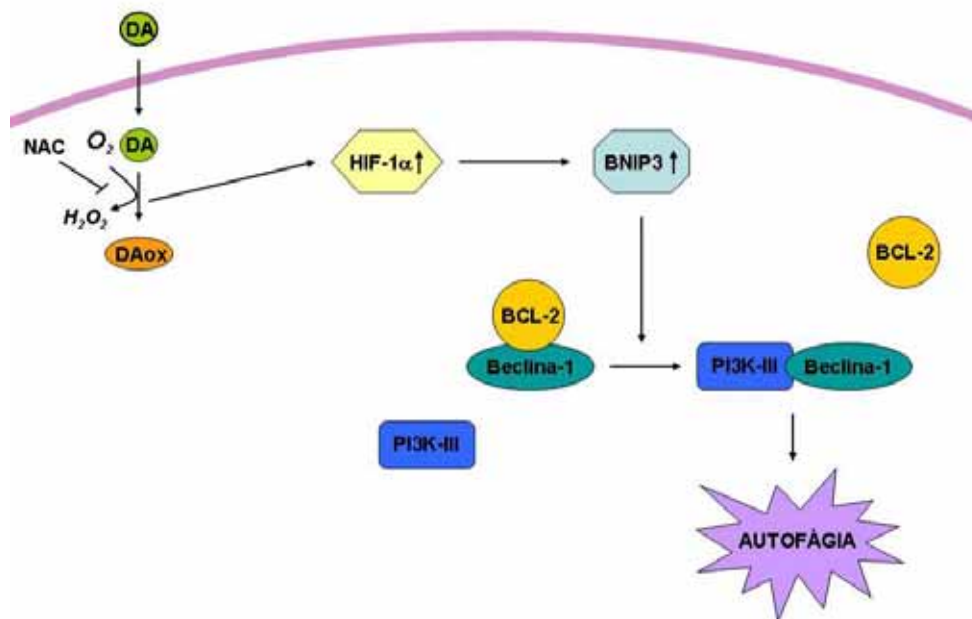


Figura 3.3.28. Model proposat de la interrelació entre BNIP3, BCL-2 i la beclina-1 a l'autofàgia induïda per DA.

Encara que no es pot descartar que altres proteïnes puguin realitzar aquest paper, aquesta hipòtesis estaria reforçada pel fet que la supressió de l'autofàgia mitjançant RNAi d'HIF-1 α manté la unió entre BCL-2 i la beclina 1 (Bohensky, *et al.*, 2007).

La sobreexpressió de BNIP3 indueix autofàgia acompanyada d'una elevada vacuolització (Vande Velde, *et al.*, 2000), tal com s'observa després del tractament amb DA.

Tenint en compte que en condicions de normòxia HIF-1 α és degradada pel proteosoma (Bardos, *et al.*, 2005), varem estudiar l'efecte de la DA sobre el proteosoma. El tractament amb DA produeix un increment en la quantitat de proteïnes ubiquïtinitzades a temps curts i aquest increment és protegit amb l'antioxidant N-acetilcisteïna, a l'igual que el d'HIF-1 α . Encara que la quantitat de proteïnes ubiquïtinitzades és una mesura indirecta de l'activitat del proteosoma i podria ésser conseqüència de l'oxidació de proteïnes per part de la DA (Sulzer, *et al.*, 2000), inactivacions del proteosoma a temps curts ja han estat descrites per acció de la DA (Keller, *et al.*, 2000) i de situacions d'estrès oxidatiu en les cèl·lules SH-SY5Y (Ishii, *et al.*, 2005). Encara que una inhibició del proteosoma pot incrementar HIF-1 α , sembla que HIF-1 α en aquesta situació no es trobaria totalment actiu (Salceda, *et al.*, 1997; Kallio, *et al.*, 1999). No obstant, una situació d'estrès oxidatiu a la vegada que té lloc una inhibició del proteosoma permetria la transcripció dels gens *downstream* d'HIF-1 α (Salceda, *et al.*, 1997).

La relació entre l'autofàgia i una inhibició del proteosoma és clara. Es considera que la inhibició del proteosoma activa l'autofàgia per facilitar la proteòlisi de les proteïnes que no es poden eliminar pel proteosoma (Chen, *et al.*, 2004; Ding, *et al.*, 2007; Rubinsztein, 2007; Pandey, *et al.*, 2007). A més a més, la proteïna p62/SQSTM1 relaciona els agregats de proteïnes ubiquïtinitzades amb la maquinària autofàgica, per la seva capacitat d'unir-se a la ubiquitina i a LC3 (Bjorkoy, *et al.*, 2005). La inhibició del proteosoma també podria ésser la responsable de l'increment de p53 observat després del tractament amb DA, ja que l'eliminació de p53 per part del proteosoma és un dels principals mecanismes per a la seva regulació (Ljungman, 2000; Horn, *et al.*, 2007).

Tenint en compte totes aquestes consideracions pensem que com a conseqüència del procés d'oxidació de la DA es produeix una inhibició del proteosoma. Per

Resultats

compensar aquesta inhibició es posa en marxa la maquinària autofàgica mitjançant HIF-1 α , BNIP3 i l'inhibició d'mTOR raptor. Paral·lelament es produiria un increment-activació de p53 que pot afavorir el procés autofàgic i/o estimular processos apoptòtics.

DISCUSSIÓ GENERAL

El PD és una de les malalties neurodegeneratives humanes més freqüents, especialment en pacients d'edat avançada. Com s'ha comentat en la introducció d'aquesta tesi la gènesi d'aquesta malaltia no és clara, si bé sembla haver un component genètic en un nombre reduït dels casos diagnosticats, la principal causa roman encara desconeguda. La hipòtesi neurotòxica està present des de fa molt temps i el que sembla més lògic és pensar en l'existència d'una condició mixta, es a dir, una predisposició genètica (congènita, heretada o adquirida) i un detonant que podria ser endogen o exogen.

Tota neurona té un temps de vida limitat, però les neurones de la via nigro-estriatal resulten ser especialment vulnerables. Què tenen aquestes neurones diferent d'altres neurones? Principalment que tenen catecolamines. A més, la concentració de DA és especialment important en els nuclis caudat i putamen (Kopin, 1993). Ens podem trobar front a la paradoxa de que el PD, amb una simptomatologia provocada especialment per la manca de DA, sigui desencadenada en primera instància per la mateixa DA? Com s'ha comentat amb anterioritat l'efecte tòxic de la DA administrada de forma exògena en cultius cel·lulars i *in vivo* ja ha estat descrit.

Qualsevol compost és potencialment tòxic a les concentracions adequades, per aquest motiu, mitjançant diversos experiments, el nostre laboratori havia determinat els efectes de diferents concentracions de DA sobre la viabilitat de les cèl·lules SH-SY5Y. En aquest treball hem utilitzat bàsicament dues concentracions de DA a partir de les quals hem trobat i estudiat un efecte tòxic: 100 μM , propera a la concentració total de DA en el nucli estriat, i 500 μM que pot correspondre a la concentració de DA en les terminacions nervioses dopaminèrgiques (donat que les concentracions intravesiculars estan entre 1 i 10 mM) (Kopin, 1993). En tot cas estaríem parlant d'una acumulació de DA a l'interior de la cèl·lula, que podria estar causada per una alteració en l'emmagatzematge de la DA a l'interior de les vesícules o per alguna alteració d'aquestes vesícules que les fes buidar-se intracel·lularment, ja que les concentracions utilitzades tant sols podrien assolir-se extracel·lularment en una situació aguda i com a conseqüència d'un buidat vesicular dràstic.

El primer que s'ha fet es comprovar que la DA s'acumula dins la cèl·lula i aproximadament a quines concentracions ho fa. Amb aquest objectiu hem utilitzat unes cèl·lules en unes condicions que gairebé no expressen transportadors de DA. Malgrat això hem comprovat que la DA entra ràpidament dins la cèl·lula, on arribarà a unes concentracions inferiors però properes a les utilitzades extracel·lularment. En

aquestes concentracions a la DA no li calen transportadors específics (que tenen una K_d al voltant de 2 μM) (Wu, *et al.*, 1999) i podrà utilitzar transportadors de catecolamines o de cations orgànics de forma poc específica.

En el nostre grup ja s'havia comprovat anteriorment que la diferenciació de les cèl·lules de neuroblastoma afectava poc a l'efecte tòxic de la DA (especialment a 500 μM), en tot cas fins i tot el reduïa una mica, possiblement pel fet que al diferenciar-se la cèl·lula de neuroblastoma comença a fer vesícules que poden esmorteir l'efecte de la DA citosòlica. Com que el que ens interessava era bàsicament estudiar els mecanismes de toxicitat de la DA en el citosol i aquest fet es podia garantir amb les cèl·lules no diferenciades, tot l'estudi va prosseguir utilitzant aquest model.

El primer pas dins de la toxicitat mediada per la DA sembla clarament implicar la seva oxidació intracel·lular. La DA oxidada extracel·lularment entra escassament dins la cèl·lula, probablement perquè queda atrapada en la membrana plasmàtica. A més, els antioxidants d'acció extracel·lular (catalasa) o lipídica (vitamina E) no protegeixen front la seva acció tòxica (Gómez-Santos, *et al.*, 2003). Totes les alteracions produïdes per la DA s'han bloquejat amb antioxidants d'acció intracel·lular com la N-acetilcisteïna. Així doncs, per garantir que la DA no sigui tòxica, cal que no s'oxidi. L'oxidació de la DA és un procés tremendament dependent del pH (Sánchez-Rivera, *et al.*, 2003). Al pH de 5,5 present a l'interior de les vesícules aquesta oxidació és molt lenta i la cèl·lula queda protegida. Al pH de 6,8 present al citosol la oxidació és força ràpida. Per evitar aquest procés la neurona dopaminèrgica ha de tenir uns mecanismes molt actius de captació de la DA dins les vesícules (transportadors VMAT) i uns sistemes antioxidants en el citosol i altres orgànuls (especialment glutatió). Particularment vulnerable pot ser la matriu mitocondrial, que pot assolir un pH de 8. Sembla que la DA pot internalitzar-se, mitjançant uns mecanismes no ben definits, dins del mitocondri (Shah, 1972). En tal cas, la seva facilitat per oxidar-se i per danyar l'activitat mitocondrial ha de ser molt superior a la citosòlica. Les concentracions d'antioxidants, especialment de glutatió, haurien de garantir que això no passés, però en el PD algun mecanisme ha d'estar malmès. Possiblement es tracta d'algun mecanisme necessari per a la preservació del mitocondri, com semblen indicar els estudis sobre les funcions dels productes de PINK, DJ-1 i fins i tot de la parkina (Vila, *et al.*, 2004; Hardy, *et al.*, 2006; Tan, *et al.*, 2007). La DA, probablement en la seva forma oxidada, pot ser un bloquejant de la cadena respiratòria mitocondrial i d'altres enzims intramitocondrials (Ben-Shachar, *et al.*, 1995). En els pacients amb PD

els complexes NADH-DH i l' α KGDH semblen tenir una activitat menor a la normal (Tretter, *et al.*, 2004), amb lo qual es podrien veure predisposats a l'acció de la DA.

És difícil precisar si la toxicitat de la DA pot estar vinculada al seu procés d'oxidació o als metabòlits reactius que es produeixen. En el primer cas la DA, a l'oxidar-se, està propiciant un procés de reducció, amb lo que podria ser fins i tot protectora, com hem vist en el cas del tBOOH, però a la vegada està donant lloc a peròxid d'hidrogen i, per tant, a un potencial estrès oxidatiu. Un cop més les peroxidases cel·lulars haurien de ser suficients per frenar l'efecte del peròxid d'hidrogen. S'ha descrit una deficiència en glutatió peroxidasa en la substància negra de malalts de Parkinson, que podria facilitar l'estrès oxidatiu (Kish, *et al.*, 1985). En les nostres cèl·lules, on la glutatió peroxidasa no està en principi alterada (Singh, *et al.*, 2005), l'augment de peroxidació per efecte de la DA és relativament suau, a menys que s'incorpori Fe^{3+} en el medi com a catalitzador d'aquest procés. Les elevades concentracions de ferro en la substància negra i en els ganglis basals en general sempre s'han vist com un factor de risc per l'estrès oxidatiu que poden patir aquestes neurones (Bharath, *et al.*, 2002). De totes formes s'ha de considerar que pot ser molt diferent l'efecte del ferro lliure, tal com s'assaja en el laboratori, que el del ferro quelat en porfirines o en metal·loproteïnes. En el segon cas s'ha de considerar que la DA està donant lloc a quinones i a aminocroms. Les primeres són prou reactives com per unir-se a grups tiol de forma covalent i per tant, potencialment, poder modificar qualsevol proteïna. Quinones i aminocroms junts fàcilment poden polimeritzar donant lloc a pigments poc solubles, com ara la neuromelanina (Zucca, *et al.*, 2004), present sempre a la SNpc i de funció poc aclarida, com ja s'ha comentat anteriorment. Venim a suggerir i en part a demostrar que la DA, oxidant-se a dopaquinona i dopaminocrom, pot reduir-se novament en presència de NADH o NADPH i donar lloc a un cicle redox en el que es pot mermar considerablement el contingut de la forma reduïda d'aquests coenzims, essencials pel bon funcionament cel·lular. En especial, la disminució de NADH mitocondrial durà a una manca de substrat per a la cadena respiratòria i a un aparent bloqueig de la NADH-DH. Al deixar de funcionar el mitocondri, el consum d'oxigen disminueix i la membrana mitocondrial es despolaritza. La cèl·lula respon funcionant en condicions anaeròbiques, accelerant doncs el metabolisme glucolític, que no té limitació de subministrament de substrat, ja que les concentracions de glucosa del medi són hiperglucèmiques.

A part d'aquesta alteració redox, s'han observat altres alteracions com a conseqüència de l'oxidació de la DA. Una de les més primerenques és l'acumulació de

proteïnes ubiquïtinitzades que podria ser conseqüència de la inactivació del proteosoma. La falta d'aquesta via de degradació de proteïnes afavoriria l'acumulació de proteïnes al citoplasma, moltes de les quals estarien danyades per l'elevada reactivitat dels grups quinona dels derivats oxidats de la DA, entre les danyades molt probablement hi hauria les que formen el mateix proteosoma. Com a conseqüència d'aquest fet i d'altres mecanismes s'activarien una sèrie de vies que modificarien l'expressió de tota una gama de gens implicats en la transducció de senyals i en mort o supervivència cel·lular. D'entre aquests vàrem triar inicialment GADD153 i C/EBP β , per ser factors de transcripció emparentats estructuralment i pel fet de que GADD153 semblava ser una de les proteïnes que més augmentava per efecte de la DA. L'augment d'aquest factor està vinculat tant a l'activació de p38 com a l'estrès reticular i s'observa especialment a les concentracions més altes de DA. L'augment de c/EBP β també pot ser desencadenat per l'activació de p38 i es dona ja a concentracions de DA aparentment no tòxiques, prèviament a l'augment d' α -sinucleïna. Com el promotor d' α -sinucleïna té fins a vuit potencials caixes de reconeixement de c/EBP β , l'augment d'aquest factor de transcripció podria explicar l'augment d' α -sinucleïna que es troba després del tractament amb DA (Gómez-Santos, *et al.*, 2003), no obstant, també podria ésser conseqüència de la inhibició del proteosoma. Pot ser que l'augment d' α -sinucleïna sigui una resposta de la cèl·lula front a una agressió que afecta l'activitat cel·lular. No podem dir si aquest augment respon a una defensa de la cèl·lula front a una agressió o bé representa un senyal de dany que arrenca un procés d'autodestrucció. L'acumulació d' α -sinucleïna, conjuntament amb la de les proteïnes alterades per les quinones i les proteïnes ubiquïtinitzades no degradades pel proteosoma pot afavorir la formació d'agregats de nucleació, amb característiques d'agressoma, que donen lloc a la formació al seu voltant de vacuoles autofàgiques i a l'activació d'un senyal d'estrès reticular.

La DA desencadena doncs clarament i de forma dosi-dependent un procés d'autofàgia en el citoplasma cel·lular. Pensem que la finalitat de l'autofàgia és un cop més la de salvar la cèl·lula, però si l'agressió no s'atura la cèl·lula s'acaba morint per acció de la mateixa autofàgia, o bé mitjançant un procés apoptòtic en alguns casos o simple necrosi en d'altres.

El mecanisme que du a l'autofàgia podria ser el mateix estrès reticular i la sortida de calci del reticle (Høyer-Hansen, *et al.*, 2007) o bé la inhibició del proteosoma (Ding, *et al.*, 2007). Però altres paràmetres s'han trobat modificats de forma interessant. BNIP

és, com s'ha descrit en els resultats, una proteïna de la família de les BH3-only que s'ha trobat incrementada tant pel *microarray* proteòmic com per l'RT-MLPA, és a dir que augmenta la seva expressió i el seu contingut proteic. BNIP3 és un factor que s'expressa no tant sols a neuroblastomes, sinó també a cervell i concretament a la SNpc (<http://www.brain-map.org>, Allen Institute for Brain Science), per lo que l'efecte que es descriu de la DA sobre BNIP3 podria ser extrapolable al que passa a la neurona dopaminèrgica. BNIP3 ja s'ha descrit anteriorment com factor que s'indueix quan hi ha autofàgia. Un dels factors que el regulen és HIF-1 α , factor que s'indueix ràpidament en situacions d'hipòxia o d'estrès oxidatiu i com hem vist després del tractament amb DA. Per tant, la cèl·lula es comporta de forma semi-anaeròbica, de manera que la relació lactat/piruvat augmenta, i com a conseqüència d'aquest fet, els nivells d'AMP han d'estar augmentats, podent-se activar l'AMPK. Aquest procediment per si sol pot explicar l'aturada de la ruta de mTOR per part de la DA, sense descartar algun efecte més directe sobre TSC1/TSC2 o Rheb. L'aturada d'aquesta via pot ser suficient per dur a l'autofàgia, tal com té lloc amb rapamicina o amb privació de sèrum. No obstant, l'activació de LC3-I a LC3-II no s'acaba d'evitar reforçant la via PI3K-mTOR amb IGF-1 ni bloquejant la formació de l'autofagolisosoma amb 3-MA. Sembla que l'autofàgia mediada per DA tingui algun component més a part de l'autofàgia convencional mediada per la manca de sèrum. Des del moment que l'autofàgia sembla estar regulada també pel factor BCL-2 que inhibeix el complex PI3K-III-beclina 1, proposem que un augment citosòlic de BNIP3 pot desplaçar BCL-2 d'aquest complex i activar així l'autofàgia.

CONCLUSIONS

- 1) La dopamina a concentracions entre 100 i 500 μM redueix de forma significativa a les 24 hores el contingut de cèl·lules en cultius cel·lulars de neuroblastoma humà SH-SY5Y, produint-se un descens de la viabilitat i la proliferació cel·lular.
- 2) La dopamina afegida al medi de cultiu a concentracions de 100 i 500 μM entra ràpidament a l'interior de les cèl·lules SH-SY5Y.
- 3) La dopamina pot induir l'oxidació del NADH i NADPH, i augmentar la forma oxidada del glutatió, disminuint el potencial reductor de la cèl·lula.
- 4) La dopamina afecta l'activitat mitocondrial disminuint el consum d'oxigen i disminuint el potencial de membrana mitocondrial, si bé aquest fet no es veu reflectit en un marcat augment de l'apoptosi.
- 5) La dopamina desencadena una resposta activa per part de la cèl·lula que es tradueix en l'alteració de l'expressió i contingut d'un bon nombre de proteïnes. Són especialment indicatius els augments en GADD153, C/EBP β , α -sinucleïna, p53, HIF-1 α i BNIP3.
- 6) L' α -sinucleïna augmenta com a resposta a la dopamina, probablement regulada per C/EBP β . La dopamina podria tenir doncs per si mateixa un paper en l'augment i dipòsit d' α -sinucleïna en la malaltia de Parkinson.
- 7) Com a conseqüència de l'oxidació de la dopamina es produeix un increment de proteïnes ubiquitinitzades en les cèl·lules SH-SY5Y.
- 8) La dopamina indueix autofàgia i en menor grau apoptosi en les cèl·lules SH-SY5Y a partir de les 12 hores de tractament. Ambdós processos poden coexistir en el temps.
- 9) La dopamina inhibeix la via de mTOR i per tant l'activació d'S6K.
- 10) HIF-1 α i BNIP3 són probablement els factors que posen en marxa la maquinària autofàgica.

Conclusions

- 11) Els paràmetres mesurats que resulten alterats per la dopamina es reverteixen amb antioxidants d'acció intracel·lular com la N-acetilcisteïna, per tant, el procés d'oxidació de la dopamina és bàsic per explicar-nos els seus mecanismes de toxicitat.

TAULA DE CONTINGUTS DE LA METODOLOGIA

Reactius i productes específics	147
Cultius cel·lulars	148
Microscòpia electrònica	151
Anàlisi del contingut intracel·lular de calci per microscòpia confocal	152
Anàlisi de la viabilitat cel·lular	154
Anàlisi de la proliferació cel·lular	156
Anàlisi del cicle cel·lular per citometria de fluxe	157
Anàlisi del potencial de membrana mitocondrial	159
Anàlisi de la generació de radicals lliures	161
Estudi de la captació de dopamina i dopaminocrom	163
Anàlisi del consum d'oxigen	164
Anàlisi del contingut intracel·lular de dopamina i DOPAC	165
Preparació del dopaminocrom	166
Anàlisi de l'activitat de la MAO-A	167
Anàlisi del potencial reductor de les cèl·lules	169
Oxidació <i>in vitro</i> de la dopamina i el NAD(P)H	178
Tècniques d'anàlisi de proteïnes	179
Tècniques de biologia molecular	188

REACTIUS I PRODUCTES ESPECÍFICS

Productes	Empresa o persona proveïdora
Bafilomicina-A1	Sigma
Cicloheximida	Sigma
Clorur de Cobalt	Aldrich
DOPAC	Sigma
Dopamina	Sigma
[7,8- ³ H]-Dopamina	Amersham Biosciences
Fluo-4 AM	Invitrogen
GSH	Sigma
GSSG	Sigma
LY294002	Calbiochem
3-Metiladenina	Sigma
N-acetilcisteïna	Sigma
MTT	Sigma
NADH	Sigma
HADPH	Sigma
Rapamicina	Calbiochem
SB203580	Calbiochem
SP600125	Tocris Cookson Ltd
Tapsigargina	Sigma
TCP	Sigma
Tert-butilhidroperòxid	Sigma
[³ H]-Timidina	Amersham Biosciences
Tunicamicina	Sigma

CULTIUS CEL·LULARS

Cultiu de les cèl·lules SH-SY5Y

Les cèl·lules de neuroblastoma humà SH-SY5Y es fan créixer en *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) complementat amb un 10% de *fetal bovine serum* (FBS), glutamina 2 mM, 100 U/ml de penicil·lina i 100 µg/ml d'estreptomina. Els cultius es mantenen en una atmosfera humida a una temperatura de 37 °C que conté un 10% de CO₂.

Un cop arribades a una confluència d'aproximadament el 80%, les cèl·lules són canviades de plats mitjançant l'addició de tripsina 0,25%. Es treu el DMEM i es fan dos rentats amb PBS estèril abans d'afegir la tripsina. Després de 3 minuts a 37 °C, l'acció de la tripsina s'atura afegint medi amb sèrum prèviament escalfat a 37 °C. Per acabar de desenganxar les cèl·lules ens podem ajudar de la pipeta. Finalment les cèl·lules es reparteixen entre els plats.

Estudis previs del nostre laboratori indicaven que la diferenciació d'aquestes cèl·lules afectava poc a l'efecte tòxic de la DA, per aquest motiu varem decidir utilitzar-les sense diferenciar.

Criopreservació i descongelació de les cèl·lules SH-SY5Y

Per criopreservar les cèl·lules després de la tripsinització es resuspenen amb el mateix DMEM utilitzat pel cultiu complementat amb un 10% de DMSO estèril. Les cèl·lules s'aliquoten en tubs de 2ml que es mantenen a -80 °C durant 12-24 hores en un congelador d'isopropanol on la temperatura disminueix lentament. Finalment es traslladen al congelador de nitrogen líquid.

Per descongelar les cèl·lules, el tub criopreservat es situa en un bany a 37 °C. Quan el contingut està gairebé descongelat es bolca en un falcon amb 10 ml de medi prèviament escalfat a 37 °C. Les cèl·lules es centrifuguen 5 minuts a 1000 x g per eliminar el medi que conté el DMSO i finalment es resuspenen en medi fresc.

Diferenciació de les cèl·lules SH-SY5Y amb àcid retinoic

Les cèl·lules SH-SY5Y es diferencien en plaques que han estat polilisinades.

Partim d'una solució mare de poli-D-lisina 1 mg/ml preparada amb aigua estèril i conservada a -20 °C. Per polilisinat les plaques afegim la poli-D-lisina a una concentració final de 0,1 mg/ml de tal forma que cobreixi el plat. Es deixa 24h a l'incubador i finalment es fan dos rentats amb aigua estèril.

Les cèl·lules es diferencien afegint àcid retinoic al medi a una concentració final de 10 µM. El procés dura una setmana i el medi amb l'àcid retinoic es canvia cada dos dies.

Transfecció de les cèl·lules SH-SY5Y

Transfecció mitjançant FuGene 6

Reactius.

- FuGene 6 (Roche).

Protocol.

Les transfeccions es realitzen en plaques de 6 pous i les cèl·lules han de presentar una confluència d'aproximadament el 20-40%.

- 1- En un Eppendorf afegir 97 µl de medi sense FBS i 3 µl de FuGene.
- 2- En un altre Eppendorf afegir la quantitat de DNA desitjada (1-2 µg si es tracta d'un plàsmid).
- 3- Deixar 5 minuts a temperatura ambient.
- 4- Deixar caure el medi amb FuGene sobre el DNA gota a gota amb l'ajuda de la pipeta i deixar 15 minuts a temperatura ambient.
- 5- Rentar la placa i afegir 600 µl de medi sense FBS per pou.
- 6- Afegir la mescla als pous.
- 7- Esperar 2-3 hores i afegir 2 ml de medi normal.

Transfecció mitjançant Lipofectamina 2000

Reactius.

- Lipofectamina 2000 (Invitrogen).

Protocol.

Les transfeccions es realitzen en plaques de 6 pous i les cèl·lules han de presentar una confluència d'aproximadament el 40%. És important treure els antibiòtics del medi el dia abans de realitzar la transfecció.

- 1- En un Eppendorf diluir la quantitat de DNA desitjada en 500 μ l d'Opti-MEM sense sèrum i mesclar.
- 2- En un altre Eppendorf diluir 20 μ l de Lipofectamina en 500 μ l d'Opti-MEM.
- 3- Deixar 5 minuts a temperatura ambient.
- 4- Mesclar el DNA diluït amb la Lipofectamina diluïda.
- 5- Deixar 20 minuts a temperatura ambient.
- 6- Rentar les cèl·lules amb PBS i afegir la mescla als pous.
- 7- Esperar 3 hores abans d'afegir el medi normal.

Nota: Mitjançant la transfecció d'un plàsmid que contenia la proteïna GFP (*green fluorescent protein*) es va veure que les cèl·lules SH-SY5Y es transfectaven molt millor amb la Lipofectamina 2000 que amb el FuGene 6.

MICROSCÒPIA ELECTRÒNICA

Per estudiar l'aparició d'estructures autofàgiques després del tractament amb DA, es van observar les cèl·lules SH-SY5Y al microscopi electrònic. Per la preparació de les mostres es van sembrar les cèl·lules en plaques de Petri i després dels tractaments desitjats es van tripsinitzar i recollir en Eppendorfs. Finalment les cèl·lules es van fixar amb glutaraldehyd al 2,5% en PBS i es van portar als serveis científico-tècnics de la UB on es va finalitzar el seu processament.

Les mostres es van visualitzar amb un microscopi electrònic de transmissió JEOL 1010 amb sistema de digitalització d'imatges Bioscan (Gatan).

ANÀLISI DEL CONTINGUT INTRACEL·LULAR DE CALCI PER MICROSCÒPIA CONFOCAL

Fonament.

Aquest mètode es basa en mesurar/visualitzar l'increment de la fluorescència del Fluo-4 com a conseqüència de la seva unió al Ca^{2+} intracel·lular.

Reactius.

- Stock de Fluo-4 AM 1 mM.
 - 50 μg Fluo-4 AM
 - 10 μl Plurònic al 20% en DMSO
 - 35,6 μl DMSO
- Solució salina tamponada amb HEPES (SSTH o HBSS).

Components	Concentració
NaCl	135 mM
KCl	5 mM
CaCl ₂	1,8 mM
MgSO ₄	0,62 mM
HEPES	10 mM

Aquesta solució s'ajusta a pH 7.4 amb NaOH. La solució preparada sense glucosa es conserva a 4 °C. Tanmateix, abans del seu ús s'hi ha d'afegir glucosa 6 mM.

- Solució de PBS + glicerol, per a 1 ml:
 - 850 μl d'aigua
 - 50 μl de PBS 20X
 - 100 μl de glicerol

Protocol.

- 1- Sembrar les cèl·lules sobre cubreobjectes estèrils en plaques de 6 pous.
- 2- Deixar les cèl·lules créixer a l'incubador permetent la seva adhesió.
- 3- Afegir les drogues o reactius a les cèl·lules i deixar en incubació el temps desitjat.
- 4- Fer dos rentats amb SSTH.
- 5- Incubar les cèl·lules amb Fluo-4 AM ($2 \mu\text{M}$) en SSTH durant 60 minuts.
- 6- Fer dos rentats amb SSTH.
- 7- Incubar les cèl·lules en SSTH durant 30 minuts.
- 8- Muntatge: Rentar els portaobjectes amb etanol i afegir uns $10 \mu\text{l}$ de la solució de PBS + glicerol abans de posar els cubreobjectes.
- 9- Observar les mostres al microscopi confocal.

ANÀLISI DE LA VIABILITAT CEL·LULAR

Estudi de la viabilitat cel·lular mitjançant l'MTT

Fonament.

Aquest mètode es basa en la capacitat dels mitocondris de convertir l'MTT (de color groc) en cristalls de formazan (de color porpra). Aquesta conversió depèn del poder reductor que caracteritza les cèl·lules vives.

Reactius i solucions.

- MTT (sigma) preparat a una concentració de 5 mg/ml en PBS 1X estèril.
- Isopropanol (amb 10% tritó X-100) i HCl 1M (24:1).

Protocol.

- 1- Sembrar les cèl·lules en els pous d'una placa de 24 pous. El numero de cèl·lules s'ha d'optimitzar segons la línia utilitzada, la concentració d'MTT i el temps d'incubació (es recomana una absorbància final de 0-1 → linealitat).
- 2- Deixar créixer les cèl·lules a l'incubador permetent la seva adhesió.
- 3- Afegir les drogues o reactius a les cèl·lules i deixar en incubació el temps desitjat.
- 4- Treure les cèl·lules del incubador i a la campana de flux laminar afegir l'MTT a cada pou amb una proporció 1:10 per obtenir una concentració final de 0,5 mg/ml. Agitar lleugerament.
- 5- Incubar a 37 °C. El temps varia segons la línia cel·lular i la concentració d'MTT. Per SH-SY5Y i MTT 0,5mg/ml el temps d'incubació ha de ser aproximadament de 2 hores.
- 6- Treure la placa de l'incubador i afegir un volum de la solució d'Isopr-X-100-HCl a cada pou.
- 7- Barrejar molt bé amb la pipeta perquè els cristalls es dissolguin i tot quedi en suspensió.
- 8- Finalment les mostres es passen a una placa de 96 pous que es llegeix en un lector de plaques a una longitud d'ona de 550nm. Major quantitat d'absorbància indica major poder reductor de les cèl·lules i, per tant, major viabilitat cel·lular.

Important: Si les cèl·lules s'han tractat amb dopamina abans de posar l'MTT s'han de fer dos rentats amb PBS.

Estudi de la viabilitat cel·lular mitjançant la tinció amb taronja d'acridina i bromur d'etidi

Fonament.

Aquest colorant està format per taronja d'acridina i bromur d'etidi (1:1). El bromur d'etidi penetra en les cèl·lules que presenten la membrana cel·lular trencada i s'uneix al DNA. Al mirar al microscopi de fluorescència aquestes cèl·lules s'observen de color taronja-vermell. Les cèl·lules que presenten la membrana cel·lular intacta s'observen de color verd per l'entrada del taronja d'acridina. Aquest colorant és tòxic per a les cèl·lules de manera que la visualització i el comptatge s'ha de fer ràpidament.

Solucions.

- Solució mare:
 - 5 mg Taronja d' acridina.
 - 5 mg Bromur d' etidi.
 - 500 µl de DMEM sense roig fenol.

- Solució de treball:
 - 100 µl de la solució mare.
 - 10 ml de DMEM sense roig fenol.

Protocol.

- 1- Aspirar el medi i fer 2 rentats amb PBS.
- 2- Afegir el volum necessari de la solució de treball per cobrir les cèl·lules.
- 3- Ràpidament mirar al microscopi de fluorescència.

ANÀLISI DE LA PROLIFERACIÓ CEL·LULAR

Quantificació de la proliferació cel·lular mitjançant la incorporació de timidina tritiada

Fonament.

Durant la divisió cel·lular les cèl·lules incorporen la timidina marcada radioactivament amb triti (^3H) per sintetitzar el nou DNA. Per tant, la quantitat de timidina tritiada incorporada és un bon indicador de la proliferació cel·lular.

Reactius i solucions.

- Stock de timidina tritiada ($0,1 \mu\text{Ci}/\mu\text{l}$).
- Àcid tricloracètic (TCA) 5% a 4°C .
- Etanol 70%.
- Solució de lisi (2% Na_2CO_3 , 0,1 M NaOH, 1% SDS).

Protocol.

- 1- Plaquejar les cèl·lules en plaques de 12 pous a la densitat adequada.
- 2- Deixar les cèl·lules créixer a l'incubador permetent la seva adhesió.
- 3- Rentar 2 cops amb PBS.
- 4- Incubar durant el temps desitjat amb DMEM i timidina tritiada ($1 \mu\text{Ci}/\text{ml}$; 1mM) juntament amb els factors a estudiar.
- 5- Rentar 2 cops amb 1 ml de PBS a 4°C .
- 6- Fixar les cèl·lules durant 20 minuts amb 1 ml de TCA 5% a 4°C .
- 7- Rentar amb 1 ml de TCA 5% a 4°C .
- 8- Rentar amb 2 ml d'etanol 70%.
- 9- Deixar secar les plaques durant 5 minuts.
- 10- Afegir 0,6 ml de la solució de lisi i incubar durant 20 minuts a 37°C .
- 11- Afegir 0,5 ml de cada mostra en 5 ml de líquid de centelleig.
- 12- Mesurar les cpm de cada mostra.

ANÀLISI DEL CICLE CEL·LULAR PER CITOMETRIA DE FLUXE

Fonament.

En aquest protocol es descriu l'utilització de iodur de propidi (IP) per mesurar el contingut de DNA. Aquest fluorocrom s'intercala als àcids nucleics incrementant la seva fluorescència. Aquesta unió és estequiomètrica. Com aquesta molècula no es especifica del DNA cal tractar les mostres amb RNasa per eliminar l'RNA.

Reactius i solucions.

- Tampó citrat-fosfat pH 7.8 (Na₂HPO 0.2 M: àcid cítric 0.1 M (192:8)).
- IP (0,5 mg/ml).
- RNasa A lliure de DNasa (10 mg/ml).
- Etanol 70% (-20 °C).

Protocol.

- 1- Recollir el medi d'incubació. Rentar dos cops amb PBS i tripsinitzar. Ajuntar les cèl·lules tripsinitzades amb les cèl·lules flotants presents en el medi d'incubació.
- 2- Centrifugar 1 ml d'una suspensió cel·lular que contingui $1-2 \times 10^6$ cèl·lules/ml 5 minuts a 400 x g.
- 3- Rentar 2 cops amb 1 ml de 1% de sèrum en PBS i centrifugar 1 minut a 500 x g.
- 4- Resuspendre molt bé les cèl·lules en 0,5 ml d'1% de sèrum en PBS. Sobre 5 ml d'etanol fred (-20 °C) al 70% afegir gota a gota la suspensió de cèl·lules en PBS ben disgregades amb una *pasteur* agitant amb el *vortex* suaument.
- 5- Fixar a -20 °C un mínim de 2h i un màxim de 3 setmanes.
- 6- Centrifugar 5 minuts a 800 x g i eliminar l'etanol.
- 7- Rentar un cop amb 1% de sèrum en PBS, centrifugar i descartar la fase aquosa.
- 8- Resuspendre el precipitat amb 50-500 µl de tampó citrat-fosfat i incubar un mínim de 30 minuts i un màxim de 2h a temperatura ambient.
- 9- Centrifugar 5 minuts a 800 x g i eliminar el tampó citrat-fosfat.

Materials i mètodes

- 10- Resuspendre en 400 μl d'1% de sèrum en PBS i afegir 50 μl de IP.
- 11- Afegir 5 μl d'RNasa A lliure de DNasa i incubar de 30 a 45 minuts a 37 °C i a les fosques.
- 12- Analitzar per citometria de flux.

ANÀLISI DEL POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL

Estudi del potencial de membrana mitocondrial mitjançant el JC-1

Fonament.

Quan les cèl·lules s'incuben amb JC-1, aquest entra a l'interior cel·lular i s'acumula l'interior de la matriu mitocondrial quan la càrrega a l'interior del mitocondri és negativa. Perquè la matriu mitocondrial es mantingui carregada negativament respecte el citosol és necessari que la membrana mitocondrial estigui intacta. L'acumulació del JC-1 afavoreix la formació d'agregats que emeten fluorescència vermella al ésser excitats amb el làser 488 del citòmetre. Les cèl·lules que perden el potencial de membrana, perden la diferència de càrrega i el JC-1 no s'acumula, quedant diluït al citoplasma i emetent fluorescència verda. La pèrdua de potencial de membrana s'observa com un desplaçament de la població cel·lular, augmenta la fluorescència verda i disminueix la fluorescència vermella.

Reactius i solucions.

- Stock de JC-1 2,5 mg/ml dissolt en DMSO.
- DMEM sense sèrum.
- DMEM sense roig de fenol.

Protocol.

- 1- Sembrar les cèl·lules en plaques de 6 pous (així aconseguirem aproximadament 10^6 cèl·lules per pou).
- 2- Deixar les cèl·lules créixer a l'incubador, permetent la seva adhesió.
- 3- Tractar les cèl·lules amb la droga el temps necessari.
- 4- Fer dos rentats amb DMEM sense sèrum.
- 5- Afegir el JC1 (4 μ g/ml), prèviament diluït en un volum petit de medi i barrejat molt bé amb la pipeta, en DMEM sense sèrum i incubar durant 45 minuts a l'incubador.
- 6- Després dels 45 minuts fer 2 rentats amb DMEM sense sèrum.
- 7- Tripsinitzar i resuspendre les cèl·lules amb DMEM sense roig de fenol (ha de portar un 10% de sèrum per neutralitzar la tripsina).

Materials i mètodes

- 8- Centrifugar 5 minuts a 1000 x g.
- 9- Aspirar el medi i resuspendre en 500 µl de DMEM sense roig de fenol i sense sèrum.
- 10- Passar les mostres pel citòmetre.

ANÀLISI DE LA GENERACIÓ DE RADICALS LLIURES

Determinació del nivell intracel·lular d'hidroperòxids mitjançant diacetat de 2',7'-diclorofluoresceïna

Fonament.

El diacetat de 2',7'-diclorofluoresceïna (DCFH-DA) és una molècula no fluorescent i permeable a les cèl·lules. Dins de la cèl·lula, els acetats són hidrolitzats per estereses endògenes. La presència intracel·lular d'espècies reactives d'oxigen, principalment peròxids, encara que també peroxonitrits, oxida el DCFH-DA a 2',7'-diclorofluoresceïna (DCF), la qual és altament fluorescent.

Reactius i solucions.

- DCFH-DA.

Es prepara una solució mare 5 mM en DMSO, i es conserva a -80 °C.

- Solució Salina Tamponada amb HEPES (SSTH o HBSS).

Components	Concentració
NaCl	135 mM
KCl	5 mM
CaCl ₂	1,8 mM
MgSO ₄	0,62 mM
HEPES	10 mM

Aquesta solució s'ajusta a pH 7.4 amb NaOH. La solució preparada sense glucosa es conserva a 4 °C. Tanmateix, abans del seu ús s'hi ha d'afegir glucosa 6 mM.

Protocol.

- 1- Sembrar les cèl·lules en plaques de 12 o 24 pous a la densitat adequada.
- 2- Deixar les cèl·lules créixer a l'incubador permetent la seva adhesió.
- 3- Tractar les cèl·lules amb la droga el temps necessari.
- 4- Fer 2 rentats amb SSTH.
- 5- Afegir el DCFH-DA (10 μ M).
- 6- Deixar la placa 30 minuts a 37 °C, protegida de la llum.
- 7- Fer 2 rentats amb SSTH.
- 8- Llegir la placa al lector de plaques de fluorescència. Les longituds d'ona d'excitació i emissió són 485 nm i 538 nm respectivament.

ESTUDI DE LA CAPTACIÓ DE DOPAMINA I DOPAMINOCROM

Reactius.

- [7,8-³H]-DA.
- [7,8-³H]-DAcr (a partir de l'oxidació de la [7,8-³H]-DA, segons s'explica posteriorment).

Protocol.

- 1- Sembrar les cèl·lules en plaques de 6 pous a la densitat adequada.
- 2- Deixar les cèl·lules créixer a l'incubador permetent la seva adhesió.
- 3- Incubar les cèl·lules amb diferents concentracions de DA o DAcr, que contenen 10 nCi/mmol de [7,8-³H]-DA o [7,8-³H]-DAcr, el temps desitjat.
- 4- Rentar 3 cops amb DMEM (l'últim rentat es guarda i es comprova que no hi ha radioactivitat).
- 5- Lisar les cèl·lules amb 0,6 ml de SDS 1%.
- 6- Afegir 0,5 ml de cada mostra en 5 ml de líquid de centelleig.
- 7- Mesurar les cpm de cada mostra.

ANÀLISI DEL CONSUM D'OXIGEN

Fonament.

El consum d'oxigen es mesura en una suspensió cel·lular a 37 °C que es manté en agitació (750 rpm) per tal d'obtenir el 100% de saturació de l'oxigen. Per l'adquisició i l'anàlisi de les dades s'utilitza un respiròmetre d'alta resolució Oxygraph amb el software DatLab (Oroboros, Innsbruck, Austria). El consum d'oxigen extra-mitochondrial es mesura amb l'adició d'actimicina A (20 µM) i els resultats són estandarditzats en relació al contingut de proteïnes a l'interior de la cambra al finalitzar l'experiment.

Protocol.

- 1- Aspirar el medi i rentar 2 cops amb PBS.
- 2- Trispinitzar i contar les cèl·lules.
- 3- Ajustar la suspensió cel·lular per obtenir 10^5 cèl·lules/ml.
- 4- Omplir la càmera del respiròmetre amb la suspensió cel·lular i adquirir les dades.

ANÀLISI DEL CONTINGUT INTRACEL·LULAR DE DOPAMINA I DOPAC

Fonament.

La determinació de DA i DOPAC es va realitzar per cromatografia líquida d'alta resolució (LKB-Pharmacia, Bromma, Sweden). La detecció es fa electroquímicament mitjançant un detector dual (Coulochem II, ESA).

Material i solucions.

- Columna: Columna nucleosil C-18 de fase reversa (5 μ M, 250x4,6 mm).
- Fase mòbil:
 - Acetat sòdic 50 mM
 - Àcid cítric 25 mM
 - Àcid octansulfònic 0,7 mM
 - 10% metanol
 - pH: 4.1

La fase mòbil es filtra amb un filtre de 0,2 μ m de por i es desgasifica amb una bomba de buit i agitació magnètica. El metanol s'ha d'afegir després de la desgasificació.

- Flux: 0,8 ml/minut.
- Elèctrodes:
 - E1: +50 mV
 - E2: +300 mV

Protocol.

- 1- Sembrar les cèl·lules en plaques de 6 pous a la densitat adequada.
- 2- Deixar les cèl·lules créixer al incubador permetent la seva adhesió.
- 3- Tractar les mostres amb DA els temps desitjats.
- 4- Rentar les cèl·lules 2 cops amb PBS.
- 5- Lisar les cèl·lules amb HClO₄ 0,4 M.
- 6- Centrifugar les mostres a 13000 rpm.
- 7- Filtrar els sobrenedants amb un filtre de 0,4 μ m de por.
- 8- Passar els sobrenedants per l'HPLC.

PREPARACIÓ DEL DOPAMINOCROM

El DAcr es prepara seguint el protocol descrit per Aroca, *et al.*, 1990, on es descriu que el rendiment del procediment és del 100%.

Solucions.

- Periodat 20 mM.
- DA 20 mM.

Els dos es preparen en un tampó tris 2M pH 6,8.

Protocol.

- 1- Mesclar volums iguals de periodat i DA.
- 2- Deixar 2 hores i 30 minuts a temperatura ambient.
- 3- Centrifugar 1 minut a 13000 rpm .
- 4- Filtrar el sobrenedant a la campana de cultius.

ANÀLISI DE L'ACTIVITAT DE LA MAO-A

Fonament.

L'activitat de la MAO-A es detecta radioquímicament amb un substrat marcat amb ^{14}C seguint el protocol descrit per Fowler, *et al.*, 1981.

Reactius, tampons i animals.

- Rates mascles albines del tipus Sprague Dawley.
- Tampó d'homogeneïtzació:
 - KH₂PO₄ 10 mM
 - Sacarosa 0,25 M
 - pH 7,2
- KH₂PO₄ 50 mM pH 7,2
- 5-HT (Sigma)
- Amina marcada:
 - [^{14}C]-5-TH, 55 mCi/mmol, 50 $\mu\text{Ci/ml}$ (Amersham).
- Àcid cítric 2M.
- Toluè/acetat d'etil (1:1) amb un 0,6% de 2,5-difeniloxazol.

Protocol.

Les fraccions mitocondrials es preparen per centrifugació diferencial (Gómez, *et al.*, 1986). Primer de tot s'extreuen els fetges, es pesen, es col·loquen dins d'un vas de precipitats que conté tampó d'homogeneïtzació 10% (p/v) i s'homogeneïtza. Després de filtrar amb una gasa, l'homogenat és sotmès a una sèrie de centrifugacions diferencials que conduiran a l'obtenció de la fracció mitocondrial. L'homogenat es centrifuga a 600 x g durant 10 minuts, el pèl·let es descarta i es recentrifuga el sobrenedant un altre cop a 600 x g 10 minuts. El pèl·let es descarta. El sobrenedant obtingut es centrifuga a 8000 x g durant 10 minuts. Aquest pèl·let conté els mitocondris.

La fracció mitocondrial s'incuba durant 30 minuts en presència de diferents concentracions d'inhibidor. Per realitzar això 160 μl de tampó fosfat potàssic 50 mM pH 7,2 es mesclen amb 20 μl d'inhibidor i es deixa temperar 5 minuts a 37 °C. A

continuació s'hi afegixen 20 μ l d'enzim (140-200 μ g) i s'incuba durant 30 minuts a 37°C. L'activitat es mesura afegint 5-HT marcada radioactivament durant 15 minuts a 37 °C. Sobre 90 μ l d'amina marcada s'afegeixen 10 ml d'una solució 900 μ M de 5-HT freda. Afegir 25 μ l d'aquesta solució dins la mescla de reacció, la concentració de 5-HT serà de 100 μ M, que en aquestes condicions actua com a substrat específic de la MAO-A (Fowler, et al., 1982). Finalment la reacció s'atura amb àcid cítric 2M. Els productes aldehid resultants s'extrauen amb toluè/acetat d'etil (1:1) que conté 0,6% de 2,5-difeniloxazol abans de ser llegits amb el líquid de centelleig. L'activitat total de la MAO-A es determina en les mateixes condicions i l'activitat final s'expressa en percentatge respecte de la total.

ANÀLISI DEL POTENCIAL REDUCTOR DE LES CÈL·LULES

Estudi de la relació GSH/GSSG

Fonament.

La determinació del glutatió es realitza mitjançant el protocol descrit per Senft, *et al.*, 2000.

Per dur a terme aquest procediment s'utilitza un substrat fluorescent, l'OPA (*o-phthalaldehyde*). La fluorescència d'excitació emesa per l'OPA és de 365nm, i la d'emissió és de 420 nm.

L'assaig consisteix en parelles de mostres, la A i la B, on la mostra A és el *background*, és a dir, presenta la fluorescència no específica del glutatió i, per tant, s'ha de restar a la fluorescència obtinguda en la mostra B.

Reactius i solucions.

- RQB (*Redox quenching buffer*).
 - 20 mM HCl.
 - 5 mM DTPA.
 - 10 mM àcid ascòrbic.
- PCA-RQB.
 - 5% de PCA preparat en RQB.
- NEM (*N-ethylmaleimide*).
 - 7,5 mM de NEM preparada en RQB.
- 1M KPi (pH 7).
 - 50 ml HK_2PO_4 1M + 50 ml H_2KPO_4 1 M .
- 0,1M KPi (pH 6,9).
- DT.
 - 100 mM de *dithionite* preparat en RQB.
- OPA.
 - 5 mg/ml en metanol.

Important: KPi, DT i OPA es preparen just abans d'ésser utilitzades. Tots els reactius han d'estar a 4 °C.

Preparació dels standards.

Per fer la corba patró s'utilitzen GSH 0,1 mM i GSSG 0,1 mM preparades en PCA-RQB.

Per eliminar les restes de GSSG es prepara una solució 1mM de GSH en PCA-RQB. En aquesta solució afegim 125 mg de zinc. Mesclem i centrifuguem durant 5 minuts a 1000 rpm. Finalment, el sobrenedant es filtra amb un filtre de 0,22 µm i es dilueix fins 0,1 mM amb PCA-RQB.

Preparació de les mostres.

- 1- Sembrar les cèl·lules en plaques de Petri a la densitat adequada.
- 2- Deixar les cèl·lules créixer al incubador permetent la seva adhesió.
- 3- Tractar les mostres amb la droga els temps desitjats.
- 4- Rentar les plaques en gel 2 cops amb PBS fred.
- 5- Lisar les cèl·lules amb 1 ml de PCA-RQB.
- 6- Escrapejar les mostres i centrifugar durant 10 minuts a 13000 rpm a 4 °C.
- 7- El sobrenedant es guarda a -80 °C o es pot utilitzar directament, però sempre abans d'ésser utilitzat s'ha de centrifugar durant 5 minuts a 13000 rpm a 4 °C i filtrar a través d'un filtre de 0,45 µM de por.

Els pèl·lets s'utilitzen per determinar les proteïnes. Per fer això resuspenem el pèl·let amb 1 ml de PCA 7%, centrifuguem 10 minuts a 13000 rpm i resuspenem el pèl·let amb NaOH 1M.

Protocol.

Es preparen una sèrie de tubs on afegim els reactius seqüencialment d'esquerra a dreta tal com s'indica a la següent taula:

	Tub	Mostra	PCA-RQB	RQB	1M Kpi	0,1M Kpi	OPA	
Patro 0,1mM	0	0	150 µl	20 µl	250 µl	1 ml	150 µl	
	0,1	1 µl	149 µl	20 µl	250 µl	1 ml	150 µl	
	0,25	2,5 µl	147,5 µl	20 µl	250 µl	1 ml	150 µl	
	0,5	5 µl	145 µl	20 µl	250 µl	1 ml	150 µl	
	1	10 µl	140 µl	20 µl	250 µl	1 ml	150 µl	
	1,5	15 µl	135 µl	20 µl	250 µl	1 ml	150 µl	
	2	20 µl	130 µl	20 µl	250 µl	1 ml	150 µl	
Detecció GSH	Tub	Mostra	PCA-RQB	NEM	1M Kpi	0,1M Kpi	OPA	
	A	7 µl	143 µl	20 µl	250 µl	1 ml	150 µl	
	B	7 µl	143 µl	20 µl d'RQB	250 µl	1 ml	150 µl	
Detecció GSSG	Tub	Mostra	PCA-RQB	NEM	1M Kpi	DT	0,1M Kpi	OPA
	A	10 µl	140 µl	20 µl	250 µl	30 µl d'RQB	1 ml	150 µl
	B	10 µl	140 µl	20 µl	250 µl	30 µl	1 ml	150 µl

	5 min
	30 min
	60 min

Després d'afegir a les mostres el NEM i el KPi 1M s'incuben durant 5 minuts a temperatura ambient. En la mesura de GSSG, a continuació s'afegeix DT i es deixa incubar a temperatura ambient durant 60 minuts. Posteriorment al afegir el KPi 0,1M i l'OPA s'incuben les mostres 30 minuts a temperatura ambient. Immediatament després es llegeixen les mostres al lector de plaques de fluorescència.

Important: Com el PCA produeix una solució tèrbola, abans de llegir les mostres s'han de centrifugar 5 minuts a 1000 rpm.

Estudi del contingut intracel·lular de NADH i NADPH

Obtenció d'extractes cel·lulars per determinar el contingut intracel·lular de NAD(P)H

Per obtenir extractes cel·lulars destinats a determinar el contingut intracel·lular de NAD(P)H es segueix el protocol proposat per Stocchi, *et al.*, 1985. Atès que el pH bàsic preserva la forma reduïda dels nucleòtids, les cèl·lules es lisen amb una solució alcalina (pH 9). Per una altra banda, l'ús de l'agent tensioactiu NP-40 per a la lisi cel·lular permet l'alliberament dels components intracel·lulars sense trencar el nucli, una circumstància que provocaria una elevada senyal de fons a l'anàlisi final.

Solucions.

• Solució de lisi alcalina:

NaCl	150 mM
Tris-HCl	50 mM
NP-40	0,5% (vol/vol)

El pH s'ajusta a 9 amb KOH 1M i es conserva a 4 °C.

Protocol.

- 1- Sembrar les cèl·lules en plaques de Petri a la densitat adequada.
- 2- Deixar les cèl·lules créixer a l'incubador permetent la seva adhesió.
- 3- Tractar les mostres amb la droga els temps desitjats.
- 4- Rentar les plaques en gel 2 cops amb PBS estèril fred.
- 5- Afegir 1 ml de la solució de lisi i lisar les cèl·lules amb l'ajuda del *scraper*.
- 6- Centrifugar el lisat a 13000 x g durant 5 minuts a 4 °C
- 7- Filtrar immediatament els sobrenedants a través d'uns filtres de 0,4 µm de por (Unitats d'ultrafiltració per centrifugació Ultrafree-MC® (Millipore) amb un pes molecular d'exclusió de 10 KDa.) a 5000 x g durant 60 minuts a 4 °C. Els pèl·lets es guarden per determinar-ne les proteïnes.
- 8- Transferir l'eluït a Eppendorfs estèrils i congelar les mostres a -20 °C.

Determinació de NAD(P)H

El contingut de nucleòtids dels extractes cel·lulars es fa mitjançant cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC) en fase reversa, seguint el protocol proposat per Tian, *et al.*, 1998.

Material i solucions.

- Equip d'HPLC ((LKB-Pharmacia) amb detector UV a 340 nm).
- Columna: Columna nucleosil C-18 de fase reversa (5 µM, 250x4,6 mm).

- Fase mòbil:

Acetat de sodi 50 mM

15% metanol

pH 8

La fase mòbil es filtra amb un filtre de 0,2 μm de por i es desgasifica amb una bomba de buit i agitació magnètica. El metanol s'ha d'afegir després de la desgasificació.

- Flux: 1 ml/minut.

Estudi de les relacions lactat/piruvat i NADH/NAD⁺

Obtenció d'extractes cel·lulars per determinar el contingut intracel·lular de lactat i piruvat

Solucions.

- Solució de lisi:

HClO₄ 6%.

Protocol.

- 1- Sembrar les cèl·lules en plaques de Petri a la densitat adequada.
- 2- Deixar les cèl·lules créixer a l'incubador permetent la seva adhesió.
- 3- Canviar el medi i tractar les mostres amb la droga els temps desitjats.
- 4- Guardar el medi en el que han crescut les cèl·lules.
- 5- Rentar les cèl·lules amb PBS i tripsinitzar.
- 6- Recollir les cèl·lules i centrifugar 5 minuts a 500 rpm.
- 7- Aspirar el medi i resuspendre les cèl·lules en PBS.
- 8- Centrifugar 5 minuts a 500 rpm.
- 9- Aspirar el medi i resuspendre les cèl·lules en 100 μl de PBS + 100 μl de solució de lisi.
- 10- Congelar les mostres a -80 °C per assegurar-nos que les cèl·lules es lisen completament.
- 11- Descongelar les mostres i centrifugar-les durant 5 minuts a 13000 rpm a 4° C.

- 12- Neutralitzar els sobrenedants amb NaOH fins tenir un pH de 7 i guardar els pèl·lets per mesurar les proteïnes.

Determinació del contingut intracel·lular de piruvat

El contingut de piruvat intracel·lular es determina mitjançant un protocol adaptat del proposat per MacDonald, *et al.*, 2000.

Tampons i solucions.

- Tampó imidazol 50 mM pH 7.
- Solució de reacció (1ml).
 - 981 μ l de tampó imidazol.
 - 8 μ l de NADH 50 mM preparat en tampó imidazol.
 - 11 μ l de LDH (550 U/mg) diluïda 1:100 en aigua.
- HCl 0,1M.
- NaOH 12M.

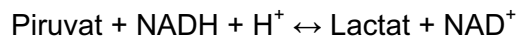
Protocol.

- 1- En una placa de 96 pous afegir: 100 μ l de mostra + 100 μ l de solució de reacció.
- 2- Deixar 15 minuts a temperatura ambient.
- 3- Afegir 40 μ l d'HCl 0,1 M.
- 4- Deixar 15 minuts a 80 °C.
- 5- Afegir 75 μ l de NaOH 12 M.
- 6- Deixar 15 minuts a 80 °C.
- 7- Llegir al lector de plaques de fluorescència. Les longituds d'ona d'excitació i emissió són 355 nm i 440 nm respectivament.

Les concentracions s'obtenen a partir d'una corba patró de piruvat i els resultats s'expressen en nmol/mg de proteïna.

Determinació del contingut de lactat*Fonament.*

El mètode utilitzat es basa en determinar indirectament la concentració de lactat, a través de la mesura de la formació de NADH a partir de la reacció catalitzada per la lactat deshidrogenasa (LDH):

*Reactius i solucions.*

- Tampó hidrazina-glicina pH 9,5.

Hidrazina	0,3125 M
-----------	----------

Glicina	0,875 M
---------	---------

NAD ⁺	2,5 M
------------------	-------

EDTA	0,1875 M
------	----------

- LDH (550 U/mg) diluïda 1:4.
- Les mostres es dilueixen amb aigua 1:10. Si el que es vol mesurar és el lactat del medi s'utilitza una dilució 1:20.

Protocol.

- 1- En una placa de 96 pous afegir: 50 µl de mostra diluïda + 75 µl de tampó.
- 2- Afegir 20 µl de LDH diluïda i llegir a 340 nm (lectura A₀).
- 3- Incubar 20 minuts a 37 °C.
- 4- Llegir a 340 nm (lectura A₁)

Per fer els càlculs restarem la mesura inicial (A₀) a la final (A₁) i tindrem en compte la dilució de la mostra. Les concentracions s'obtenen a partir d'una corba patró de lactat i els resultats s'expressen en nmol/mg de proteïna.

Relació NADH/NAD⁺

La relació [NADH]/[NAD⁺] al citoplasma es calcula amb la fórmula:

$$[\text{NADH}]/[\text{NAD}^+] = [\text{Lactat}]/[\text{Piruvat}] \times K_{\text{LDH}}$$

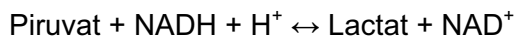
On la K_{LDH} és $1,1 \times 10^{-4}$ a pH 7

(Barron, *et al.*, 2004).

Estudi del contingut intracel·lular de NAD⁺

Fonament.

El mètode utilitzat es basa en determinar el NAD⁺ a partir de la formació de NADH mitjançant la reacció catalitzada per la lactat deshidrogenasa (LDH):



Reactius i solucions.

- Tampó hidrazina-glicina pH 9,5.

Hidrazina 0,3125 M

Glicina 0,875 M

EDTA 0,1875 M

- LDH (550 U/mg) diluïda 1:50.

- Lactat 13,32 mM.

- Solució de reacció:

45 μl de lactat 13,32 mM

33 μl de LDH diluïda

27 μl de tampó hidrazina-glicina

Protocol.

- 1- Les mostres s'obtenen igual que en l'estudi de les relacions lactat/piruvat i NADH/NAD⁺.
- 2- En una placa de 96 pous afegir: 100 µl de mostra + 50 µl de tampó hidrazina-glicina.
- 3- Llegir a 340 nm (lectura A₀).
- 4- Afegir 150 µl de la solució de reacció.
- 5- Incubar 10 minuts a 37 °C.
- 6- Llegir a 340 nm (lectura A₁).

Calculs.

Formula: $\Delta A = \epsilon cl$

Coeficient d'absorció molar (ϵ) del NADH a 340 nm = 6,22 mM⁻¹ cm⁻¹.

OXIDACIÓ IN VITRO DE LA DA I EL NAD(P)H

Les oxidacions de la DA i el NAD(P)H es mesuren en una solució de PBS 1X a pH 7 en un lector de plaques a unes longituds d'ona de 492 i 340 nm respectivament.

La DA es prepara en PBS 0,1M pH 7 i el NAD(P)H en aigua.

TÈCNiques D'ANÀLISI DE PROTEÏNES

Tampòns generals

- SB 1X.
 - 50 mM Tris-HCl pH 6,8.
 - 10 % Glicerol.
 - 2 % SDS.

Extracció proteica

Inhibidors de proteases.

PMSF	1 mM	Dissolt en isopropanol.
Benzamidina	50 µg/ml	Dissolta en aigua milliQ.
Pepstatina	1 µg/ml	Dissolta en etanol:acètic (9:1).
Aprotinina	2 µg/ml	Dissolta en Hepes 0,01M pH 8.
Leupeptina	5 µg/ml	Dissolta en aigua milliQ.

Inhibidors de fosfatases.

NaF	1 mM	Dissolt en aigua milliQ.
Ortovanadat	0,1 mM	Dissolt en aigua milliQ pH 10.
2-Glicerol fosfat	10 mM	Dissolt en aigua milliQ.

Extracció proteica mitjançant SB

Tampòns.

- SB 1X.
 - Abans d'èsser utilitzat s'afegeixen: PMSF i NaF.

Protocol.

- 1- Rentar 2 cops amb PBS 1X.
- 2- Afegir 70-100 μ l per pou d'SB 1X (això per plaques P6 i depèn de la quantitat de cèl·lules, moltes cèl·lules 100 μ l, poques cèl·lules 70 μ l).
- 3- Escrapejar amb l'*scraper*.
- 4- Recollir amb la pipeta el contingut del pou i posar-lo en un Eppendorf.
- 5- Vortejar.
- 6- Bullir a 95° C 10 minuts al bany sec.
- 7- Fer un pols de centrifuga i guardar al congelador (-20 °C) o quantificar directament.

Extracció proteica mitjançant un tampó NP-40

Solucions.

- Tampó de lisis (4° C):

Tris 40 mM pH 7,5

NaCl 150 mM

NP-40 0,2%

Glicerol 10%

Abans d'ésser utilitzat s'afegeixen els inhibidors de proteases i fosfatases.

- SB 4X

Protocol.

- 1- Rentar 2 cops sobre gel amb PBS 1X fred.
- 2- Afegir 50 μ l per pou de Tampó de lisi en una placa de 6 pous.
- 3- Escrapejar amb l'*scraper*.
- 4- Recollir amb la pipeta el contingut del pou i posar-lo en un Eppendorf.
- 5- Centrifugar 5 minuts a 12000 rpm a 4 °C.
- 6- Recollir el sobrenedant i afegir 16,67 μ l de SB 4X.
- 7- Bullir a 95° C 10 minuts al bany sec.
- 8- Fer un pols de centrifuga i guardar al congelador (-20 °C) o quantificar directament.

Extracció de proteïnes citosòliques i mitocondrials

Solucions.

- Tampó de lisi (4 °C)
 - Tris 25 mM pH 6,8.
 - Sucrosa 250 mM.
 - EDTA 1mM.
 - Digitonina 0,1 mg/ml.
 - DTT 1mM.
 - Els inhibidors de proteases.
- SB 1X
- SB 4X

Protocol.

- 1- Recollir els sobrenedants.
- 2- Fer 2 rentats amb PBS que es guarden conjuntament amb el sobrenadant.
- 3- Tripsinitzar les cèl·lules i ajuntar-les amb el sobrenadant.
- 4- Centrifugar 5 minuts a 800 rpm i posar les mostres en gel (a partir d'aquest moment es treballa en gel).
- 5- Rentar 2 cops les cèl·lules amb PBS 1X fred.
- 6- Lisar les cèl·lules durant 30 segons amb tampó de lisi (100 µl per cada pou d'una P6). Per lisar correctament les cèl·lules ens ajudem de la pipeta.
- 7- Centrifugar 3 minuts a 13000 rpm a 4 °C.
- 8- Separem el sobrenedant del pèl·let.
- 9- Al sobrenedant afegim Xµl de SB 4X. On X és igual al volum de sobrenedant recuperat dividit per tres.
- 10- Al pèl·let afegim 100 µl de SB 1X.
- 11- Vortejar les mostres.
- 12- Bullir a 95° C 10 minuts al bany sec.
- 13- Pols de centrifuga i guardar al congelador (-20 °C) o quantificar directament.

El sobrenedant conte les proteïnes citosòliques i el pèl·let conte les proteïnes mitocondrials i nuclears.

Valoració de la concentració de proteïnes mitjançant el BCA

Fonament.

Aquesta mètode es basa en la capacitat del àcid bicinconínic (BCA) per detectar el Cu^{1+} que es forma quan el Cu^{2+} es redueix com a conseqüència de les proteïnes que conformen un entorn bàsic. Aquest reactiu és compatible amb la presència de diversos detergents, entre ells el SDS 1% i el tritó X-100 1%. Dues molècules de BCA quelen una molècula de Cu^{1+} i el complex resultant presenta un color directament proporcional a la quantitat de proteïna present a la mostra.

Reactius i solucions.

- BCA.
 - Reactiu A.
 - Reactiu B.
- SB 1X.

Protocol.

- 1- Diluir el SB 1X: 4950 μl d'aigua + 50 μl de SB 1X.
- 2- Preparar la recta patró tal com s'indica a continuació :

SB diluït	Albúmina 2 mg/ml (2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	[Albúmina] ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
960 μl	40 μl	80
500 μl	500 μl del tub anterior	40
500 μl	500 μl del tub anterior	20
500 μl	500 μl del tub anterior	10
450 μl	450 μl del tub anterior	5
480 μl	320 μl del tub anterior	2
250 μl	250 μl del tub anterior	1
500 μl	Res	0

- 3- Diluir les mostres 1:100 \rightarrow 297 μl d'aigua i 3 μl de mostra.
- 4- En una P96 afegir 100 μl de mostra o patró.
- 5- Preparar el BCA: 4,9 ml de reactiu A + 0,1 ml de reactiu B .
- 6- Afegir 100 μl de BCA a cada pou.

- 7- Incubar 30 minuts a 37-80 °C (l'increment de temperatura incrementa la velocitat de la reacció).
- 8- Llegir al lector de plaques a una longitud d'ona de 550 nm.

Western blot

Electroforesi de proteïnes en gel de poliacrilamida

Solucions i tampons.

- SB 1X.
- DTT 1M tenyit amb blau de bromofenol.
- Tampó separador.
 - 375 mM Tris-HCl pH 8,8.
 - 0,1% SDS.
- Tampó concentrador.
 - 125 mM Tris-HCl pH 6,8.
 - 0,1% SDS.
- Tampó d'electroforesi.
 - 25 mM Tris-HCl pH 8,3.
 - 192 mM Glicina.
 - 0,1% SDS.

Protocol.

- 1- Preparar el gel d'acrilamida separador segons el pes molecular de les proteïnes a detectar (les proteïnes petites necessiten d'un separador més concentrat) tal com s'indica a la taula. Deixar polimeritzar 20 minuts.
- 2- Preparar el gel d'acrilamida concentrador tal com s'indica a la taula. Col·locar la pinta amb els pous. Deixar polimeritzar 30 minuts.
- 3- Preparar les mostres amb la quantitat de proteïna adequada (normalment 50 µg). Es carreguen volums de mostra iguals, amb aquest objectiu afegirem SB 1X fins que tots els volums siguin iguals. A les mostres també afegim DTT (100 mM).
- 4- Bullir les mostres durant 10 minuts a 95 °C i centrifugar-les.
- 5- Carregar les mostres i córrer el gel a 120-160 V.

Materials i mètodes

	Separador 15%	Separador 12 %	Separador 10%	Separador 7,5%	Concentrador 3%
Tampó (ml)	2,5	2,5	2,5	1,88	1,25
Acrilamida 40% (ml)	3,75	3	2,5	2,5	0,5
Aigua (ml)	3,75	4,5	5	5,62	3,25
TEMED (μ l)	12,5	12,5	12,5	12,5	5
APS 10% (μ l)	37,5	37,5	37,5	37,5	20

Transferència a una membrana de nitrocel·lulosa

Tampons.

- Tampó de transferència.

25 mM Tris-HCl pH 8.3.

192 mM Glicina.

10-15% Metanol.

El % de metanol varia en funció del % d'acrilamida al gel separador. Quan més gran sigui el % d'acrilamida major és el % de metanol que s'ha d'utilitzar.

Protocol.

- 1- Activar la membrana durant 1 minut amb metanol i rentar-la amb aigua.
- 2- Muntar els cassetts tipus sandwich.
- 3- Transferir durant 1 hora i quart a 400 mA.

Immunoblot

Tampons.

- TBS.

20 mM Tris-HCl pH 7,5.

137 mM NaCl.

- TBS-T.
 - 20 mM Tris-HCl pH 7,5.
 - 137 mM NaCl.
 - 0,1% Tween.
- Solució al 5% de llet en pols preparada en TBS-T.

Protocol.

- 1- Bloquejar la membrana durant 1 hora amb llet per evitar les unions inespecífiques.
- 2- Incubar la membrana amb l'anticòs primari diluït en llet i amb un 0,05% d'àcida sòdica durant tota la nit.
- 3- Rentar 3 cops la membrana amb TBS-T durant 5 minuts.
- 4- Incubar la membrana amb l'anticòs secundari diluït en llet durant 1 hora a temperatura ambient.
- 5- Rentar 2 cops la membrana amb TBS-T durant 5 minuts.
- 6- Rentar la membrana amb TBS durant 5 minuts.
- 7- Revelar per quimioluminiscència.

Quantificació

Els films s'escanegen i densitometren amb el programa Multi Gauge V3.0, Fujifilm, per tal de calcular la intensitat de cada banda. El resultat es refereix a una proteïna normalitzadora, habitualment α -tubulina.

Reutilització de membranes

Solucions.

- Solució de *stripping*.
 - 62,5 mM Tris-HCl pH 6,8.
 - 2% SDS.
- Abans d'utilitzar afegir β -mercaptoetanol 100 mM.

Protocol.

- 1- Activar la membrana amb metanol durant 1 minut i rentar-la amb aigua.
- 2- Incubar la membrana en la solució d'*stripping* durant 30 minuts a 50 °C.
- 3- Rentar 3 cops la membrana amb TBS-T durant 10 minuts.

Anticossos utilitzats

Anticòs	Casa comercial	Referència	Dilució
AKT	Santa Cruz	SC1618	1:500
α -sinucleïna	Chemicon	AB5038	1:500
ATF6	Alexis	ALX-804-381	1:100
ATG5L	Abgent	AP1812b	1:500
ATG12	Abgent	AP1816a	1:500
α -tubulina	Sigma	T9026	1:4000
BAX	Pharmingen	554104	1:1000
BCL-2	Dako	M0887	1:1000
Beclina	Transduction	612112	1:500
BNIP3	Sigma	B7931	1:500
BNIP3L	Calbiochem	PC525	1:500
Caspasa 3	Pharmingen	557035	1:200
Caspasa 7	Cell Signaling	9494	1:1000
C/EBP β	Santa Cruz	SC150	1:100
D2/D3 Receptor	Chemicon	AB1502	1:500
DARP32	Chemicon	AB1556	1:500
DAT	Chemicon	MAB369	1:500
ECL Anti-goat	Dako	P0449	1:2500
ECL Anti-mouse	Healthcare	NA931	1:5000
ECL Anti-rabbit	Healthcare	NA934V	1:5000
GADD153	Santa Cruz	SC7351	1:100
GRP78	Transduction	610978	1:500
HIF-1 α	Transduction	610958	1:250
LC3	T. Yoshimori*		1:2000
mTOR	Cell Signaling	2972	1:1000
p53	Labvision	MS186-P1	1:200
PARP	Santa Cruz	SC7150	1:200
Phospho-ACC	Upstate	07-303	1:100
Phospho-AKT (Ser473)	Cell Signaling	9271	1:1000
Phospho-AKT (Thr308)	Cell Signaling	9275	1:1000
Phospho-mTOR	Cell Signaling	2971	1:1000
Phospho-p53(ser15)	Cell Signaling	9284	1:1000
Phospho-p70 S6K	Cell Signaling	9206	1:2000
PUMA	Abcam	AB9645	1:2000
Proteïnes Ubiquitinitzades	Biomol international	PW8810	1:1000
PTEN	Cell Signaling	9552	1:1000

* L'anticòs anti-LC3 utilitzat ha estat cedit pel Dr. Tamotsu Yoshimori del National institute of genetic, Mishima, Shizouka-ken, Japó, al qual estic molt agraït per la seva col·laboració desinteressada.

TÈCNiques DE BIOLOGIA MOLECULAR

Aïllament d'RNA

Per aïllar l'RNA de les cèl·lules es fa servir el kit comercial Ultraspect RNA Isolation System (Biotech). El kit es basa en la tècnica de purificació del RNA descrita per Chomczynski, *et al.*, 1987.

Reactius.

- Ultraspect.
- Aigua DEPC estèril.

Protocol.

Per obtenir la major quantitat de RNA es treballa amb plaques de Petri. Tot el procés es fa en gel, amb guants i utilitzant material estèril. Els dissolvents orgànics com l'ultraspect i el cloroform s'han d'afegir en una campana d'extracció.

- 1- Posar les plaques en gel.
- 2- Rentar 2 cops amb PBS fred i estèril.
- 3- Afegir 1 ml d'ultraspec i escrapejar les plaques.
- 4- Recollir les mostres en un Eppendorf.
- 5- Afegir 200 µl de cloroform i vortejar.
- 6- Centrifugar a 4° C 10 minuts a 13000 rpm.
- 7- Recuperar el sobrenedant.
- 8- Afegir el mateix volum del recuperat d'isopropanol fred per precipitar l'RNA.
- 9- Vortejar i deixar a -20 °C un mínim d'una hora o tota la nit.
- 10- Centrifugar 20 minuts a 4° C i 13000 rpm.
- 11- Treure isopropanol i afegir 500 µl d'etanol 75% fred.
- 12- Vortejar i centrifugar 10 minuts a 4° C i 13000 rpm.
- 13- Treure l'etanol i deixar secar fins que el precipitat es vegi de color blanc.
- 14- Resuspendre amb 50 µl d'aigua DEPC prèviament escalfada a 65 °C.

Obtenció de cDNA

Per sintetitzar el cDNA a partir del RNA aïllat de les cèl·lules es va fer servir el kit comercial de retrotranscripció *Ready-To-Go T-Primed First-Strand Kit* (Amersham) seguint el protocol del fabricant. La quantitat de RNA utilitzada pot variar entre 1 i 5 µg.

Amplificació del cDNA per PCR

Les PCRs es realitzen en un volum final de 50 µl que conté 0,3 mM de cadascun dels dNTPs, 1,5 mM de MgCl₂ i 1,25 unitats de Taq polimerasa (Ecogen).

El programa de la PCR és diferent segons els *primers* utilitzats i la temperatura d'anellament depèn del percentatge de G i C. El número de cicles (20-35) dependrà de la quantitat de cDNA del gen que estem estudiant. També cal tenir en compte que el temps d'elongació dependrà de la longitud del fragment a amplificar.

Exemple:

1- Desnaturalització	94 °C, 5 minuts	
2- Cicles: 25	Desnaturalització	94 °C, 30 segons
	Anellament	55 °C, 30 segons
	Elongació	72 °C, 1 minut
3- Elongació	72 °C, 10 minuts	

Extracció de bandes en un gel d'agarosa

Per extraure les bandes d'un gel d'agarosa s'utilitza el Glassmilk que és una resina que atrapa el DNA.

Reactius.

- Glassmilk (Genclean II).
- New wash (Genclean II).

Protocol.

- 1- Extreure la banda amb un bisturí al transiluminador.
- 2- Incubar la banda amb NaI 6M (1 ml o 3 volums del pes de la banda).
- 3- Vortejar.
- 4- Dissoldre completament l'agarosa situant-la en un bany a 55 °C.
- 5- Afegir el Glassmilk (5 µl), que haurem prèviament dissolt totalment.
- 6- Vortejar i agitar durant 10-15 minuts a temperatura ambient.
- 7- Centrifugar 1 minut a 12000 rpm i fer 3 rentats amb New wash.
- 8- Deixar secar el pèl·let 10-15 minuts.
- 9- Resuspendre amb aigua (5 µl) i tris 1 mM pH 7,5 (2 µl).
- 10- Centrifugar 1 minut a 12000 rpm i recollir el sobrenedant.

Nota: Per recollir més quantitat de mostra podem tornar a resuspendre el pèl·let amb aigua i tris i recollir de nou el sobrenedant.

Digestions

Les digestions es preparen tenint en compte el tampó més adient pel/s enzim/s que es van a utilitzar. La temperatura d'incubació també dependrà del/s enzim/s. El volum afegit d'enzim no pot ésser superior al 10% del volum final degut al contingut de glicerol. Per calcular el temps d'incubació es té en compte que una unitat d'enzim talla 1 µg de DNA per hora a la temperatura recomanada pel fabricant.

Exemple del que s'ha d'afegir a un Eppendorf estèril per realitzar una digestió:

- 42,7 µl d'aigua milliQ estèril.
- 2 µl de DNA (1 µg/µl).
- 5 µl del tampó corresponent.
- 0,3 µl d'enzim

Lligacions

Per fer les lligacions s'utilitzen 50 ng de plàsmid.

La quantitat de ng del insert es dedueix amb la fórmula:

$$ng_{\text{insert}} = ng_{\text{vector}} \times pb_{\text{insert}} / pb_{\text{vector}}$$

En la lligació la relació insert:vector que s'utilitza és de 3:1.

Cal tenir en compte que al fer la lligació es fan servir 2 tubs, el 3:1 i el 0:1, aquest últim no conté insert i és el control de la lligació. Un cop transformades i sembrades els bacteris hauria d'haver-hi més colònies a la placa 3:1 que a la 0:1.

Reactius.

Lligasa T4.

Buffer 10X.

Protocol.

Afegir a cada tub el següent per a un volum final de 20 µl:

	0:1	3:1
Insert	-	µl calculats
Vector	µl calculats	µl calculats
Buffer 10X	2 µl	2 µl
Lligasa T4	1 µl	1 µl
Aigua milliQ estèril	Fins a 20 µl	Fins a 20 µl

Els tubs es deixen tota la nit a 16 °C.

Transformació

Material.

- Bacteris competents.
- Medi de cultiu LB.
- Plaques d'LB-agar amb l'antibiòtic d'elecció.

Protocol.

- 1- Descongelar en gel una alíquota de bacteris competents.
- 2- Afegir uns 50 ng del plasmidi que es vol transformar (en cas que provingui d'una lligació s'afegiran 2 μ l) en 100 μ l de competents.
- 3- Realitzar un xoc tèrmic fred-calor. Els competents es deixen 30 minuts en gel, després 45 segons a 42 °C i finalment 2 minuts en gel.
- 4- Afegir 500 μ l d'LB sense antibiòtic a la campana de bacteris.
- 5- Incubar 1 hora a 37 °C en agitació.
- 6- Plaquejar uns 100 μ l a les plaques d'LB-agar amb l'antibiòtic d'elecció.

Preparació d'*stocks* de glicerol

Material.

- Glicerol 80% (v/v) estèril.
- Medi de cultiu LB.

Protocol.

- 1- Crèixer els bacteris amb LB i l'antibiòtic d'elecció durant tota la nit a 37 °C.
- 2- A 810 μ l del cultiu de bacteris afegir 190 μ l de glicerol 80% de manera que el percentatge final és del 15%.
- 3- Mesclar i congelar a -80 °C.

Electroforesi en gel d'agarosa

La concentració d'agarosa (0,75-2%) depèn del tamany del fragment que volem visualitzar, quan més petit sigui el fragment, major haurà d'ésser el percentatge del gel.

Reactius i tampons.

- Agarosa.
- TAE 1X.
 - 40 mM Tris-acetat.
 - 1 mM EDTA.
- Buffer de DNA 6X.
 - 60% Glicerol.
 - 60 mM EDTA.
- Bromur d'etidi 10 mg/ml.

Preparació.

- 1- Dissoldre l'agarosa amb TAE 1X al microones.
- 2- Afegir el bromur d'etidi (0,5-1µg/ml).
- 3- Montar l'aparell.
- 4- Afegir el buffer de DNA a les mostres (dilució 1:6).
- 5- Carregar les mostres i corre-les a 25-100 V.

Purificació de DNA plasmídic

Minipreps

Per realitzar les minipreps el dia anterior es pica una colònia i es deixa créixer a 37°C i amb agitació durant tota la nit en 4 ml d'LB i l'antibiòtic d'elecció. Les minipreps es van realitzar amb el kit Wizard®plus minipreps (Promega) seguint les indicacions del fabricant.

Maxipreps

Per realitzar les maxipreps es pica una colònia i es deixa incubar durant 8 hores a 37 °C i amb agitació en 4 ml d'LB i l'antibiòtic d'elecció. Un cop han passat les 8 hores els 4 ml d'LB es situen en un Erlenmeyer que conte 250 ml d'LB i l'antibiòtic d'elecció i es deixa créixer a 37 °C i amb agitació durant tota la nit. Les maxipreps es van realitzar amb el kit QIAfilter™ Plasmid Maxi kit (Qiagen) seguint les indicacions del fabricant.

Clonació de GADD153

Per a la clonació de GADD153 es van utilitzar els següents *primers* dissenyats a partir de la seqüència al GenBank S40706:

GADD153-*forward*: 5'-CAAGAAGGAAGCTTATCTTCATA-3'
GADD153-*reverse*: 5'-CAATCTCTAGATACAAGCTGAG-3'

El *primer forward* conté una diana de restricció per HindIII i el *reverse* una per XbaI. Aquest enzims no presenten dianes a l'interior de la seqüència de GADD153.

A partir del RNA de cèl·lules tractades amb DA 500 µM durant 24 hores es va obtenir el cDNA mitjançant una retrotranscripció en la que es va fer servir el *primer reverse*.

El cDNA es va utilitzar per realitzar una PCR amb una temperatura d'anellament de 56 °C. El resultat de la PCR es va analitzar mitjançant un gel d'agarosa al 1% i la visualització es va realitzar mitjançant bromur d'etidi. El fragment corresponent al tamany esperat (751 pb) es va purificar.

Per clonar el fragment purificat al interior del plàsmid pcDNA3.1 (+) (Invitrogen) es van tallar el fragment i el plasmidi amb els enzims de restricció XbaI i HindIII. Els productes de la digestió es van córrer en un gel d'agarosa i les bandes corresponents als tamany esperats es van purificar per realitzar la lligació.

Un cop realitzada la lligació es van transformar bacteris competents amb el plasmidi obtingut i es van creixer en plaques d'LB-agar amb l'antibiòtic ampicil·lina (50 µg/ml).

De les colònies obtingudes es van fer minipreps que es van tallar amb diferents combinacions d'enzims de restricció per comprovar que el plàsmid obtingut era el pcDNA 3.1 amb el gen de GADD153 inserit. Un cop comprovat que el plàsmid obtingut era el correcte es va fer una maxiprep a partir de la miniprep. La maxiprep també es va comprovar mitjançant la restricció enzimàtica de diferents combinacions d'enzims.

RT-MLPA (*Retrotranscriptase multiplex ligation-dependent probe amplification*)

Fonament.

L'RT-MLPA és una tècnica que permet la quantificació relativa de fins a 45 seqüències d'àcids nucleics en una sola reacció. Cada sonda de l'RT-MLPA consisteix en 2 oligonucleòtids, un dels quals presenta una regió no hibriditzant que té una longitud i una seqüència diferent per cada àcid nucleic, permetent la seva separació mitjançant una electroforesis capil·lar. Com les sondes estan marcades amb un marcador fluorescent (FAM), un cop separats els productes es calcula l'àrea de fluorescència que és emesa per cada producte, el tamany de la qual serà proporcional a la quantitat inicial de l'mRNA del gen d'interès.

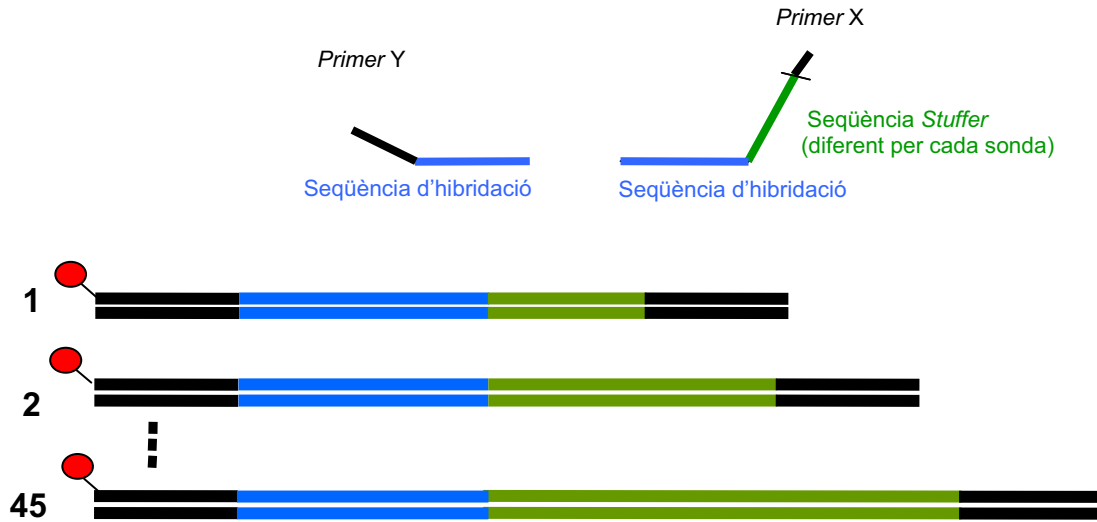
Material.

- Kit R011 Apoptosi (MRC-holland), per a la detecció simultània de 38 mRNA.

Protocol.

200 ng d'RNA total van ser retrotranscrits utilitzant *primers* específics pels gens d'interès. El cDNA obtingut va ser incubat durant 16 hores amb les sondes del kit a 60°C. Els oligonucleòtids van ser lligats afegint la Ligase-65 durant 15 minuts a 54 °C. Els productes de la lligació van ser amplificats per PCR (35 cicles, 30 segons a 95 °C, 30 segons a 60 °C i 1 minut a 72 °C). Els fragments amplificats, productes de la PCR, van ser separats per electroforesi capil·lar en un *48-capillary ABI-Prism 3730 Genetic*

Analyzer (Applied Biosystems/Hitachi, Foster City, CA). L'àrea de cadascun dels pics va ser analitzada utilitzant el programa *Genemapper analysis software* (Applied Biosystems). Els nivells de cadascun dels mRNAs van ser normalitzats respecte al gen α -glucuronidasa (GUS).



Esquema representatiu de les sondes utilitzades al RT-MLPA i dels productes de l'amplificació.

BIBLIOGRAFIA

A

Abeliovich H, Dunn WA Jr, Kim J, Klionsky DJ. Dissection of autophagosome biogenesis into distinct nucleation and expansion steps. *J Cell Biol.* 2000 Nov 27;151(5):1025-34.

Abeliovich H, Zhang C, Dunn WA Jr, Shokat KM, Klionsky DJ. Chemical genetic analysis of Apg1 reveals a non-kinase role in the induction of autophagy. *Mol Biol Cell.* 2003 Feb;14(2):477-90.

Acehan D, Jiang X, Morgan DG, Heuser JE, Wang X, Akey CW. Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Mol Cell.* 2002 Feb;9(2):423-32.

Adams JD Jr, Klaidman LK, Chang ML, Yang J. Brain oxidative stress--analytical chemistry and thermodynamics of glutathione and NADPH. *Curr Top Med Chem.* 2001 Dec;1(6):473-82.

Amara SG, Ariza JL. Neurotransmitter transporters: three distinct gene families. *Curr Opin Neurobiol.* 1993 Jun;3(3):337-44.

Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med.* 1997 Aug;3(8):917-21.

Anglade P, Vyas S, Javoy-Agid F, Herrero MT, Michel PP, Marquez J, Mouatt-Prigent A, Ruberg M, Hirsch EC, Agid Y. Apoptosis and autophagy in nigral neurons of patients with Parkinson's disease. *Histol Histopathol.* 1997 Jan;12(1):25-31.

Aroca P, Solano F, Garcia-Borron JC, Lozano JA. A new spectrophotometric assay for dopachrome tautomerase. *J Biochem Biophys Methods.* 1990 Jun;21(1):35-46.

Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science.* 1998 Aug 28;281(5381):1305-8.

B

Banin S, Moyal L, Shieh S, Taya Y, Anderson CW, Chessa L, Smorodinsky NI, Prives C, Reiss Y, Shiloh Y, Ziv Y. Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. *Science.* 1998 Sep 11;281(5383):1674-7.

Bardos JI, Ashcroft M. Negative and positive regulation of HIF-1: a complex network. *Biochim Biophys Acta.* 2005 Jul 25;1755(2):107-20.

Baptista MJ, O'Farrell C, Daya S, Ahmad R, Miller DW, Hardy J, Farrer MJ, Cookson MR. Co-ordinate transcriptional regulation of dopamine synthesis genes by alpha-synuclein in human neuroblastoma cell lines. *J Neurochem.* 2003 May;85(4):957-68.

Barron JT, Sasse MF, Nair A. Effect of angiotensin II on energetics, glucose metabolism and cytosolic NADH/NAD and NADPH/NADP redox in vascular smooth muscle. *Mol Cell Biochem.* 2004 Jul;262(1-2):91-9.

Barzilai A, Melamed E, Shirvan A. Is there a rationale for neuroprotection against dopamine toxicity in Parkinson's disease?. *Cell Mol Neurobiol.* 2001 Jun;21(3):215-35.

Ben-Shachar D, Zuk R, Glinka Y. Dopamine neurotoxicity: inhibition of mitochondrial respiration. *J Neurochem*. 1995 Feb;64(2):718-23.

Ben-Shachar D, Zuk R, Gazawi H, Ljubuncic P. Dopamine toxicity involves mitochondrial complex I inhibition: implications to dopamine-related neuropsychiatric disorders. *Biochem Pharmacol*. 2004 May 15;67(10):1965-74.

Berg D, Youdim MB, Riederer P. Redox imbalance. *Cell Tissue Res*. 2004 Oct;318(1):201-13. Epub 2004 Sep 10.

Berridge MV, Tan AS. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch Biochem Biophys*. 1993 Jun;303(2):474-82.

Berry MN. The function of energy-dependent redox reactions in cell metabolism. *FEBS Lett*. 1980 Aug 25;117 Suppl:K106-20.

Bertolotti A, Wang X, Novoa I, Jungreis R, Schlessinger K, Cho JH, West AB, Ron D. Increased sensitivity to dextran sodium sulfate colitis in IRE1 β -deficient mice. *J Clin Invest*. 2001 Mar;107(5):585-93.

Betarbet R, Sherer TB, MacKenzie G, Garcia-Osuna M, Panov AV, Greenamyre JT. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat Neurosci*. 2000 Dec;3(12):1301-6.

Betarbet R, Sherer TB, Di Monte DA, Greenamyre JT. Mechanistic approaches to Parkinson's disease pathogenesis. *Brain Pathol*. 2002 Oct;12(4):499-510.

Betarbet R, Sherer TB, Greenamyre JT. Ubiquitin-proteasome system and Parkinson's diseases. *Exp Neurol*. 2005 Feb;191 Suppl 1:S17-27.

Bertolotti A, Zhang Y, Hendershot LM, Harding HP, Ron D. Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol*. 2000 Jun;2(6):326-32.

Bharath S, Hsu M, Kaur D, Rajagopalan S, Andersen JK. Glutathione, iron and Parkinson's disease. *Biochem Pharmacol*. 2002 Sep;64(5-6):1037-48.

Bjorklund A, Dunnett SB. Dopamine neuron systems in the brain: an update. *Trends Neurosci*. 2007 May;30(5):194-202. Epub 2007 Apr 3.

Bjorkoy G, Lamark T, Brech A, Outzen H, Perander M, Overvatn A, Stenmark H, Johansen T. p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *J Cell Biol*. 2005 Nov 21;171(4):603-14. Epub 2005 Nov 14.

Blommaert EF, Luiken JJ, Blommaert PJ, van Woerkom GM, Meijer AJ. Phosphorylation of ribosomal protein S6 is inhibitory for autophagy in isolated rat hepatocytes. *J Biol Chem*. 1995 Feb 3;270(5):2320-6.

Blommaert EF, Krause U, Schellens JP, Vreeling-Sindelarova H, Meijer AJ. The phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors wortmannin and LY294002 inhibit autophagy in isolated rat hepatocytes. *Eur J Biochem*. 1997 Jan 15;243(1-2):240-6.

Bohensky J, Shapiro IM, Leshinsky S, Terkhorn SP, Adams CS, Srinivas V. HIF-1 regulation of chondrocyte apoptosis: induction of the autophagic pathway. *Autophagy*. 2007 May-Jun;3(3):207-14. Epub 2007 May 14.

Boya P, Gonzalez-Polo RA, Casares N, Perfettini JL, Dessen P, Larochette N, Metivier D, Meley D, Souquere S, Yoshimori T, Pierron G, Codogno P, Kroemer G. Inhibition of macroautophagy triggers apoptosis. *Mol Cell Biol*. 2005 Feb;25(3):1025-40.

Bradford HF. *Fundamentos de Neuroquímica* 1ª ed. Barcelona 1988. Labor.

Breckenridge DG, Xue D. Regulation of mitochondrial membrane permeabilization by BCL-2 family proteins and caspases. *Curr Opin Cell Biol*. 2004 Dec;16(6):647-52.

Broker LE, Kruyt FA, Giaccone G. Cell death independent of caspases: a review. *Clin Cancer Res*. 2005 May 1;11(9):3155-62.

Brugarolas J, Lei K, Hurley RL, Manning BD, Reiling JH, Hafen E, Witters LA, Ellisen LW, Kaelin WG Jr. Regulation of mTOR function in response to hypoxia by REDD1 and the TSC1/TSC2 tumor suppressor complex. *Genes Dev*. 2004 Dec 1;18(23):2893-904. Epub 2004 Nov 15.

Buck M, Poli V, van der Geer P, Chojkier M, Hunter T. Phosphorylation of rat serine 105 or mouse threonine 217 in C/EBP beta is required for hepatocyte proliferation induced by TGF alpha. *Mol Cell*. 1999 Dec;4(6):1087-92.

Burke RE, Kholodilov NG. Programmed cell death: does it play a role in Parkinson's disease? *Ann Neurol*. 1998 Sep;44(3 Suppl 1):S126-33.

Bursch W, Ellinger A, Kienzl H, Torok L, Pandey S, Sikorska M, Walker R, Hermann RS. Active cell death induced by the anti-estrogens tamoxifen and ICI 164 384 in human mammary carcinoma cells (MCF-7) in culture: the role of autophagy. *Carcinogenesis*. 1996 Aug;17(8):1595-607.

Buschhorn BA, Kostova Z, Medicherla B, Wolf DH. A genome-wide screen identifies Yos9p as essential for ER-associated degradation of glycoproteins. *FEBS Lett*. 2004 Nov 19;577(3):422-6.

C

Calfon M, Zeng H, Urano F, Till JH, Hubbard SR, Harding HP, Clark SG, Ron D. IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature*. 2002 Jan 3;415(6867):92-6. Erratum in: *Nature* 2002 Nov 14;420(6912):202.

Campion D, Martin C, Heilig R, Charbonnier F, Moreau V, Flaman JM, Petit JL, Hannequin D, Brice A, Frebourg T. The NACP/synuclein gene: chromosomal assignment and screening for alterations in Alzheimer disease. *Genomics*. 1995 Mar 20;26(2):254-7

Canet-Aviles RM, Wilson MA, Miller DW, Ahmad R, McLendon C, Bandyopadhyay S, Baptista MJ, Ringe D, Petsko GA, Cookson MR. The Parkinson's disease protein DJ-1 is neuroprotective due to cysteine-sulfinic acid-driven mitochondrial localization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Jun 15;101(24):9103-8. Epub 2004 Jun 4.

Bibliografia

Cao Z, Umek RM, McKnight SL. Regulated expression of three C/EBP isoforms during adipose conversion of 3T3-L1 cells. *Genes Dev.* 1991 Sep;5(9):1538-52.

Cappai R, Leck SL, Tew DJ, Williamson NA, Smith DP, Galatis D, Sharples RA, Curtain CC, Ali FE, Cherny RA, Culvenor JG, Bottomley SP, Masters CL, Barnham KJ, Hill AF. Dopamine promotes alpha-synuclein aggregation into SDS-resistant soluble oligomers via a distinct folding pathway. *FASEB J.* 2005 Aug;19(10):1377-9. Epub 2005 Jun 9.

Cardenas ME, Cutler NS, Lorenz MC, Di Como CJ, Heitman J. The TOR signaling cascade regulates gene expression in response to nutrients. *Genes Dev.* 1999 Dec 15;13(24):3271-9.

Carreras MC, Franco MC, Peralta JG, Poderoso JJ. Nitric oxide, complex I, and the modulation of mitochondrial reactive species in biology and disease. *Mol Aspects Med.* 2004 Feb-Apr;25(1-2):125-39.

Cassarino DS, Fall CP, Swerdlow RH, Smith TS, Halvorsen EM, Miller SW, Parks JP, Parker WD Jr, Bennett JP Jr. Elevated reactive oxygen species and antioxidant enzyme activities in animal and cellular models of Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta.* 1997 Nov 28;1362(1):77-86.

Castro AF, Rebhun JF, Clark GJ, Quilliam LA. Rheb binds tuberous sclerosis complex 2 (TSC2) and promotes S6 kinase activation in a rapamycin- and farnesylation-dependent manner. *J Biol Chem.* 2003 Aug 29;278(35):32493-6. Epub 2003 Jul 3.

Clayton DF, George JM. Synucleins in synaptic plasticity and neurodegenerative disorders. *J Neurosci Res.* 1999 Oct 1;58(1):120-9.

Chen K, Albano A, Ho A, Keaney JF Jr. Activation of p53 by oxidative stress involves platelet-derived growth factor-beta receptor-mediated ataxia telangiectasia mutated (ATM) kinase activation. *J Biol Chem.* 2003 Oct 10;278(41):39527-33. Epub 2003 Jul 30.

Chen Q, Ding Q, Thorpe J, Dohmen RJ, Keller JN. RNA interference toward UMP1 induces proteasome inhibition in *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for protein oxidation and autophagic cell death. *Free Radic Biol Med.* 2005 Jan 15;38(2):226-34.

Chen X, de Silva HA, Pettenati MJ, Rao PN, St George-Hyslop P, Roses AD, Xia Y, Horsburgh K, Ueda K, Saitoh T. The human NACP/alpha-synuclein gene: chromosome assignment to 4q21.3-q22 and TaqI RFLP analysis. *Genomics.* 1995 Mar 20;26(2):425-7.

Chiang GG, Abraham RT. Phosphorylation of mammalian target of rapamycin (mTOR) at Ser-2448 is mediated by p70S6 kinase. *J Biol Chem.* 2005 Jul 8;280(27):25485-90. Epub 2005 May 16.

Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Yu GL, Lyons RH, Garg M, Duan DR, Xing L, Gentz R, Ni J, Dixit VM. Signal transduction by DR3, a death domain-containing receptor related to TNFR-1 and CD95. *Science.* 1996 Nov 8;274(5289):990-2.

Chipuk JE, Green DR. Dissecting p53-dependent apoptosis. *Cell Death Differ.* 2006 Jun;13(6):994-1002.

Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987 Apr;162(1):156-9.

Chowdhury M, Fillenz M. Presynaptic adenosine A₂ and N-methyl-D-aspartate receptors regulate dopamine synthesis in rat striatal synaptosomes. *J Neurochem* 1991;56:1783-88.

Conn KJ, Gao WW, Ullman MD, McKeon-O'Malley C, Eisenhauer PB, Fine RE, Wells JM. Specific up-regulation of GADD153/CHOP in 1-methyl-4-phenyl-pyridinium-treated SH-SY5Y cells. *J Neurosci Res.* 2002 Jun 15;68(6):755-60.

Conway KA, Harper JD, Lansbury PT. Accelerated in vitro fibril formation by a mutant alpha-synuclein linked to early-onset Parkinson disease. *Nat Med.* 1998 Nov;4(11):1318-20.

Conway KA, Lee SJ, Rochet JC, Ding TT, Williamson RE, Lansbury PT Jr. Acceleration of oligomerization, not fibrillization, is a shared property of both alpha-synuclein mutations linked to early-onset Parkinson's disease: implications for pathogenesis and therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Jan 18;97(2):571-6.

Cragg SJ, Rice ME. DANCING past the DAT at a DA synapse. *Trends Neurosci.* 2004 May;27(5):270-7.

Crichton D, Wilkinson S, O'Prey J, Syed N, Smith P, Harrison PR, Gasco M, Garrone O, Crook T, Ryan KM. DRAM, a p53-induced modulator of autophagy, is critical for apoptosis. *Cell.* 2006 Jul 14;126(1):121-34.

Crowther RA, Jakes R, Spillantini MG, Goedert M. Synthetic filaments assembled from C-terminally truncated alpha-synuclein. *FEBS Lett.* 1998 Oct 9;436(3):309-12.

Cuervo AM, Stefanis L, Fredenburg R, Lansbury PT, Sulzer D. Impaired degradation of mutant alpha-synuclein by chaperone-mediated autophagy. *Science.* 2004 Aug 27;305(5688):1292-5.

D

Daido S, Kanzawa T, Yamamoto A, Takeuchi H, Kondo Y, Kondo S. Pivotal role of the cell death factor BNIP3 in ceramide-induced autophagic cell death in malignant glioma cells. *Cancer Res.* 2004 Jun 15;64(12):4286-93.

Dalfo E, Barrachina M, Rosa JL, Ambrosio S, Ferrer I. Abnormal alpha-synuclein interactions with rab3a and rabphilin in diffuse Lewy body disease. *Neurobiol Dis.* 2004 Jun;16(1):92-7.

Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell death: critical control points. *Cell.* 2004 Jan 23;116(2):205-19.

Davidson WS, Jonas A, Clayton DF, George JM. Stabilization of alpha-synuclein secondary structure upon binding to synthetic membranes. *J Biol Chem.* 1998 Apr 17;273(16):9443-9.

Davis GC, Williams AC, Markey SP, Ebert MH, Caine ED, Reichert CM, Kopin IJ. Chronic Parkinsonism secondary to intravenous injection of meperidine analogues. *Psychiatry Res.* 1979 Dec;1(3):249-54.

Descombes P, Chojkier M, Lichtsteiner S, Falvey E, Schibler U. LAP, a novel member of the C/EBP gene family, encodes a liver-enriched transcriptional activator protein. *Genes Dev.* 1990 Sep;4(9):1541-51.

Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC. X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature.* 1997 Jul 17;388(6639):300-4.

Ding WX, Ni HM, Gao W, Yoshimori T, Stolz DB, Ron D, Yin XM. Linking of autophagy to ubiquitin-proteasome system is important for the regulation of endoplasmic reticulum stress and cell viability. *Am J Pathol.* 2007 Aug;171(2):513-24. Epub 2007 Jul 9.

Double KL, Zecca L, Costi P, Mauer M, Griesinger C, Ito S, Ben-Shachar D, Bringmann G, Fariello RG, Riederer P, Gerlach M. Structural characteristics of human substantia nigra neuromelanin and synthetic dopamine melanins. *J Neurochem.* 2000 Dec;75(6):2583-9.

Double KL, Ben-Shachar D, Youdim MB, Zecca L, Riederer P, Gerlach M. Influence of neuromelanin on oxidative pathways within the human substantia nigra. *Neurotoxicol Teratol.* 2002 Sep-Oct;24(5):621-8.

Douglas MR, Lewthwaite AJ, Nicholl DJ. Genetics of Parkinson's disease and parkinsonism. *Expert Rev Neurother.* 2007 Jun;7(6):657-66.

Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell.* 2000 Jul 7;102(1):33-42.

Dunn WA. Studies on the mechanisms of autophagy: formation of the autophagic vacuole. *J Cell Biol.* 1990 Jun;110(6):1923-33.

Duvoisin RC, Golbe LI. Toward a definition of Parkinson's disease. *Neurology.* 1989 May;39(5):746.

E

Eisenhofer G. The role of neuronal and extraneuronal plasma membrane transporters in the inactivation of peripheral catecholamines. *Pharmacol Ther.* 2001 Jul;91(1):35-62.

Eisenhofer G, Kopin IJ, Goldstein DS. Catecholamine metabolism: a contemporary view with implications for physiology and medicine. *Pharmacol Rev.* 2004 Sep;56(3):331-49

Emdadul Haque M, Asanuma M, Higashi Y, Miyazaki I, Tanaka K, Ogawa N. Apoptosis-inducing neurotoxicity of dopamine and its metabolites via reactive quinone generation in neuroblastoma cells. *Biochim Biophys Acta.* 2003 Jan 2;1619(1):39-52.

Engelender S, Kaminsky Z, Guo X, Sharp AH, Amaravi RK, Kleiderlein JJ, Margolis RL, Troncoso JC, Lanahan AA, Worley PF, Dawson VL, Dawson TM, Ross CA. Synphilin-1 associates with alpha-synuclein and promotes the formation of cytosolic inclusions. *Nat Genet.* 1999 May;22(1):110-4.

F

Fawcett TW, Eastman HB, Martindale JL, Holbrook NJ. Physical and functional association between GADD153 and CCAAT/enhancer-binding protein beta during cellular stress. *J Biol Chem*. 1996 Jun 14;271(24):14285-9.

Fedorow H, Tribl F, Halliday G, Gerlach M, Riederer P, Double KL. Neuromelanin in human dopamine neurons: comparison with peripheral melanins and relevance to Parkinson's disease. *Prog Neurobiol*. 2005 Feb;75(2):109-24.

Feng Z, Zhang H, Levine AJ, Jin S. The coordinate regulation of the p53 and mTOR pathways in cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Jun 7;102(23):8204-9. Epub 2005 May 31.

Feng Z, Hu W, de Stanchina E, Teresky AK, Jin S, Lowe S, Levine AJ. The regulation of AMPK beta1, TSC2, and PTEN expression by p53: stress, cell and tissue specificity, and the role of these gene products in modulating the IGF-1-AKT-mTOR pathways. *Cancer Res*. 2007 Apr 1;67(7):3043-53.

Filloux F, Townsend JJ. Pre- and postsynaptic neurotoxic effects of dopamine demonstrated by intrastriatal injection. *Exp Neurol*. 1993 Jan;119(1):79-88.

Fingar DC, Salama S, Tsou C, Harlow E, Blenis J. Mammalian cell size is controlled by mTOR and its downstream targets S6K1 and 4EBP1/eIF4E. *Genes Dev*. 2002 Jun 15;16(12):1472-87.

Fischer U, Janicke RU, Schulze-Osthoff K. Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Differ*. 2003 Jan;10(1):76-100.

Fornace AJ Jr, Alamo I Jr, Hollander MC. DNA damage-inducible transcripts in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988 Dec;85(23):8800-4.

Fowler CJ, Tipton KF. Concentration dependence of the oxidation of tyramine by the two forms of rat liver mitochondrial monoamine oxidase. *Biochem Pharmacol*. 1981 Dec 15;30(24):3329-32.

Fowler CJ, Tipton KF. Deamination of 5-hydroxytryptamine by both forms of monoamine oxidase in the rat brain. *J Neurochem*. 1982 Mar;38(3):733-6.

Friedman AD. GADD153/CHOP, a DNA damage-inducible protein, reduced CAAT/enhancer binding protein activities and increased apoptosis in 32D c13 myeloid cells. *Cancer Res*. 1996 Jul 15;56(14):3250-6.

Fujisawa H., Okuno S. Regulation of the activity of tyrosine hydroxylase in the central nervous system. *Adv Enzym Reg* 1989; 28:93-110.

Fujita E, Kouroku Y, Isoai A, Kumagai H, Misutani A, Matsuda C, Hayashi YK, Momoi T. Two endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) systems for the novel variant of the mutant dysferlin: ubiquitin/proteasome ERAD(I) and autophagy/lysosome ERAD(II). *Hum Mol Genet*. 2007 Mar 15;16(6):618-29. Epub 2007 Mar 1.

Fujiwara H, Hasegawa M, Dohmae N, Kawashima A, Masliah E, Goldberg MS, Shen J, Takio K, Iwatsubo T. alpha-Synuclein is phosphorylated in synucleinopathy lesions. *Nat Cell Biol*. 2002 Feb;4(2):160-4.

G

Gao X, Zhang Y, Arrazola P, Hino O, Kobayashi T, Yeung RS, Ru B, Pan D. Tsc tumour suppressor proteins antagonize amino-acid-TOR signalling. *Nat Cell Biol.* 2002 Sep;4(9):699-704.

Ghribi O, Herman MM, Pramoonjago P, Savory J. MPP+ induces the endoplasmic reticulum stress response in rabbit brain involving activation of the ATF-6 and NF-kappaB signaling pathways. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2003 Nov;62(11):1144-53.

Giasson BI, Murray IV, Trojanowski JQ, Lee VM. A hydrophobic stretch of 12 amino acid residues in the middle of alpha-synuclein is essential for filament assembly. *J Biol Chem.* 2001 Jan 26;276(4):2380-6. Epub 2000 Nov 1.

Gómez N, Unzeta M, Tipton KF, Anderson MC, O'Carroll AM. Determination of monoamine oxidase concentrations in rat liver by inhibitor binding. *Biochem Pharmacol.* 1986 Dec 15;35(24):4467-72.

Gómez-Santos C, Ferrer I, Santidrian AF, Barrachina M, Gil J, Ambrosio S. Dopamine induces autophagic cell death and alpha-synuclein increase in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *J Neurosci Res.* 2003 Aug 1;73(3):341-50.

Gómez-Santos C, Francisco R, Gimenez-Xavier P, Ambrosio S. Dopamine induces TNFalpha and TNF-R1 expression in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Neuroreport.* 2007 Oct 29;18(16):1725-8.

Graumann R, Paris I, Martínez-Alvarado P, Rumanque P, Perez-Pastene C, Cardenas SP, Marin P, Diaz-Grez F, Caviedes R, Caviedes P, Segura-Aguilar J. Oxidation of dopamine to aminochrome as a mechanism for neurodegeneration of dopaminergic systems in Parkinson's disease. Possible neuroprotective role of DT-diaphorase. *Pol J Pharmacol.* 2002 Nov-Dec;54(6):573-9.

Greenmayre JY, Sherer TB, Betarbet R, Panov AV. Complex I and Parkinson's disease. *IUBMB Life.* 2001 Sep-Nov;52(3-5):135-41

Gu Y, Wang C, Cohen A. Effect of IGF-1 on the balance between autophagy of dysfunctional mitochondria and apoptosis. *FEBS Lett.* 2004 Nov 19;577(3):357-60

H

Harding HP, Novoa I, Zhang Y, Zeng H, Wek R, Schapira M, Ron D. Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol Cell.* 2000 Nov;6(5):1099-108.

Harding HP, Zhang Y, Ron D. Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature.* 1999 Jan 21;397(6716):271-4. Erratum in: *Nature* 1999 Mar 4;398(6722):90.

Harding TM, Morano KA, Scott SV, Klionsky DJ. Isolation and characterization of yeast mutants in the cytoplasm to vacuole protein targeting pathway. *J Cell Biol.* 1995 Nov;131(3):591-602.

Hardy J, Cai H, Cookson MR, Gwinn-Hardy K, Singleton A. Genetics of Parkinson's disease and parkinsonism. *Ann Neurol.* 2006 Oct;60(4):389-98.

Hartmann A, Hunot S, Michel PP, Muriel MP, Vyas S, Faucheux BA, Mouatt-Prigent A, Turmel H, Srinivasan A, Ruberg M, Evan GI, Agid Y, Hirsch EC. Caspase-3: A vulnerability factor and final effector in apoptotic death of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Mar 14;97(6):2875-80.

Hashimoto M, Hsu LJ, Sisk A, Xia Y, Takeda A, Sundsmo M, Masliah E. Human recombinant NACP/alpha-synuclein is aggregated and fibrillated in vitro: relevance for Lewy body disease. *Brain Res*. 1998 Jul 20;799(2):301-6.

Hashimoto M, Hsu LJ, Xia Y, Takeda A, Sisk A, Sundsmo M, Masliah E. Oxidative stress induces amyloid-like aggregate formation of NACP/alpha-synuclein in vitro. *Neuroreport*. 1999 Mar 17;10(4):717-21.

Hay N. The AKT-mTOR tango and its relevance to cancer. *Cancer Cell*. 2005 Sep;8(3):179-83.

Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature*. 2000 Oct 12;407(6805):770-6.

Hetey L, Kudrin V, Shemanov A, Rayevsky K, Delssner V. Presynaptic dopamine and serotonin receptors modulating tyrosine hydroxylase activity in synaptosomes of nucleus accumbens of rats. *Eur J Pharmacol* 1985; 43:327-30.

Herman PK, Emr SD. Characterization of VPS34, a gene required for vacuolar protein sorting and vacuole segregation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*. 1990 Dec;10(12):6742-54.

Hochstrasser M. Ubiquitin, proteasomes, and the regulation of intracellular protein degradation. *Curr Opin Cell Biol*. 1995 Apr;7(2):215-23.

Hoehn MM, Yahr MD. Parkinsonism: onset, progression and mortality. *Neurology*. 1967 May;17(5):427-42.

Hofmann K, Bucher P, Tschopp J. The CARD domain: a new apoptotic signalling motif. *Trends Biochem Sci*. 1997 May;22(5):155-6.

Holtz WA, O'Malley KL. Parkinsonian mimetics induce aspects of unfolded protein response in death of dopaminergic neurons. *J Biol Chem*. 2003 May 23;278(21):19367-77.

Holz MK, Blenis J. Identification of S6 kinase 1 as a novel mammalian target of rapamycin (mTOR)-phosphorylating kinase. *J Biol Chem*. 2005 Jul 15;280(28):26089-93. Epub 2005 May 19.

Horn HF, Vousden KH. Coping with stress: multiple ways to activate p53. *Oncogene*. 2007 Feb 26;26(9):1306-16.

Hosokawa N, Wada I, Hasegawa K, Yorihozi T, Tremblay LO, Herscovics A, Nagata K. A novel ER alpha-mannosidase-like protein accelerates ER-associated degradation. *EMBO Rep*. 2001 May;2(5):415-22.

Høyer-Hansen M, Bastholm L, Szyniarowski P, Campanella M, Szabadkai G, Farkas T, Bianchi K, Fehrenbacher N, Elling F, Rizzuto R, Mathiasen IS, Jäättelä M. Control of macroautophagy by calcium, calmodulin-dependent kinase kinase-beta, and BCL-2. *Mol Cell*. 2007 Jan 26;25(2):193-205.

Hoyt KR, Reynolds IJ, Hastings TG. Mechanisms of dopamine-induced cell death in cultured rat forebrain neurons: interactions with and differences from glutamate-induced cell death. *Exp Neurol*. 1997 Feb;143(2):269-81.

Hsu LJ, Sagara Y, Arroyo A, Rockenstein E, Sisk A, Mallory M, Wong J, Takenouchi T, Hashimoto M, Masliah E alpha-synuclein promotes mitochondrial deficit and oxidative stress. *Am J Pathol*. 2000 Aug;157(2):401-10.

Hutchins MU, Klionsky DJ. Vacuolar localization of oligomeric alpha-mannosidase requires the cytoplasm to vacuole targeting and autophagy pathway components in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. 2001 Jun 8;276(23):20491-8. Epub 2001 Mar 22.

I

Ikeda J, Kaneda S, Kuwabara K, Ogawa S, Kobayashi T, Matsumoto M, Yura T, Yanagi H. Cloning and expression of cDNA encoding the human 150 kDa oxygen-regulated protein, ORP150. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997 Jan 3;230(1):94-9.

Ikemoto K, Nagatsu I, Ito S, King RA, Nishimura A, Nagatsu T. Does tyrosinase exist in neuromelanin-pigmented neurons in the human substantia nigra? *Neurosci Lett*. 1998 Sep 11;253(3):198-200.

Imai Y, Soda M, Takahashi R. Parkin suppresses unfolded protein stress-induced cell death through its E3 ubiquitin-protein ligase activity. *J Biol Chem*. 2000 Nov 17;275(46):35661-4.

Inbal B, Bialik S, Sabanay I, Shani G, Kimchi A. DAP kinase and DRP-1 mediate membrane blebbing and the formation of autophagic vesicles during programmed cell death. *J Cell Biol*. 2002 Apr 29;157(3):455-68. Epub 2002 Apr 29.

Inoki K, Zhu T, Guan KL. TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell*. 2003 Nov 26;115(5):577-90.

Irmeler M, Thome M, Hahne M, Schneider P, Hofmann K, Steiner V, Bodmer JL, Schroter M, Burns K, Mattmann C, Rimoldi D, French LE, Tschoep J. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature*. 1997 Jul 10;388(6638):190-5.

Ishii T, Sakurai T, Usami H, Uchida K. Oxidative modification of proteasome: identification of an oxidation-sensitive subunit in 26 S proteasome. *Biochemistry*. 2005 Oct 25;44(42):13893-901.

Itano Y, Nomura Y. 1-methyl-4-phenyl-pyridinium ion (MPP+) causes DNA fragmentation and increases the BCL-2 expression in human neuroblastoma, SH-SY5Y cells, through different mechanisms. *Brain Res*. 1995 Dec 18;704(2):240-45.

Ito S, Koshikawa N, Mochizuki S, Takenaga K. 3-Methyladenine suppresses cell migration and invasion of HT1080 fibrosarcoma cells through inhibiting phosphoinositide 3-kinases independently of autophagy inhibition. *Int J Oncol*. 2007 Aug;31(2):261-8.

Iwata A, Riley BE, Johnston JA, Kopito RR. HDAC6 and microtubules are required for autophagic degradation of aggregated huntingtin. *J Biol Chem*. 2005 Dec 2;280(48):40282-92. Epub 2005 Sep 28.

Iwai A, Masliah E, Yoshimoto M, Ge N, Flanagan L, de Silva HA, Kittel A, Saitoh T. The precursor protein of non-A beta component of Alzheimer's disease amyloid is a presynaptic protein of the central nervous system. *Neuron*. 1995 Feb;14(2):467-75.

J

Jakes R, Spillantini MG, Goedert M. Identification of two distinct synucleins from human brain. *FEBS Lett*. 1994 May 23;345(1):27-32.

Jarosch E, Lenk U, Sommer T. Endoplasmic reticulum-associated protein degradation. *Int Rev Cytol*. 2003;223:39-81.

Jenco JM, Rawlingson A, Daniels B, Morris AJ. Regulation of phospholipase D2: selective inhibition of mammalian phospholipase D isoenzymes by alpha- and beta-synucleins. *Biochemistry*. 1998 Apr 7;37(14):4901-9.

Jenner P. Oxidative mechanisms in nigral cell death in Parkinson's disease. *Mov Disord*. 1998;13 Suppl 1:24-34.

Jenner P. Oxidative stress in Parkinson's disease. *Ann Neurol*. 2003;53 Suppl 3:S26-36; discussion S36-8.

Jensen PH, Hager H, Nielsen MS, Hojrup P, Gliemann J, Jakes R. alpha-synuclein binds to Tau and stimulates the protein kinase A-catalyzed tau phosphorylation of serine residues 262 and 356. *J Biol Chem*. 1999 Sep 3;274(36):25481-9.

Jiang H, Jiang Q, Feng J. arkin increases dopamine uptake by enhancing the cell surface expression of dopamine transporter. *Biol Chem*. 2004 Dec 24;279(52):54380-6. Epub 2004 Oct 18.

Johnston, J. P. Some observations upon a new inhibitor of monoamine oxidase in brain tissue, *Biochem. Pharmacol*. 1968; 17, 1285–1297.

Jones RG, Plas DR, Kubek S, Buzzai M, Mu J, Xu Y, Birnbaum MJ, Thompson CB. AMP-activated protein kinase induces a p53-dependent metabolic checkpoint. *Mol Cell*. 2005 Apr 29;18(3):283-93.

Junn E, Mouradian MM. Apoptotic signaling in dopamine-induced cell death: the role of oxidative stress, p38 mitogen-activated protein kinase, cytochrome c and caspases. *J Neurochem*. 2001 Jul;78(2):374-83.

K

Kabeya Y, Mizushima N, Yamamoto A, Oshitani-Okamoto S, Ohsumi Y, Yoshimori T. LC3, GABARAP and GATE16 localize to autophagosomal membrane depending on form-II formation. *J Cell Sci*. 2004 Jun 1;117(Pt 13):2805-12.

Kallio PJ, Wilson WJ, O'Brien S, Makino Y, Poellinger L. Regulation of the hypoxia-inducible transcription factor 1alpha by the ubiquitin-proteasome pathway. *J Biol Chem*. 1999 Mar 5;274(10):6519-25.

Kamada Y, Funakoshi T, Shintani T, Nagano K, Ohsumi M, Ohsumi Y. Tor-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex. *J Cell Biol.* 2000 Sep 18;150(6):1507-13.

Kamimoto T, Shoji S, Hidvegi T, Mizushima N, Umebayashi K, Perlmutter DH, Yoshimori T. Intracellular inclusions containing mutant alpha1-antitrypsin Z are propagated in the absence of autophagic activity. *J Biol Chem.* 2006 Feb 17;281(7):4467-76. Epub 2005 Dec 19.

Kaneko M, Nomura Y. ER signaling in unfolded protein response. *Life Sci.* 2003 Dec 5;74(2-3):199-205.

Kanthasamy A, Anantharam V, Ali SF, Kanthasamy AG. Methamphetamine induces autophagy and apoptosis in a mesencephalic dopaminergic neuronal culture model: role of cathepsin-D in methamphetamine-induced apoptotic cell death. *Ann N Y Acad Sci.* 2006 Aug;1074:234-44.

Kanzawa T, Kondo Y, Ito H, Kondo S, Germano I. Induction of autophagic cell death in malignant glioma cells by arsenic trioxide. *Cancer Res.* 2003 May 1;63(9):2103-8.

Kanzawa T, Zhang L, Xiao L, Germano IM, Kondo Y, Kondo S. Arsenic trioxide induces autophagic cell death in malignant glioma cells by upregulation of mitochondrial cell death protein BNIP3. *Oncogene.* 2005 Feb 3;24(6):980-91.

Keller JN, Huang FF, Dimayuga ER, Maragos WF. Dopamine induces proteasome inhibition in neural PC12 cell line. *Free Radic Biol Med.* 2000 Nov 15;29(10):1037-42.

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 1972 Aug;26(4):239-57.

Khalfan WA, Klionsky DJ. Molecular machinery required for autophagy and the cytoplasm to vacuole targeting (Cvt) pathway in *S. cerevisiae*. *Curr Opin Cell Biol.* 2002 Aug;14(4):468-75.

Kiffin R, Bandyopadhyay U, Cuervo AM. Oxidative stress and autophagy. *Antioxid Redox Signal.* 2006 Jan-Feb;8(1-2):152-62.

Kihara A, Kabeya Y, Ohsumi Y, Yoshimori T. Beclin-phosphatidylinositol 3-kinase complex functions at the trans-Golgi network. *EMBO Rep.* 2001 Apr;2(4):330-5.

Kihara A, Noda T, Ishihara N, Ohsumi Y. Two distinct Vps34 phosphatidylinositol 3-kinase complexes function in autophagy and carboxypeptidase Y sorting in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol.* 2001 Feb 5;152(3):519-30.

Kim H, Rafiuddin-Shah M, Tu HC, Jeffers JR, Zambetti GP, Hsieh JJ, Cheng EH. Hierarchical regulation of mitochondrion-dependent apoptosis by BCL-2 subfamilies. *Nat Cell Biol.* 2006 Dec;8(12):1348-58. Epub 2006 Nov 19.

Kim J, Dalton VM, Eggerton KP, Scott SV, Klionsky DJ. Apg7p/Cvt2p is required for the cytoplasm-to-vacuole targeting, macroautophagy, and peroxisome degradation pathways. *Mol Biol Cell.* 1999 May;10(5):1337-51.

Kim J, Kamada Y, Stromhaug PE, Guan J, Hefner-Gravink A, Baba M, Scott SV, Ohsumi Y, Dunn WA Jr, Klionsky DJ. Cvt9/Gsa9 functions in sequestering selective cytosolic cargo destined for the vacuole. *J Cell Biol.* 2001 Apr 16;153(2):381-96.

- Kirisako T, Baba M, Ishihara N, Miyazawa K, Ohsumi M, Yoshimori T, Noda T, Ohsumi Y. Formation process of autophagosome is traced with Apg8/Aut7p in yeast. *J Cell Biol.* 1999 Oct 18;147(2):435-46.
- Kirisako T, Ichimura Y, Okada H, Kabeya Y, Mizushima N, Yoshimori T, Ohsumi M, Takao T, Noda T, Ohsumi Y. The reversible modification regulates the membrane-binding state of Apg8/Aut7 essential for autophagy and the cytoplasm to vacuole targeting pathway. *J Cell Biol.* 2000 Oct 16;151(2):263-76.
- Kish SJ, Morito CL, Hornykiewicz O. Glutathione peroxidase activity in Parkinson's disease brain. *Neurosci Lett.* 1985 Aug 5;58(3):343-6.
- Klein C, Schlossmacher MG. The genetics of Parkinson disease: Implications for neurological care. *Nat Clin Pract Neurol.* 2006 Mar;2(3):136-46.
- Klionsky DJ, Cregg JM, Dunn WA Jr, Emr SD, Sakai Y, Sandoval IV, Sibirny A, Subramani S, Thumm M, Veenhuis M, Ohsumi Y. A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Dev Cell.* 2003 Oct;5(4):539-45.
- Kondo Y, Kanzawa T, Sawaya R, Kondo S. The role of autophagy in cancer development and response to therapy. *Nat Rev Cancer.* 2005 Sep;5(9):726-34.
- Kopin IJ. Neurotransmitters and disorders of the basal ganglia. In: G.J. Siegel, B.W. Agranoff, R.W. Albers and P.B. Molinoff, Editors, *Basic Neurochemistry*, Raven Press, New York (1993), p. 903.
- Kowall NW, Hantraye P, Brouillet E, Beal MF, McKee AC, Ferrante RJ. MPTP induces alpha-synuclein aggregation in the substantia nigra of baboons. *Neuroreport.* 2000 Jan 17;11(1):211-3.
- Kouroku Y, Fujita E, Tanida I, Ueno T, Isoai A, Kumagai H, Ogawa S, Kaufman RJ, Kominami E, Momoi T. ER stress (PERK/eIF2alpha phosphorylation) mediates the polyglutamine-induced LC3 conversion, an essential step for autophagy formation. *Cell Death Differ.* 2007 Feb;14(2):230-9. Epub 2006 Jun 23.
- Kroemer G, El-Deiry WS, Golstein P, Peter ME, Vaux D, Vandenabeele P, Zhivotovsky B, Blagosklonny MV, Malorni W, Knight RA, Piacentini M, Nagata S, Melino G; Nomenclature Committee on Cell Death. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death Differ.* 2005 Nov;12 Suppl 2:1463-7.
- Kristal BS, Conway AD, Brown AM, Jain JC, Ulluci PA, Li SW, Burke WJ. Selective dopaminergic vulnerability: 3,4-dihydroxyphenylacetaldehyde targets mitochondria. *Free Radic Biol Med.* 2001 Apr 15;30(8):924-31.
- Kruger R, Kuhn W, Muller T, Woitalla D, Graeber M, Kosel S, Przuntek H, Epplen JT, Schols L, Riess O. Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Nat Genet.* 1998 Feb;18(2):106-8.
- Kuma A, Mizushima N, Ishihara N, Ohsumi Y. Formation of the approximately 350-kDa Apg12-Apg5-Apg16 multimeric complex, mediated by Apg16 oligomerization, is essential for autophagy in yeast. *J Biol Chem.* 2002 May 24;277(21):18619-25. Epub 2002 Mar 15.

L

Lai CT, Yu PH. Dopamine- and L-beta-3,4-dihydroxyphenylalanine hydrochloride (L-Dopa)-induced cytotoxicity towards catecholaminergic neuroblastoma SH-SY5Y cells. Effects of oxidative stress and antioxidative factors. *Biochem Pharmacol.* 1997 Feb 7;53(3):363-72.

Lamkanfi M, Festjens N, Declercq W, Vanden Berghe T, Vandenabeele P. Caspases in cell survival, proliferation and differentiation. *Cell Death Differ.* 2007 Jan;14(1):44-55. Epub 2006 Oct 20.

Larsen KE, Fon EA, Hastings TG, Edwards RH, Sulzer D. Methamphetamine-induced degeneration of dopaminergic neurons involves autophagy and upregulation of dopamine synthesis. *J Neurosci.* 2002 Oct 15;22(20):8951-60.

Lavedan C, Leroy E, Dehejia A, Buchholtz S, Dutra A, Nussbaum RL, Polymeropoulos MH. Identification, localization and characterization of the human gamma-synuclein gene. *Hum Genet.* 1998 Jul;103(1):106-12.

LaVoie MJ, Hastings TG. Dopamine quinone formation and protein modification associated with the striatal neurotoxicity of methamphetamine: evidence against a role for extracellular dopamine. *J Neurosci.* 1999 Feb 15;19(4):1484-91.

Levine B, Klionsky DJ. Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell.* 2004 Apr;6(4):463-77.

Lee AH, Iwakoshi NN, Glimcher LH. XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response. *Mol Cell Biol.* 2003 Nov;23(21):7448-59.

Lee D, Lee SY, Lee EN, Chang CS, Paik SR. alpha-Synuclein exhibits competitive interaction between calmodulin and synthetic membranes. *J Neurochem.* 2002 Sep;82(5):1007-17.

Lee H, Paik SG. Regulation of BNIP3 in normal and cancer cells. *Mol Cells.* 2006 Feb 28;21(1):1-6.

Lekstrom-Himes J, Xanthopoulos KG. Biological role of the CCAAT/enhancer-binding protein family of transcription factors. *J Biol Chem.* 1998 Oct 30;273(44):28545-8.

Li SW, Lin T-S, Burke WJ. 3,4-Dihydroxyphenylacetaldehyde and hydrogen peroxide generate a hydroxyl radical: possible role in Parkinson's disease pathogenesis. *Brain Res Mol Brain Res.* 2001 Sep 10;93(1):1-7.

Li X, Tan YC, Poulouse S, Olanow CW, Huang XY, Yue Z. Leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2)/PARK8 possesses GTPase activity that is altered in familial Parkinson's disease R1441C/G mutants. *J Neurochem.* 2007 Oct;103(1):238-47. Epub 2007 Jul 10.

Liang XH, Jackson S, Seaman M, Brown K, Kempkes B, Hibshoosh H, Levine B. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature.* 1999 Dec 9;402(6762):672-6.

Liston P, Roy N, Tamai K, Lefebvre C, Baird S, Cherton-Horvat G, Farahani R, McLean M, Ikeda JE, MacKenzie A, Korneluk RG. Suppression of apoptosis in mammalian cells by NAIP and a related family of IAP genes. *Nature.* 1996 Jan 25;379(6563):349-53.

Liu Y, Fallon L, Lashuel HA, Liu Z, Lansbury PT Jr. The UCH-L1 gene encodes two opposing enzymatic activities that affect alpha-synuclein degradation and Parkinson's disease susceptibility. *Cell*. 2002 Oct 18;111(2):209-18.

Ljungman M. Dial 9-1-1 for p53: mechanisms of p53 activation by cellular stress. *Neoplasia*. 2000 May-Jun;2(3):208-25.

Lorenzo HK, Susin SA, Penninger J, Kroemer G. Apoptosis inducing factor (AIF): a phylogenetically old, caspase-independent effector of cell death. *Cell Death Differ*. 1999 Jun;6(6):516-24.

Lotharius J, Barg S, Wiekop P, Lundberg C, Raymon HK, Brundin P. Effect of mutant alpha-synuclein on dopamine homeostasis in a new human mesencephalic cell line. *J Biol Chem*. 2002 Oct 11;277(41):38884-94. Epub 2002 Jul 26.

Lum JJ, Bauer DE, Kong M, Harris MH, Li C, Lindsten T, Thompson CB. Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis. *Cell*. 2005 Jan 28;120(2):237-48.

M

Mani A, Gelmann EP. The ubiquitin-proteasome pathway and its role in cancer. *J Clin Oncol*. 2005 Jul 20;23(21):4776-89.

Mannisto PT, Kaakkola S. Catechol-O-methyltransferase (COMT): biochemistry, molecular biology, pharmacology, and clinical efficacy of the new selective COMT inhibitors. *Pharmacol Rev*. 1999 Dec;51(4):593-628.

Marciniak SJ, Ron D. Endoplasmic reticulum stress signaling in disease. *Physiol Rev*. 2006 Oct;86(4):1133-49.

Marciniak SJ, Yun CY, Oyadomari S, Novoa I, Zhang Y, Jungreis R, Nagata K, Harding HP, Ron D. CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum. *Genes Dev*. 2004 Dec 15;18(24):3066-77.

Maroteaux L, Campanelli JT, Scheller RH. Synuclein: a neuron-specific protein localized to the nucleus and presynaptic nerve terminal. *J Neurosci*. 1988 Aug;8(8):2804-15.

Martínez-Vicente M, Cuervo AM. Autophagy and neurodegeneration: when the cleaning crew goes on strike. *Lancet Neurol*. 2007 Apr;6(4):352-61.

Massey AC, Kaushik S, Sovak G, Kiffin R, Cuervo AM. Consequences of the selective blockage of chaperone-mediated autophagy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Apr 11;103(15):5805-10. Epub 2006 Apr 3.

Matapurkar A, Lazebnik Y. Requirement of cytochrome c for apoptosis in human cells. *Cell Death Differ*. 2006 Dec;13(12):2062-7. Epub 2006 May 26.

MacDonald MJ, Marshall LK. Mouse lacking NAD⁺-linked glycerol phosphate dehydrogenase has normal pancreatic beta cell function but abnormal metabolite pattern in skeletal muscle. *Arch Biochem Biophys*. 2000 Dec 1;384(1):143-53.

McCullough KD, Martindale JL, Klotz LO, Aw TY, Holbrook NJ. Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. *Mol Cell Biol*. 2001 Feb;21(4):1249-59.

McLaughlin BA, Nelson D, Erecinska M, Chesselet MF. Toxicity of dopamine to striatal neurons in vitro and potentiation of cell death by a mitochondrial inhibitor. *J Neurochem*. 1998 Jun;70(6):2406-15.

McLean PJ, Hyman BT. An alternatively spliced form of rodent alpha-synuclein forms intracellular inclusions in vitro: role of the carboxy-terminus in alpha-synuclein aggregation. *Neurosci Lett*. 2002 May 3;323(3):219-23.

Mena I, Court J, Fuenzalida S, Papavasiliou PS, Cotzias GC. Modification of chronic manganese poisoning. Treatment with L-dopa or 5-OH tryptophane. *N Engl J Med*. 1970 Jan 1;282(1):5-10.

Meijer AJ, Codogno P. Regulation and role of autophagy in mammalian cells. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004 Dec;36(12):2445-62.

Mezey E, Dehejia A, Harta G, Papp MI, Polymeropoulos MH, Brownstein MJ. Alpha synuclein in neurodegenerative disorders: murderer or accomplice? *Nat Med*. 1998 Jul;4(7):755-7.

Michel PP, Hefti F. Toxicity of 6-hydroxydopamine and dopamine for dopaminergic neurons in culture. *J Neurosci Res*. 1990 Aug;26(4):428-35.

Mizuno Y, Ohta S, Tanaka M, Takamiya S, Suzuki K, Sato T, Oya H, Ozawa T, Kagawa Y. Deficiencies in complex I subunits of the respiratory chain in Parkinson's disease. *Biochem Biophys Res Commun*. 1989 Sep 29;163(3):1450-5.

Mizushima N, Kuma A, Kobayashi Y, Yamamoto A, Matsubae M, Takao T, Natsume T, Ohsumi Y, Yoshimori T. Mouse Apg16L, a novel WD-repeat protein, targets to the autophagic isolation membrane with the Apg12-Apg5 conjugate. *J Cell Sci*. 2003 May 1;116(Pt 9):1679-88.

Mizushima N, Noda T, Yoshimori T, Tanaka Y, Ishii T, George MD, Klionsky DJ, Ohsumi M, Ohsumi Y. A protein conjugation system essential for autophagy. *Nature*. 1998 Sep 24;395(6700):395-8.

Mizushima N, Noda T, Ohsumi Y. Apg16p is required for the function of the Apg12p-Apg5p conjugate in the yeast autophagy pathway. *EMBO J*. 1999 Jul 15;18(14):3888-96.

Mizushima N, Yamamoto A, Hatano M, Kobayashi Y, Kabeya Y, Suzuki K, Tokuhiisa T, Ohsumi Y, Yoshimori T. Dissection of autophagosome formation using Apg5-deficient mouse embryonic stem cells. *J Cell Biol*. 2001 Feb 19;152(4):657-68.

Mizushima N, Yoshimori T. How to Interpret LC3 Immunoblotting. *Autophagy*. 2007 Jun 19;3(6).

Mortimore GE, Poso AR. The lysosomal pathway of intracellular proteolysis in liver: regulation by amino acids. *Adv Enzyme Regul*. 1986;25:257-76.

Muller C, Kowenz-Leutz E, Grieser-Ade S, Graf T, Leutz A. NF-M (chicken C/EBP beta) induces eosinophilic differentiation and apoptosis in a hematopoietic progenitor cell line. *EMBO J*. 1995 Dec 15;14(24):6127-35.

N

Nagatsu T, Levitt M, Uderfriend S. Tyrosine hydroxylase: the initial step in norepinephrine biosynthesis. *J Biol Chem* 1964; 239:2910-7.

Nakajima T, Kinoshita S, Sasagawa T, Sasaki K, Naruto M, Kishimoto T, Akira S. Phosphorylation at threonine-235 by a ras-dependent mitogen-activated protein kinase cascade is essential for transcription factor NF-IL6. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Mar 15;90(6):2207-11.

Narhi L, Wood SJ, Steavenson S, Jiang Y, Wu GM, Anafi D, Kaufman SA, Martin F, Sitney K, Denis P, Louis JC, Wypych J, Biere AL, Citron M. Both familial Parkinson's disease mutations accelerate alpha-synuclein aggregation. *J Biol Chem*. 1999 Apr 2;274(14):9843-6. Erratum in: *J Biol Chem* 1999 May 7;274(19):13728.

Nicholson DW, Thornberry NA. Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci*. 1997 Aug;22(8):299-306.

Noda T, Kim J, Huang WP, Baba M, Tokunaga C, Ohsumi Y, Klionsky DJ. Apg9p/Cvt7p is an integral membrane protein required for transport vesicle formation in the Cvt and autophagy pathways. *J Cell Biol*. 2000 Feb 7;148(3):465-80.

Novikoff AB, Shin WY. Endoplasmic reticulum and autophagy in rat hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1978 Oct;75(10):5039-42.

O

Offen D, Gorodin S, Melamed E, Hanania J, Malik Z. Dopamine-melanin is actively phagocytized by PC12 cells and cerebellar granular cells: possible implications for the etiology of Parkinson's disease. *Neurosci Lett*. 1999 Jan 29;260(2):101-4.

Offen D, Ziv I, Panet H, Wasserman L, Stein R, Melamed E, Barzilai A. Dopamine-induced apoptosis is inhibited in PC12 cells expressing BCL-2. *Cell Mol Neurobiol*. 1997 Jun;17(3):289-304.

Ogier-Denis E, Couvineau A, Maoret JJ, Hourii JJ, Bauvy C, De Stefanis D, Isidoro C, Laburthe M, Codogno P. A heterotrimeric Gi3-protein controls autophagic sequestration in the human colon cancer cell line HT-29. *J Biol Chem*. 1995 Jan 6;270(1):13-6.

Ogier-Denis E, Pattingre S, El Benna J, Codogno P. Erk1/2-dependent phosphorylation of Galpha-interacting protein stimulates its GTPase accelerating activity and autophagy in human colon cancer cells. *J Biol Chem*. 2000 Dec 15;275(50):39090-5.

Oh-Hashi K, Maruyama W, Isobe K. Peroxynitrite induces GADD34, 45, and 153 VIA p38 MAPK in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Free Radic Biol Med*. 2001 Jan 15;30(2):213-21.

Okochi M, Walter J, Koyama A, Nakajo S, Baba M, Iwatsubo T, Meijer L, Kahle PJ, Haass C. Constitutive phosphorylation of the Parkinson's disease associated alpha-synuclein. *J Biol Chem*. 2000 Jan 7;275(1):390-7.

Olesen OF, Mikkelsen JD, Gerdes C, Jensen PH. Isoform-specific binding of human apolipoprotein E to the non-amyloid beta component of Alzheimer's disease amyloid. *Brain Res Mol Brain Res*. 1997 Feb;44(1):105-12.

Oshumi Y. Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001 Mar;2(3):211-6.

Ostrerova N, Petrucelli L, Farrer M, Mehta N, Choi P, Hardy J, Wolozin B. alpha-Synuclein shares physical and functional homology with 14-3-3 proteins. *J Neurosci*. 1999 Jul 15;19(14):5782-91.

Oyadomari S, Mori M. Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. *Cell Death Differ*. 2004 Apr;11(4):381-9.

Oyadomari S, Takeda K, Takiguchi M, Gotoh T, Matsumoto M, Wada I, Akira S, Araki E, Mori M. Nitric oxide-induced apoptosis in pancreatic beta cells is mediated by the endoplasmic reticulum stress pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Sep 11;98(19):10845-50. Epub 2001 Aug 28.

P

Paglin S, Hollister T, Delohery T, Hackett N, McMahill M, Sphicas E, Domingo D, Yahalom J. A novel response of cancer cells to radiation involves autophagy and formation of acidic vesicles. *Cancer Res*. 2001 Jan 15;61(2):439-44.

Paik SR, Lee JH, Kim DH, Chang CS, Kim YS. Self-oligomerization of NACP, the precursor protein of the non-amyloid beta/A4 protein (A beta) component of Alzheimer's disease amyloid, observed in the presence of a C-terminal A beta fragment (residues 25-35). *FEBS Lett*. 1998 Jan 2;421(1):73-6.

Paik SR, Shin HJ, Lee JH, Chang CS, Kim J. Copper(II)-induced self-oligomerization of alpha-synuclein. *Biochem J*. 1999 Jun 15;340 (Pt 3):821-8.

Pandey UB, Nie Z, Batlevi Y, McCray BA, Ritson GP, Nedelsky NB, Schwartz SL, DiProspero NA, Knight MA, Schuldiner O, Padmanabhan R, Hild M, Berry DL, Garza D, Hubbert CC, Yao TP, Baehrecke EH, Taylor JP. HDAC6 rescues neurodegeneration and provides an essential link between autophagy and the UPS. *Nature*. 2007 Jun 14;447(7146):859-63.

Pattingre S, Bauvy C, Codogno P. Amino acids interfere with the ERK1/2-dependent control of macroautophagy by controlling the activation of Raf-1 in human colon cancer HT-29 cells. *J Biol Chem*. 2003 May 9;278(19):16667-74. Epub 2003 Feb 27.

Pattingre S, Tassa A, Qu X, Garuti R, Liang XH, Mizushima N, Packer M, Schneider MD, Levine B. BCL-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell*. 2005 Sep 23;122(6):927-39.

Pattingre S, Levine B. BCL-2 inhibition of autophagy: a new route to cancer? *Cancer Res*. 2006 Mar 15;66(6):2885-8.

Pelicano H, Feng L, Zhou Y, Carew JS, Hileman EO, Plunkett W, Keating MJ, Huang P. Inhibition of mitochondrial respiration: a novel strategy to enhance drug-induced apoptosis in human leukemia cells by a reactive oxygen species-mediated mechanism. *J Biol Chem*. 2003 Sep 26;278(39):37832-9. Epub 2003 Jul 9.

Perez RG, Waymire JC, Lin E, Liu JJ, Guo F, Zigmond MJ. A role for alpha-synuclein in the regulation of dopamine biosynthesis. *J Neurosci*. 2002 Apr 15;22(8):3090-9. Erratum in: *J Neurosci* 2002 Oct 15;22(20):9142.

Petiot A, Ogier-Denis E, Blommaert EF, Meijer AJ, Codogno P. Distinct classes of phosphatidylinositol 3'-kinases are involved in signaling pathways that control macroautophagy in HT-29 cells. *J Biol Chem*. 2000 Jan 14;275(2):992-8. Erratum in: *J Biol Chem* 2000 Apr 21;275(16):12360.

Pifl C, Zezula J, Spittler A, Kattinger A, Reither H, Caron MG, Hornykiewicz O. Antiproliferative action of dopamine and norepinephrine in neuroblastoma cells expressing the human dopamine transporter. *FASEB J*. 2001 Jul;15(9):1607-9.

Plun-Favreau H, Klupsch K, Moiso N, Gandhi S, Kjaer S, Frith D, Harvey K, Deas E, Harvey RJ, McDonald N, Wood NW, Martins LM, Downward J. The mitochondrial protease HtrA2 is regulated by Parkinson's disease-associated kinase PINK1. *Nat Cell Biol*. 2007 Nov;9(11):1243-1252. Epub 2007 Sep 30.

Poli V. The role of C/EBP isoforms in the control of inflammatory and native immunity functions. *J Biol Chem*. 1998 Nov 6;273(45):29279-82.

Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A, Pike B, Root H, Rubenstein J, Boyer R, Stenroos ES, Chandrasekharappa S, Athanassiadou A, Papapetropoulos T, Johnson WG, Lazzarini AM, Duvoisin RC, Di Iorio G, Golbe LI, Nussbaum RL. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science*. 1997 Jun 27;276(5321):2045-7.

Premkumar A, Simantov R. Mitochondrial voltage-dependent anion channel is involved in dopamine-induced apoptosis. *J Neurochem*. 2002 Jul;82(2):345-52.

Punnonen EL, Reunanen H. Effects of vinblastine, leucine, and histidine, and 3-methyladenine on autophagy in Ehrlich ascites cells. *Exp Mol Pathol*. 1990 Feb;52(1):87-97.

R

Ray R, Chen G, Vande Velde C, Cizeau J, Park JH, Reed JC, Gietz RD, Greenberg AH. BNIP3 heterodimerizes with BCL-2/Bcl-X(L) and induces cell death independent of a BCL-2 homology 3 (BH3) domain at both mitochondrial and nonmitochondrial sites. *J Biol Chem*. 2000 Jan 14;275(2):1439-48.

Recchia A, Debetto P, Negro A, Guidolin D, Skaper SD, Giusti P. Alpha-synuclein and Parkinson's disease. *FASEB J*. 2004 Apr;18(6):617-26.

Reggiori F, Klionsky DJ. Autophagy in the eukaryotic cell. *Eukaryot Cell*. 2002 Feb;1(1):11-21.

Reggiori F, Shintani T, Nair U, Klionsky DJ. Atg9 cycles between mitochondria and the pre-autophagosomal structure in yeasts. *Autophagy*. 2005 Jul;1(2):101-9. Epub 2005 Jul 11.

Reunanen H, Marttinen M, Hirsimäki P. Effects of griseofulvin and nocodazole on the accumulation of autophagic vacuoles in Ehrlich ascites tumor cells. *Exp Mol Pathol*. 1988 Feb;48(1):97-102.

Rideout HJ, Lang-Rollin I, Stefanis L. Involvement of macroautophagy in the dissolution of neuronal inclusions. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004 Dec;36(12):2551-62.

Ron D, Habener JF. CHOP, a novel developmentally regulated nuclear protein that dimerizes with transcription factors C/EBP and LAP and functions as a dominant-negative inhibitor of gene transcription. *Genes Dev*. 1992 Mar;6(3):439-53.

Ross RA, Spengler BA, Biedler JL. Coordinate morphological and biochemical interconversion of human neuroblastoma cells. *J Natl Cancer Inst*. 1983 Oct;71(4):741-7.

Roy N, Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC. The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. *EMBO J*. 1997 Dec 1;16(23):6914-25.

Rubinsztein DC. Autophagy induction rescues toxicity mediated by proteasome inhibition. *Neuron*. 2007 Jun 21;54(6):854-6.

Ryu EJ, Harding HP, Angelastro JM, Vitolo OV, Ron D, Greene LA. Endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response in cellular models of Parkinson's disease. *J Neurosci*. 2002 Dec 15;22(24):10690-8.

S

Salceda S, Caro J. Hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. *J Biol Chem*. 1997 Sep 5;272(36):22642-7.

Sánchez-Rivera AE, Corona-Avendaño S, Alarcón-Angeles G, Rojas-Hernández A, Ramírez-Silva MT, Romero-Romo MA. Spectrophotometric study on the stability of dopamine and the determination of its acidity constants. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*. 2003 Nov;59(13):3193-203.

Santiago M, Machado A, Cano J. Nigral and striatal comparative study of the neurotoxic action of 1-methyl-4-phenylpyridinium ion: involvement of dopamine uptake system. *J Neurochem*. 1996 Mar;66(3):1182-90.

Sarbassov DD, Sabatini DM. Redox regulation of the nutrient-sensitive raptor-mTOR pathway and complex. *J Biol Chem*. 2005 Nov 25;280(47):39505-9. Epub 2005 Sep 23.

Schneider P, Thome M, Burns K, Bodmer JL, Hofmann K, Kataoka T, Holler N, Tschopp J. TRAIL receptors 1 (DR4) and 2 (DR5) signal FADD-dependent apoptosis and activate NF-kappaB. *Immunity*. 1997 Dec;7(6):831-6.

Scott SV, Baba M, Ohsumi Y, Klionsky DJ. Aminopeptidase I is targeted to the vacuole by a nonclassical vesicular mechanism. *J Cell Biol.* 1997 Jul 14;138(1):37-44.

Seglen PO, Gordon PB. 3-Methyladenine: specific inhibitor of autophagic/lysosomal protein degradation in isolated rat hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1982 Mar;79(6):1889-92.

Seitz G, Stegmann HB, Jager HH, Schlude HM, Wolburg H, Roginsky VA, Niethammer D, Bruchelt G. Neuroblastoma cells expressing the noradrenaline transporter are destroyed more selectively by 6-fluorodopamine than by 6-hydroxydopamine. *J Neurochem.* 2000 Aug;75(2):511-20.

Senft AP, Dalton TP, Shertzer HG. Determining glutathione and glutathione disulfide using the fluorescence probe o-phthalaldehyde. *Anal Biochem.* 2000 Apr 10;280(1):80-6.

Shah NS. Accumulation of (3 H)dopamine by isolated brain mitochondria. *Brain Res.* 1972 Mar 24;38(2):391-8.

Shen J, Chen X, Hendershot L, Prywes R. ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of Golgi localization signals. *Dev Cell.* 2002 Jul;3(1):99-111.

Shen XM, Dryhurst G. Further insights into the influence of L-cysteine on the oxidation chemistry of dopamine: reaction pathways of potential relevance to Parkinson's disease. *Chem Res Toxicol.* 1996 Jun;9(4):751-63.

Shen XM, Dryhurst G. Iron- and manganese-catalyzed autoxidation of dopamine in the presence of L-cysteine: possible insights into iron- and manganese-mediated dopaminergic neurotoxicity. *Chem Res Toxicol.* 1998 Jul;11(7):824-37.

Shieh SY, Ikeda M, Taya Y, Prives C. DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell.* 1997 Oct 31;91(3):325-34.

Shimura H, Hattori N, Kubo S, Mizuno Y, Asakawa S, Minoshima S, Shimizu N, Iwai K, Chiba T, Tanaka K, Suzuki T. Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. *Nat Genet.* 2000 Jul;25(3):302-5.

Shimura H, Schlossmacher MG, Hattori N, Frosch MP, Trockenbacher A, Schneider R, Mizuno Y, Kosik KS, Selkoe DJ. Ubiquitination of a new form of alpha-synuclein by parkin from human brain: implications for Parkinson's disease. *Science.* 2001 Jul 13;293(5528):263-9. Epub 2001 Jun 28.

Shintani T, Mizushima N, Ogawa Y, Matsuura A, Noda T, Ohsumi Y. Apg10p, a novel protein-conjugating enzyme essential for autophagy in yeast. *EMBO J.* 1999 Oct 1;18(19):5234-41.

Sidhu A, Wersinger C, Vernier P. alpha-Synuclein regulation of the dopaminergic transporter: a possible role in the pathogenesis of Parkinson's disease. *FEBS Lett.* 2004 May 7;565(1-3):1-5.

Silva RM, Ries V, Oo TF, Yarygina O, Jackson-Lewis V, Ryu EJ, Lu PD, Marciniak SJ, Ron D, Przedborski S, Kholodilov N, Greene LA, Burke RE. CHOP/GADD153 is a mediator of apoptotic death in substantia nigra dopamine neurons in an in vivo neurotoxin model of parkinsonism. *J Neurochem*. 2005 Nov;95(4):974-86. Epub 2005 Aug 31.

Silvestri L, Caputo V, Bellacchio E, Atorino L, Dallapiccola B, Valente EM, Casari G. Mitochondrial import and enzymatic activity of PINK1 mutants associated to recessive parkinsonism. *Hum Mol Genet*. 2005 Nov 15;14(22):3477-92. Epub 2005 Oct 5.

Simantov R, Blinder E, Ratovitski T, Tauber M, Gabbay M, Porat S. Dopamine-induced apoptosis in human neuronal cells: inhibition by nucleic acids antisense to the dopamine transporter. *Neuroscience*. 1996 Sep;74(1):39-50.

Singh J, Kaur G. Neuroprotection mediated by subtoxic dose of NMDA in SH-SY5Y neuroblastoma cultures: activity-dependent regulation of PSA-NCAM expression. *Brain Res Mol Brain Res*. 2005 Jun 13;137(1-2):223-34. Epub 2005 Apr 19.

Sofic E, Denisova N, Youdim K, Vatrenejak-Velagic V, De Filippo C, Mehmedagic A, Causevic A, Cao G, Joseph JA, Prior RL. Antioxidant and pro-oxidant capacity of catecholamines and related compounds. Effects of hydrogen peroxide on glutathione and sphingomyelinase activity in pheochromocytoma PC12 cells: potential relevance to age-related diseases. *J Neural Transm*. 2001;108(5):541-57.

Soltaninassab SR, Sekhar KR, Meredith MJ, Freeman ML. Multi-faceted regulation of gamma-glutamylcysteine synthetase. *J Cell Physiol*. 2000 Feb;182(2):163-70.

Song X, Perkins S, Jortner BS, Ehrich M. Cytotoxic effects of MPTP on SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Neurotoxicology*. 1997;18(2):341-53.

Souza JM, Giasson BI, Chen Q, Lee VM, Ischiropoulos H. Dityrosine cross-linking promotes formation of stable alpha-synuclein polymers. Implication of nitrate and oxidative stress in the pathogenesis of neurodegenerative synucleinopathies. *J Biol Chem*. 2000 Jun 16;275(24):18344-9.

Spencer JP, Jenner A, Aruoma OI, Evans PJ, Kaur H, Dexter DT, Jenner P, Lees AJ, Marsden DC, Halliwell B. Intense oxidative DNA damage promoted by L-dopa and its metabolites. Implications for neurodegenerative disease. *FEBS Lett*. 1994 Oct 24;353(3):246-50.

Spencer JP, Jenner P, Daniel SE, Lees AJ, Marsden DC, Halliwell B. Conjugates of catecholamines with cysteine and GSH in Parkinson's disease: possible mechanisms of formation involving reactive oxygen species. *J Neurochem*. 1998 Nov;71(5):2112-22.

Spillantini MG, Divane A, Goedert M. Assignment of human alpha synuclein (SNCA) and beta-synuclein (SNCB) genes to chromosomes 4q21 and 5q35. *Genomics*. 1995 May 20;27(2):379-81.

Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM, Trojanowski JQ, Jakes R, Goedert M. Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature*. 1997 Aug 28;388(6645):839-40.

Stefanis L, Larsen KE, Rideout HJ, Sulzer D, Greene LA. Expression of A53T mutant but not wild-type alpha-synuclein in PC12 cells induces alterations of the ubiquitin-dependent degradation system, loss of dopamine release, and autophagic cell death. *J Neurosci*. 2001 Dec 15;21(24):9549-60.

Sterneck E, Johnson PF. CCAAT/enhancer binding protein beta is a neuronal transcriptional regulator activated by nerve growth factor receptor signaling. *J Neurochem.* 1998 Jun;70(6):2424-33.

Stocchi V, Cucchiaroni L, Magnani M, Chiarantini L, Palma P, Crescentini G. Simultaneous extraction and reverse-phase high-performance liquid chromatographic determination of adenine and pyridine nucleotides in human red blood cells. *Anal Biochem.* 1985 Apr;146(1):118-24.

Stromhaug PE, Berg TO, Fengsrud M, Seglen PO. Purification and characterization of autophagosomes from rat hepatocytes. *Biochem J.* 1998 Oct 15;335 (Pt 2):217-24.

Stromhaug PE, Klionsky DJ. Approaching the molecular mechanism of autophagy. *Traffic.* 2001 Aug;2(8):524-31.

Stokes AH, Hastings TG, Vrana KE. Cytotoxic and genotoxic potential of dopamine. *J Neurosci Res.* 1999 Mar 15;55(6):659-65.

Stokes AH, Freeman WM, Mitchell SG, Burnette TA, Hellmann GM, Vrana KE. Induction of GADD45 and GADD153 in neuroblastoma cells by dopamine-induced toxicity. *Neurotoxicology.* 2002 Dec;23(6):675-84.

Sulzer D, Zecca L. Intraneuronal dopamine-quinone synthesis: a review. *Neurotox Res.* 2000 Feb;1(3):181-95.

Sulzer D, Bogulavsky J, Larsen KE, Behr G, Karatekin E, Kleinman MH, Turro N, Krantz D, Edwards RH, Greene LA, Zecca L. Neuromelanin biosynthesis is driven by excess cytosolic catecholamines not accumulated by synaptic vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Oct 24;97(22):11869-74.

Suzuki K, Kirisako T, Kamada Y, Mizushima N, Noda T, Ohsumi Y. The pre-autophagosomal structure organized by concerted functions of APG genes is essential for autophagosome formation. *EMBO J.* 2001 Nov 1;20(21):5971-81.

T

Takahashi T, Deng Y, Maruyama W, Dostert P, Kawai M, Naoi M. Uptake of a neurotoxin-candidate, (R)-1,2-dimethyl-6,7-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline into human dopaminergic neuroblastoma SH-SY5Y cells by dopamine transport system. *J Neural Transm Gen Sect.* 1994;98(2):107-18.

Takahashi T, Yamashita H, Nakamura T, Nagano Y, Nakamura S. Tyrosine 125 of alpha-synuclein plays a critical role for dimerization following oxidative stress. *Brain Res.* 2002 May 31;938(1-2):73-80.

Takeda A, Hashimoto M, Mallory M, Sundsumo M, Hansen L, Masliah E. C-terminal alpha-synuclein immunoreactivity in structures other than Lewy bodies in neurodegenerative disorders. *Acta Neuropathol (Berl).* 2000 Mar;99(3):296-304.

Taloczy Z, Jiang W, Virgin HW 4th, Leib DA, Scheuner D, Kaufman RJ, Eskelinen EL, Levine B. Regulation of starvation- and virus-induced autophagy by the eIF2alpha kinase signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Jan 8;99(1):190-5. Epub 2001 Dec 26.

Bibliografia

Tan EK, Skipper LM. Pathogenic mutations in Parkinson disease. *Hum Mutat.* 2007 Jul;28(7):641-53.

Tanida I, Minematsu-Ikeguchi N, Ueno T, Kominami E. Lysosomal turnover, but not a cellular level, of endogenous LC3 is a marker for autophagy. *Autophagy.* 2005 Jul;1(2):84-91. Epub 2005 Jul 31.

Tanner CM. Epidemiology of Parkinson's disease. *Neurol Clin.* 1992 May;10(2):317-29.

Tatton NA, Maclean-Fraser A, Tatton WG, Perl DP, Olanow CW. A fluorescent double-labeling method to detect and confirm apoptotic nuclei in Parkinson's disease. *Ann Neurol.* 1998 Sep;44(3 Suppl 1):S142-8.

Tian WN, Braunstein LD, Pang J, Stuhlmeier KM, Xi QC, Tian X, Stanton RC. Importance of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity for cell growth. *J Biol Chem.* 1998 Apr 24;273(17):10609-17.

Touchman JW, Dehejia A, Chiba-Falek O, Cabin DE, Schwartz JR, Orrison BM, Polymeropoulos MH, Nussbaum RL. Human and mouse alpha-synuclein genes: comparative genomic sequence analysis and identification of a novel gene regulatory element. *Genome Res.* 2001 Jan;11(1):78-86.

Tracy K, Dibling BC, Spike BT, Knabb JR, Schumacker P, Macleod KF. BNIP3 is an RB/E2F target gene required for hypoxia-induced autophagy. *Mol Cell Biol.* 2007 Sep;27(17):6229-42. Epub 2007 Jun 18.

Tretter L, Sipos I, Adam-Vizi V. Initiation of neuronal damage by complex I deficiency and oxidative stress in Parkinson's disease. *Neurochem Res.* 2004 Mar;29(3):569-77.

Trojanowski JQ, Lee VM. Aggregation of neurofilament and alpha-synuclein proteins in Lewy bodies: implications for the pathogenesis of Parkinson disease and Lewy body dementia. *Arch Neurol.* 1998 Feb;55(2):151-2.

U

Ubeda M, Wang XZ, Zinszner H, Wu I, Habener JF, Ron D. Stress-induced binding of the transcriptional factor CHOP to a novel DNA control element. *Mol Cell Biol.* 1996 Apr;16(4):1479-89.

Ueda K, Fukushima H, Masliah E, Xia Y, Iwai A, Yoshimoto M, Otero DA, Kondo J, Ihara Y, Saitoh T. Molecular cloning of cDNA encoding an unrecognized component of amyloid in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 Dec 1;90(23):11282-6.

V

Vande Velde C, Cizeau J, Dubik D, Alimonti J, Brown T, Israels S, Hakem R, Greenberg AH. BNIP3 and genetic control of necrosis-like cell death through the mitochondrial permeability transition pore. *Mol Cell Biol.* 2000 Aug;20(15):5454-68.

Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M, Silke J, Connolly LM, Reid GE, Moritz RL, Simpson RJ, Vaux DL. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell.* 2000 Jul 7;102(1):43-53.

Vila M, Przedborski S. Genetic clues to the pathogenesis of Parkinson's disease. *Nat Med.* 2004 Jul;10 Suppl:S58-62.

W

Wakabayashi K, Fukushima T, Koide R, Horikawa Y, Hasegawa M, Watanabe Y, Noda T, Eguchi I, Morita T, Yoshimoto M, Iwatsubo T, Takahashi H. Juvenile-onset generalized neuroaxonal dystrophy (Hallervorden-Spatz disease) with diffuse neurofibrillary and lewy body pathology. *Acta Neuropathol (Berl).* 2000 Mar;99(3):331-6.

Wakabayashi K, Yoshimoto M, Tsuji S, Takahashi H. Alpha-synuclein immunoreactivity in glial cytoplasmic inclusions in multiple system atrophy. *Neurosci Lett.* 1998 Jun 19;249(2-3):180-2.

Wang GL, Semenza GL. Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem.* 1995 Jan 20;270(3):1230-7.

Wang XZ, Harding HP, Zhang Y, Jolicoeur EM, Kuroda M, Ron D. Cloning of mammalian Ire1 reveals diversity in the ER stress responses. *EMBO J.* 1998 Oct 1;17(19):5708-17.

Wang XZ, Kuroda M, Sok J, Batchvarova N, Kimmel R, Chung P, Zinszner H, Ron D. Identification of novel stress-induced genes downstream of chop. *EMBO J.* 1998 Jul 1;17(13):3619-30.

Wang XZ, Ron D. Stress-induced phosphorylation and activation of the transcription factor CHOP (GADD153) by p38 MAP Kinase. *Science.* 1996 May 31;272(5266):1347-9.

Webb JL, Ravikumar B, Atkins J, Skepper JN, Rubinsztein DC. Alpha-Synuclein is degraded by both autophagy and the proteasome. *J Biol Chem.* 2003 Jul 4;278(27):25009-13. Epub 2003 Apr 28.

Weinreb O, Mandel S, Youdim MB. cDNA gene expression profile homology of antioxidants and their antiapoptotic and proapoptotic activities in human neuroblastoma cells. *FASEB J.* 2003 May;17(8):935-7. Epub 2003 Mar 5.

West AR, Floresco SB, Charara A, Rosenkranz JA, Grace AA. Electrophysiological interactions between striatal glutamatergic and dopaminergic systems. *Ann N Y Acad Sci.* 2003 Nov;1003:53-74.

Wolf BB, Green DR. Suicidal tendencies: apoptotic cell death by caspase family proteinases. *J Biol Chem.* 1999 Jul 16;274(29):20049-52.

Wood SJ, Wypych J, Steavenson S, Louis JC, Citron M, Biere AL. alpha-synuclein fibrillogenesis is nucleation-dependent. Implications for the pathogenesis of Parkinson's disease. *J Biol Chem.* 1999 Jul 9;274(28):19509-12.

Wu X, Gu HH. Molecular cloning of the mouse dopamine transporter and pharmacological comparison with the human homologue. *Gene.* 1999 Jun 11;233(1-2):163-70.

Wullschleger S, Loewith R, Hall MN. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell*. 2006 Feb 10;124(3):471-84.

X

Xie Z, Klionsky DJ. Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nat Cell Biol*. 2007 Oct;9(10):1102-9.

Xu Y. Regulation of p53 responses by post-translational modifications. *Cell Death Differ*. 2003 Apr;10(4):400-3.

Xu Y, Kim SO, Li Y, Han J. Autophagy contributes to caspase-independent macrophage cell death. *J Biol Chem*. 2006 Jul 14;281(28):19179-87. Epub 2006 May 15.

Y

Yamada T, Carson AR, Caniggia I, Umebayashi K, Yoshimori T, Nakabayashi K, Scherer SW. Endothelial nitric-oxide synthase antisense (NOS3AS) gene encodes an autophagy-related protein (APG9-like2) highly expressed in trophoblast. *J Biol Chem*. 2005 May 6;280(18):18283-90. Epub 2005 Mar 8.

Yang W, Tiffany-Castiglioni E. The bipyridyl herbicide paraquat produces oxidative stress-mediated toxicity in human neuroblastoma SH-SY5Y cells: relevance to the dopaminergic pathogenesis. *J Toxicol Environ Health A*. 2005 Nov 26;68(22):1939-61.

Ye Y, Meyer HH, Rapoport TA. The AAA ATPase Cdc48/p97 and its partners transport proteins from the ER into the cytosol. *Nature*. 2001 Dec 6;414(6864):652-6.

Ye Y, Shibata Y, Yun C, Ron D, Rapoport TA. A membrane protein complex mediates retro-translocation from the ER lumen into the cytosol. *Nature*. 2004 Jun 24;429(6994):841-7.

Yeh WC, Pompa JL, McCurrach ME, Shu HB, Elia AJ, Shahinian A, Ng M, Wakeham A, Khoo W, Mitchell K, El-Deiry WS, Lowe SW, Goeddel DV, Mak TW. FADD: essential for embryo development and signaling from some, but not all, inducers of apoptosis. *Science*. 1998 Mar 20;279(5358):1954-8.

Yi H, Maruyama W, Akao Y, Takahashi T, Iwasa K, Youdim MB, Naoi M. N-Propargylamine protects SH-SY5Y cells from apoptosis induced by an endogenous neurotoxin, N-methyl(R)salsolinol, through stabilization of mitochondrial membrane and induction of anti-apoptotic BCL-2. *J Neural Transm*. 2006 Jan;113(1):21-32. Epub 2005 Apr 22.

Yin XM. Bid, a BH3-only multi-functional molecule, is at the cross road of life and death. *Gene*. 2006 Mar 15;369:7-19. Epub 2006 Jan 27.

Yorimitsu T, Klionsky DJ. Autophagy: molecular machinery for self-eating. *Cell Death Differ*. 2005 Nov;12 Suppl 2:1542-52.

Yorimitsu T, Nair U, Yang Z, Klionsky DJ. Endoplasmic reticulum stress triggers autophagy. *J Biol Chem*. 2006 Oct 6;281(40):30299-304. Epub 2006 Aug 10.

Yoshida H, Haze K, Yanagi H, Yura T, Mori K. Identification of the cis-acting endoplasmic reticulum stress response element responsible for transcriptional induction of mammalian glucose-regulated proteins. Involvement of basic leucine zipper transcription factors. *J Biol Chem*. 1998 Dec 11;273(50):33741-9. Erratum in: *J Biol Chem* 1999 Jan 22;274(4):2592.

Yoshimori T. Autophagy: a regulated bulk degradation process inside cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004 Jan 9;313(2):453-8.

Yousefi S, Perozzo R, Schmid I, Ziemiecki A, Schaffner T, Scapozza L, Brunner T, Simon HU. Calpain-mediated cleavage of Atg5 switches autophagy to apoptosis. *Nat Cell Biol*. 2006 Oct;8(10):1124-32. Epub 2006 Sep 24.

Yu L, Alva A, Su H, Dutt P, Freundt E, Welsh S, Baehrecke EH, Lenardo MJ. Regulation of an ATG7-beclin 1 program of autophagic cell death by caspase-8. *Science*. 2004 Jun 4;304(5676):1500-2. Epub 2004 May 6.

Yu PH, Zuo DM. Enhanced tolerance of neuroblastoma cells towards the neurotoxin 6-hydroxydopamine following specific cell-cell interaction with primary astrocytes. *Neuroscience*. 1997 Jun;78(3):903-12.

Z

Zarranz JJ, Alegre J, Gomez-Esteban JC, Lezcano E, Ros R, Ampuero I, Vidal L, Hoenicka J, Rodriguez O, Atares B, Llorens V, Gomez Tortosa E, del Ser T, Munoz DG, de Yebenes JG. The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia. *Ann Neurol*. 2004 Feb;55(2):164-73.

Zecca L, Stroppolo A, Gatti A, Tampellini D, Toscani M, Gallorini M, Giaveri G, Arosio P, Santambrogio P, Fariello RG, Karatekin E, Kleinman MH, Turro N, Hornykiewicz O, Zucca FA. The role of iron and copper molecules in the neuronal vulnerability of locus coeruleus and substantia nigra during aging. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Jun 29;101(26):9843-8. Epub 2004 Jun 21.

Zhang J, Price JO, Graham DG, Montine TJ. Secondary excitotoxicity contributes to dopamine-induced apoptosis of dopaminergic neuronal cultures. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998 Jul 30;248(3):812-6.

Zhu JH, Horbinski C, Guo F, Watkins S, Uchiyama Y, Chu CT. Regulation of autophagy by extracellular signal-regulated protein kinases during 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced cell death. *Am J Pathol*. 2007 Jan;170(1):75-86.

Zimmermann KC, Bonzon C, Green DR. The machinery of programmed cell death. *Pharmacol Ther*. 2001 Oct;92(1):57-70.

Zinszner H, Kuroda M, Wang X, Batchvarova N, Lightfoot RT, Remotti H, Stevens JL, Ron D. CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. *Genes Dev*. 1998 Apr 1;12(7):982-95.

Ziv I, Melamed E, Nardi N, Luria D, Achiron A, Offen D, Barzilai A. Dopamine induces apoptosis-like cell death in cultured chick sympathetic neurons--a possible novel pathogenetic mechanism in Parkinson's disease. *Neurosci Lett*. 1994 Mar 28;170(1):136-40.

Bibliografia

Zoccarato F, Toscano P, Alexandre A. Dopamine-derived dopaminochrome promotes H₂O₂ release at mitochondrial complex I: stimulation by rotenone, control by Ca²⁺, and relevance to Parkinson disease. *J Biol Chem*. 2005 Apr 22;280(16):15587-94. Epub 2005 Feb 14.

Zucca FA, Giaveri G, Gallorini M, Albertini A, Toscani M, Pezzoli G, Lucius R, Wilms H, Sulzer D, Ito S, Wakamatsu K, Zecca L. The neuromelanin of human substantia nigra: physiological and pathogenic aspects. *Pigment Cell Res*. 2004 Dec;17(6):610-7.

Zuo D, Yu PH. Increase of survival of dopaminergic neuroblastoma in co-cultures with C-6 glioma by R-(-)-deprenyl. *Prog Brain Res*. 1995;106:199-205.

3-MA	3-Metiladenina
5-HT	Serotonina
6-OHDA	6-hidroxidopamina
AIF	<i>Apoptosis inducing factor</i>
AR	Àcid retinoic
ATF	<i>Activating transcription factor</i>
ATG	<i>AuTophagy-related gens</i>
ATV	Area tegmental ventral
ATZ	<i>α1-antitrypsin Z</i>
BH	<i>BCL-2 homology</i>
BH ₄	Tetrahidrobiopterina
CaMKII	Quinasa II dependent de Ca ²⁺
C/EBP	<i>CCAAT/enhancer binding proteins</i>
CHOP/GADD153	<i>C/EBP homology protein/Growth-arrest DNA damage-inducible 153</i>
CMA	<i>Chaperone-mediated autophagy</i>
COMT	Catecol-O-metiltransferasa
CPY	Carboxipeptidasa Y
CVT	<i>Cytosol-to-vacuole-targeting</i>
DA	Dopamina
DAA	Descarboxilasa dels aminoàcids aromàtics
DACr	Dopaminocrom
DAPK	<i>Death-associated protein kinase</i>
DAT	Transportador de dopamina
DD	<i>Death domain</i>
DED	<i>Death effector domain</i>
DISC	<i>Death-inducing signaling complex</i>
DOPAC	Àcid dihidroxifenilacètic
DOPAL	3,4-dihidroxifenilacetaldehid
DRP1	<i>Death-associated related protein kinase 1</i>
EDEM	<i>ER degradation-enhancing α-mannosidase-like protein</i>
eIF2 α	<i>α-subunit of eukaryotic translational initiation factor 2</i>
ERAD	<i>Endoplasmic Reticulum-associated degradation</i>
ERSE	<i>Endoplasmic reticulum stress response element</i>
FBS	<i>Fetal bovine serum</i>
GAIP	<i>G-interacting protein</i>
GRP78	<i>Glucose-regulated protein 78</i>

Abreviacions

GSH	Glutatió
GUS	β -glucoronidasa
HIF	<i>Hypoxia-inducible factor</i>
HPLC	<i>High-Performance Liquid Chromatography</i>
HRE	<i>Hypoxia responsive element</i>
HVA	Àcid homovanílic
IAPs	<i>Inhibitors of apoptosis proteins</i>
IGF	<i>Insulin-like growth factor</i>
IRE1	<i>Inositol requirement 1</i>
IRS	<i>Insulin receptor substrate</i>
LB	<i>Lewy body</i>
LRRK2	<i>Leucine-rich repeat kinase 2</i>
LC3	<i>Microtubule-associated protein 1 light chain 3</i>
MAO	Monoamino-oxidasa
MES	Mitjana del error estàndard
MOMP	<i>Mitochondrial outer membrane permeabilization</i>
MPTP	<i>N-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridini</i>
MTT	<i>1-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-3,5-difenilformazan</i>
NAC	N-acetilcisteïna
NACP	Component no amiloide β /A4 de la malaltia d'Alzheimer
NM	Neruomelanina
OS9	Osteosarcoma 9
PARP-1	<i>Poly (ADP-ribose) polymerase-1</i>
PAS	<i>Pre-autophagosomal structure</i>
PD	<i>Parkinson's disease</i>
PE	<i>Phosphatidylethanolamine</i>
PI3K	<i>Phosphatidylinositol 3-phosphate kinase</i>
PINK1	<i>Phosphatase and tensin homolog (PTEN)-induced putative kinase 1</i>
PKA	<i>Protein kinase A</i>
PKC	<i>Protein kinase C</i>
PLD2	Fosfolipasa D2
PtdIns	<i>Phosphatidylinositol</i>
RE	Reticle endoplasmàtic
RNS	<i>Reactive nitrogen species</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
SAM	S-adenosilmetionina

SNC	Sistema nerviós central
SNpc	<i>Substantia nigra pars compacta</i>
SOD	Superòxid dismutasa
tBOOH	Tert-butilhidroperòxid
TCP	Tranilcipromina
TGN	<i>Trans-Golgi network</i>
TSC2	<i>Tuberous sclerosis complex 2</i>
TH	Tironisa hidroxilasa
UCH-L1	<i>Ubiquitin C-terminal esterasa L1</i>
UP	<i>Unfolded proteins</i>
UPR	<i>Unfolded protein response</i>
UPS	<i>Ubiquitin proteasome system</i>
VMAT	Transportadors vesiculars de monoamines
XBP1	<i>X-box binding protein 1</i>
XTP3B	<i>XTP3-transactivated gene B</i>

