

DISCUSSIÓ

I. ESTUDI DE LES INTERACCIONS DE L' α -SINUCLEÏNA

En la majoria de malalties neurodegeneratives la mort neuronal es produeix de forma gradual i progressiva, sense que les neurones degenerades deixin cap rastre del procés de mort. Tot i així, existeixen unes malalties que juntament amb la pèrdua progressiva de neurones, presenten acumulacions de proteïnes o inclusions (Trojanowski i col., 1998). Així, la investigació d'aquestes estructures igual com de la seva composició bioquímica, ens donarà pistes per entendre els processos patològics que governen aquests desordres degeneratius.

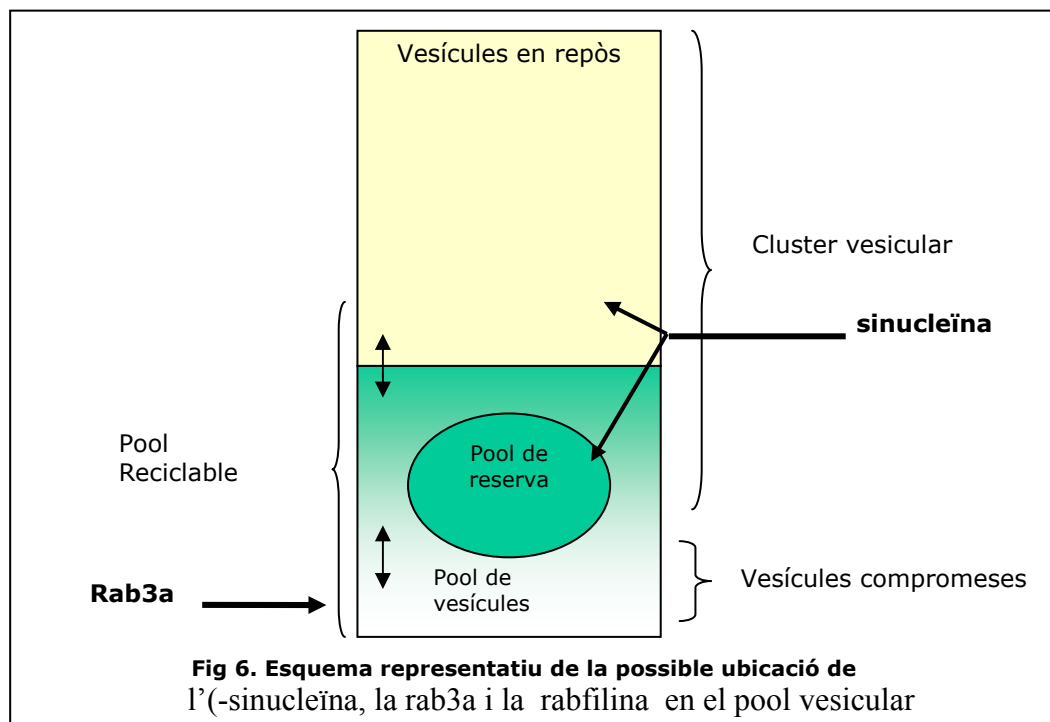
El grup de malalties que centra el nostre treball són les sinucleïnopaties, i més que estudiar les malalties en sí, n'hem estudiat la proteïna que les caracteritza i que fa de nexa comú a totes elles: l' α -sinucleïna, la qual en condicions patològiques, es localitza en unes inclusions citoplasmàtiques anomenades cossos de Lewy.

Les sinucleïnopaties presenten mort neuronal de poblacions molt concretes de neurones, mentre que els cossos de Lewy es localitzen en altres àrees del cervell, per tant cal trobar quins són els mecanismes que relacionen els processos de mort neuronal amb la formació dels cossos de Lewy. Per tal d'abordar l'estudi del paper de l' α -sinucleïna hem tingut en compte dues propietats de la proteïna: la seva presència majoritària en les terminals pre-sinàptiques (Jensen i col., 1998; Davidson i col., 1998; Murphy i col., 2000; El-Agnaf i col., 1998; Cabin i col., 2002; Abeliovich i col., 2000) d'una banda, i la capacitat d'unir-se a moltes proteïnes diferents per l'altra. (fig3 de la introducció; Clayton i George, 1999; Engelender i col., 1999; Lücking i Brice, 2000; Jensen i col., 1999; 2000; Ferrer i col., 2001; Lee i col., 2001; Sharon i col., 2001; Payton i col., 2001; D'Andrea i col., 2001; Wakabayashi i col., 2002; Alim i col., 2002). Així vam iniciar l'estudi de les interaccions proteiques utilitzant la tècnica d'array d'anticossos amb mostra procedent de pacients amb Demència amb cossos de Lewy. Curiosament, vam trobar la interacció de l' α -sinucleïna amb la proteïna sinàptica rab3a, corroborada més endavant amb les tècniques d'immunoprecipitació i de pull-down.

El fet que aquesta interacció es doni només en condicions patològiques i no en condicions control encaixava perfectament amb els resultats obtinguts fins el moment amb ratolins *knock-out* tan per l' α -sinucleïna (Cabin i col., 2002) com per la rab3a (Geppert i col., 1994), amb la que també s'havien fet estudis en cucs de terra observant-se resultats similars (Nonet i col., 1997): coincidien els fenotips dels *knock-out* d'ambdues proteïnes. Donats els següents resultats i tenint en compte que un dels efectors de Rab3a és la rabfilina (Südhof, 1997; Schlüter i col., 1999; Ostermeier i col., 1999; Sthali i col., 1996), calia veure si aquesta unió resultava afectada per la presència d' α -sinucleïna en condicions patològiques. I efectivament, en els casos amb demència amb cossos de Lewy no vam detectar la interacció de rab3a amb la seva proteïna efectora, mentre que

en condicions control tan la rab3a com l' α -sinucleïna interaccionen amb la rabfilina. Així doncs l' α -sinucleïna entraria a formar part del sistema sinàptic a nivell del grup de vesícules sinàptiques de reserva o *pool* de reserva. Ja se sabia que els ratolins *knock out* per l' α -sinucleïna mostraven un *pool* de reserva disminuït, i que, després d'estimulació, els costava tornar a tenir un conjunt de vesícules preparades per a l'alliberament. De manera que, després d'estimulacions repetides, hi havia una depleció ràpida de vesícules, amb el consegüent augment de la depressió sinàptica (Cabin i col., 2002). Curiosament, en ratolins *knock out* per a rab3a la mida del *pool* de vesícules alliberables era normal, però la fusió de les vesícules induïda per calci estava alterada (Geppert i col., 1994), arribant també a un augment en la depressió sinàptica. Per tant, sí que podia existir una col.laboració d'ambdues proteïnes durant el procés d'exocitosi. A més donat que l'efector de rab3a, rabfilina, interacciona també amb l' α -sinucleïna en condicions control, hem proposat que aquesta faci de pont entre les dues proteïnes, dins del *pool* sinàptic de reserva. Sí que és cert que l'eliminació de la rabfilina sembla que no té efectes aparents en la transmissió sinàptica, (Schlüter i col., 1999), però com que no s'han fet estudis d'estimulacions repetides en ratolins *knock out* per a la rabfilina, no es pot descartar el paper d'aquesta en l'exocitosi a llarg termini.

En la demència amb cossos de Lewy, s'ha observat interacció de rab3a amb l' α -sinucleïna, no només amb la forma de 17 kDa, sinó que també hem observat interacció amb la de 36 kDa, que podria correspondre als dímers ja descrits d' α -sinucleïna (Khrisnan i col., 2003) i amb altres espècies d' α -sinucleïna de pes molecular més elevat, 66kDa, concretament. Aquesta última interacció és de vital importància donat que ja estan descrites unes formes d' α -sinucleïna d'elevat pes molecular, corresponent a la forma patològica agregada present en les patologies amb cossos de Lewy (Iwatsubo i col., 1996; Campbell i col., 2000; Harding i col., 2001; Sharon i col., 2003), i per tant, s'implica directament la forma anòmala de l' α -sinucleïna amb les proteïnes sinàptiques rab3a i rabfilina. També és cert que els resultats obtinguts semblen mostrar discrepàncies respecte les espècies d' α -sinucleïna que interaccionen amb rab3a. Però si s'analitza el fonament de les tècniques utilitzades veurem com sí que és possible que es detectin amb els 2 mètodes bandes d' α -sinucleïna de pes mol.lecular diferents.



La tècnica de pull-down és bàsicament un estudi de les interaccions *in vitro*, mentre que la immunoprecipitació permet l'estudi de les interaccions complexes de les proteïnes que ja estan en el medi, i no descarta la unió amb altres proteïnes (Sharon i col., 2003). El segon punt a tenir en compte és que rab3a formi part dels agregats dels cossos de Lewy, donat que en els estudis d'interacció que hem dut a terme s'hi han identificat varies espècies d' α -sinucleïna, des de la forma soluble de 17 kDa, a diferents formes d'agregació. En el context en què situem la interacció sinucleïna-rab3a-rabfilina no descartem que hi hagi altres proteïnes que també hi puguin interaccionar, o que quedin atrapades per les formes anòmales d' α -sinucleïna. El que sí que hem demostrat és que les interaccions d' α -sinucleïna amb rab3a i amb rabfilina en demència amb cossos de Lewy difereixen de les trobades en cervell control, i que probablement les interaccions anòmales depenguin de la formació d'agregats d' α -sinucleïna.

Les interaccions trobades en córtex de cervell humà vam poder corroborar-les amb un model de ratolí transgènic, concretament el Tg5093 prèviament descrit (Gómez-Isla i col., 2003). Aquest ratolins expressaven, a part de l' α -sinucleïna endògena, una forma mutada A30P d' α -sinucleïna humana. Amb aquest estudi hem demostrat que només la forma A30P mutada de l' α -sinucleïna interacciona amb les proteïnes sinàptiques rab3a, rab5 i rab8. I tot i que els ratolins transgènics expressen 15 vegades més l' α -sinucleïna, la interacció esmentada no depèn de la quantitat de proteïna, tal com hem demostrat amb els experiments *in vitro* utilitzant α -sinucleïna recombinant. Igual com vam fer amb

els experiments en humans, també hem corroborat els experiment de pull down mitjançant la immunoprecipitació, amb la qual hem trobat un cop més, només la interacció de l' α -sinucleïna mutada amb rab3a. El fet que l' α -sinucleïna anòmala interaccioni amb rab3a, rab5 i rab8 tan en humans com en ratolins, podria tenir els seus efectes en la generació de la toxicitat per dopamina. Primerament i tenint en compte la interacció de l' α -sinucleïna amb rab5, està demostrat que les cèl.lules que expressen la forma mutada de l' α -sinucleïna són més sensibles a diferents insults tòxics (Lee i col., 2001) i poden tenir més susceptibilitat a la toxicitat dopaminèrgica (Tabrizi i col., 2000; Galvin i col., 2001; Goedert i col., 2001). A més a més, la captació defectuosa de la dopamina en vesícules, deguda a un mal funcionament de l' α -sinucleïna, portaria conseqüentment a la formació d'espècies reactives d'oxigen al citoplasma, participant també en la degeneració de les neurones dopaminèrgiques (Lotahrius i col., 2002). I finalment existeix un estudi que involucra rab5 en l'endocitosi de l' α -sinucleïna i de dopamina (Sung i col., 2001). D'aquesta manera, doncs, la interacció de Rab5 amb la forma mutada de l' α -sinucleïna conduiria a una endocitosi anormal dels neurotransmissors, incrementant la toxicitat per dopamina en la pars compacta de la substància negra de les neurones.

D'altra banda, i pel què fa a Rab8, que participa en la xarxa de transport trans-Golgi de la membrana plasmàtica (Zerial i col., 2001), la seva interacció amb la forma mutada de l' α -sinucleïna, tindria conseqüències en el trànsit de l' α -sinucleïna al citosol. Curiosament, i en alguns models d'animals transgènics, inclòs el que en aquest treball ens ocupa, la forma d' α -sinucleïna mutada es transloca la citosol (Gómez-Isla i col., 2003). Tot i que segurament hi ha moltes altres proteïnes implicades en el procés, podria ser que rab8 participés en la deposició de l' α -sinucleïna al citoplasma. Per tant, amb aquests dos estudis, complementaris l'un de l'altre, podem explicar dos aspectes de la patologia en humans: d'una banda la degeneració de les neurones dopaminèrgiques de la substància negra amb les conseqüents alteracions sinàptiques que això comporta i que s'han observat en les DLBs, i la localització citoplasmàtica de l' α -sinucleïna, que és on s'han localitzat els agregats patològics de les sinucleïnopaties.

L'MSA en les sinucleïnopaties

Fins aquí tenim caracteritzada una interacció de l' α -sinucleïna en una patologia de córtex, que és on majoritàriament es troben els cossos de Lewy típics de la alteració neurològica. Però, es pot esperar el mateix comportament en una patologia on els agregats d' α -sinucleïna presenten una morfologia diferent dels cossos de Lewy i aquests es troben principalment en oligodendròcits, com és l'atròfia multisistèmica (MSA) ?

Doncs, segons els nostres experiments les interaccions de l' α -sinucleïna amb rab3a es repeteixen, tot i que l'MSA està classificada com a una sinucleïnopatia a part pel fet de tenir les inclusions de sinucleïna en substància blanca. La repetició dels experiments en córtex i en cerebel de pacients amb MSA demostren un mecanisme únic d'alteració sinucleïnopàtica. Aquests resultats concordarien amb uns estudis immunohistoquímics recents en els quals s'observa acumulació d' α -sinucleïna no només en els GCIs sinó també en els filaments del neuròpil del diencèfal i en el tronc de l'encèfal així com en el córtex i tàlem (Nishie i col., 2004). Així, tot i que s'acumula α -sinucleïna anormal de forma majoritària en les cèl.lules glials, aquesta també s'acumula en altres regions del cervell, implicant tan les neurones com la glia en les alteracions observades en l' MSA. Per tant, les interaccions d'altres proteïnes amb la forma anòmala de la sinucleïna en aquest cas també seria un mecanisme possible, igual que el trobat en altres malalties neurodegeneratives amb agregats proteics (Lee i col., 2000), i ens farien pensar en un mecanisme comú de neurodegeneració i d'alteració sinàptica dins del conjunt de les sinucleïnopaties.

II. ALTERACIONS DELS RECEPTORS METABOTRÒPICS DEL GLUTAMAT EN LA DEMÈNCIA AMB COSSOS DE LEWY

De moment hem basat les explicacions de les alteracions sinàptiques de les sinucleïnopaties en les neurones dopaminèrgiques, que es sap sobradament de la seva degeneració en la substància negra, dins del context de la malaltia de Parkinson, la sinucleïnopatia més estudiada. Dins d'aquesta mateixa patologia, i deixant de banda la transmissió dopaminèrgica, existien evidències d'alteracions en la transmissió glutamatèrgica, concretament els experiments referits als receptors metabotròpics del glutamat (mGluRs) (Smith i col., 2000; Valenti i col., 2003; Bradley i col., 2000; Breyse i col., 2002; Ossowska i col., 2003; Felley i col., 2003; Pisani i col., 2003). En canvi, en córtex de les DLBDs es desconeix pràcticament el paper d'aquests receptors, i és precisament aquest aspecte el que vam decidir estudiar.

A partir d'experiments de *binding* realitzats en córtex de pacients amb DLBD, tan de la forma pura com la forma comú, hem trobat alteracions específiques en la unió del glutamat als mGluRs, concretament els del Grup I i II igual com canvis en el nivell d'expressió dels receptors. I no només vam trobar alteracions en aquest receptors, sinó també en una de les seves proteïnes efectores, com és la PLC β 1. Concretament disminució tan en els nivell d'expressió de la proteïna, com en la seva activitat, també en la forma pura i en la forma comú de les DLBDs. Així doncs, la transmissió del senyal a partir dels mGluRs es veuria alterada en córtex cerebral de les DLBDs.

Donat que a la malaltia d' Alzheimer també s'havia observat un patró de *binding* anormal del glutamat en la regió CA1 de l' hipocamp (Dewar i col., 1991) i una disminució tan en l'activitat com en els nivells d'expressió de la PLC β_1 i de PKC (Cowburn i col., 2001; Young i col., 1999), es podria arribar a pensar que les alteracions observades a la DLBDc eren degudes bàsicament al l'efecte de l'Alzheimer en la patologia. Però també s'han observat alteracions dels mGluRs en les DLBps. Mentre que en aquestes hi ha un augment en l'expressió dels mGluRs, en la forma comú de la malaltia hi ha una disminució en l'expressió d'aquests receptors. O sigui que hi hauria un mecanisme d'afectació general d'aquests receptors en les DLBs no associat a la malaltia d' Alzheimer. En la PLC β_1 també s'han trobat anomalies, tan a nivell d'expressió com a nivell d'activitat, en aquest cas una disminució d'ambdues propietats. Tres fets claus ens van animar a estudiar la interacció de la PLC β_1 amb l' α -sinucleïna. D'una banda els estudis d'interacció de l' α -sinucleïna amb les proteïnes sinàptiques rab3a i rabfilina esmentades anteriorment amb la seva repercussió en la sinapsi. En segon lloc uns experiments en línies cel.lulars que demostraven la inhibició per part de l' α -sinucleïna de l'activitat de la PLD (Ahan i col., 2002), PLD1 (Chen i col., 1997) i PLD2 (Colley i col., 1997), implicades en la biogènesi de vesícules. I en tercer lloc la capacitat intrínseca de l' α -sinucleïna de formar agregats amb diferents proteïnes en les sinucleïnopaties (Iwatsubo i col., 2003; Baba i col., 1998). Així doncs estudis d'immunoprecipitació ens demostren que l' α -sinucleïna interacciona amb la PLC β_1 en el córtex de cervells control i d'una forma molt més lleu en córtex de pacients amb DLBDs. Curiosament, la fosforilació de l' α -sinucleïna en Ser¹²⁹ impedeix la interacció d'aquesta amb la PLD (Pronin i col., 2000). Cal esmentar que tan en les DLBDs com en PD l' α -sinucleïna està nitrada i fortament fosforilada en la Ser¹²⁹ (Duda i col., 2000; Giasson i col., 2000) i que la fosforilació de l' α -sinucleïna promou la formació de fibril·les (Fujiwara i col., 2003; Iwatsubo i col., 2003). Així, probablement degut a l'excés de fosforilació de l' α -sinucleïna en condicions patològiques, la interacció amb la PLC β_1 seria més lleu.

A més, i donada la manca d'interacció d'ambdues proteïnes en condicions patològiques, podria ser que la PLC β_1 , igual com moltes altres proteïnes, estigués formant part dels agregats insolubles d' α -sinucleïna. I efectivament, en els casos amb DLBD, la PLC β_1 localitza amb la forma més agregada de l' α -sinucleïna, i també la més patològica. També hem pogut comprovar la implicació de la PLC β_1 en les DLBDs immunohistoquímicament, localitzant-se en els cossos de Lewy i en les neurites de Lewy. Per tant, tots aquests resultats indiquen, que un dels efectors del mGluRs, la PLC β_1 tindria tan l'activitat com l'expressió disminuïda en les DLBDs, i que per aquest motiu la transmissió del senyal mediada pels mGluRs en resultaria afectada en aquest grup de patologies. De fet, està descrit ja el paper de modulador tan de l'excitabilitat com de la transmissió sinàptica dels

mGluRs, i la implicació de la PLC β_1 en les vies inhibidores del cervell (Böhm i col., 2002; Kim i col., 1997; Rhee i col., 2001). També es coneix que els mGluRs acceleren la taxa de processament de la proteïna precursora amiloide (APP) a la forma no amiloidea (Hölscher i col., 1998; Jolly-Tornetta i col., 1998; Lee i col., 1996) de manera que una disminució en la seva activitat, com la que hem trobat en les DLBc facilitaria els dipòsits d'amiloide característics també d'aquesta patologia. Alternativament, els dipòsits d'amiloide podrien participar a disminuir l'activitat dels mGluRs. Per tant, i coneixent les alteracions sinàptiques típiques de les DLBs, conseqüència en part de les alteracions en la transmissió del senyal mediada pels mGluRs, ens farien proposar els mGluRs com a possible diana terapèutica per al tractament d'aquestes patologies.

III. L'ESTRÈS OXIDATIU EN LES SINUCLEÏNOPATIES

Com ja hem esmentat al llarg de la introducció, l'estrès oxidatiu és un dels factors que contribueixen a l'afectació de les sinucleïnopaties. Concretament, l'efecte que més es coneix és el de la dopamina i en particular, són els productes procedents de la seva oxidació els que resultarien tòxics per al seu entorn cel.lular, afectant-lo a tots els nivells: lípids, proteïnes i ADN. Nosaltres hem estudiat l'estrès oxidatiu utilitzant dues vies diferents: Una d'elles és la que ens aporta l'estudi del model dels animals transgènics per la forma mutada de l' α -sinucleïna A30P (Tg5093)(Gómez-Isla i col., 2003), els quals han estat tractats amb rotenona i MPTP, l'efecte dels quals, en la producció de radicals lliures, està bastant estudiada. L'altre via d'investigació de l'estrès oxidatiu ha estat a través de la quantificació dels productes resultants d'oxidació proteica, lipídica i de glicosilació, així com l'efecte biològic del RAGE (*Receptor for advanced-glycation-end-products*) en la malaltia de Parkinson i en la malaltia d'Alzheimer, per tal d'aprofundir en altres aspectes a part de la generació de radicals lliures, que podrien ser també de vital importància per a l'estudi general de les demències.

Així doncs, i començant pel model murí, hem observat canvis en la solubilitat de l' α -sinucleïna en els homogenats de cervell de ratolí, tan pels animals transgènics com pels que presentaven la forma mutada A30P de l' α -sinucleïna, quan aquests animals han estat tractats amb MPTP o rotenona. De fet, els nostres resultats no fan més que complementar uns estudis ja existents respecte la capacitat d'agregació de l' α -sinucleïna tan en ratolins com en sangoneres, en els que prèviament se'ls havia administrat MPTP (Kowal i col., 2000; Vila i col., 2000). De forma semblant els resultats obtinguts vénen avalats per un estudi en el que es demostra que l' α -sinucleïna augmenta la capacitat d'agregació després del tractament amb rotenona (Sherere i col., 2002). Però així com aquest compostos indueixen més agregació en l' α -sinucleïna, sembla que no tenen cap

efecte en la interacció d'aquesta amb cap de les proteïnes sinàptiques estudiades. De manera que no és l'efecte del tòxic el que altera la interacció de la sinucleïna amb les proteïnes sinàptiques rab3a, rab5 i rab8, sinó que és la mutació en sí, en aquest cas, o canvis en l'estructura de l' α -sinucleïna els que tindrien el seu efecte en les alteracions en el model sinàptic.

Tot i que ni l'MPTP ni la rotenona tenen efecte en la forma mutada de l' α -sinucleïna, la forma mutada sí que afecta a la vulnerabilitat dels ratolins vers l'efecte de l'MPTP i la rotenona. Els resultats encara no estan publicats, però està demostrat que la línia de ratolins tg5093 són més vulnerables a l'efecte de l'MPTP, que els ratolins no transgènics. A més, aquests presenten una taxa més elevada de mortalitat, i una pèrdua més important de neurones dopaminèrgiques a la *pars compacta* de la substància negra. A part de la seva participació en la sinapsi, l' α -sinucleïna també es caracteritza, i molt, per la capacitat d'agregar-se en condicions patològiques, i aquesta agregació pot culminar en la formació dels cossos de Lewy. Aquestes estructures poden venir donades o bé per manca de degradació degut a que l'agrupació anòmala de proteïnes és tal, que el sistema ubiquitina-proteosoma és incapaç de reconèixer-les, o bé per un mal funcionament del sistema proteosomal *per se* o induït per la forma mutada de l' α -sinucleïna (Tanaka i col., 2001), o bé perquè l'estrès proteolític que predomina a la cèl.lula és tan important, que les proteïnes s'agrupen al voltant del centrosoma de la mateixa manera que es formarien els agregomes (Johnston i col., 1998; Wigley i col., 1999; Kopito, 2000). Malauradament no podem descartar cap de les hipòtesis respecte els efectes de l'MPTP i de la rotenona en la formació d'aquests agregats, donat que l'estrès oxidatiu generat per la seva acció pot afectar de forma negativa als tres mecanismes, ja sigui potenciant l'oxidació de l' α -sinucleïna, i per tant la seva agregació, com que l'estrès oxidatiu generat afecti l'estructura i funcionalment de la maquinària de degradació del proteosoma, o que, finalment, davant l'estrès oxidatiu generat, la cèl.lula opti per formar agregomes per evitar la toxicitat de les proteïnes no degradades, i que, en excés, resulten tòxiques per a la supervivència cel.lular. De fet, el procés d'agregació és el resultat de la coincidència de moltes causes diferents, des de l'alteració de l'estructura de la pròpia sinucleïna, sumat als efectes de l'estrès oxidatiu provocat per l'autooxidació de la dopamina i per altres molècules, a un mal funcionament de la maquinària proteosomal, i també hi ha qui postula la implicació dels lisosomes (Meredith i col., 2002). Per tant, intentar trobar un únic culpable d'un mecanisme que pot ser una causa o conseqüència o ambdós alhora, d'un procés tan general com sembla ser el de les sinucleïnopaties és un greu error i cal que anem unint diferents disciplines d'investigació si volem trobar l'entrellat d'aquest batibull neurodegeneratiu. D'aquesta manera, doncs, vam enfocar l'investigació de l'estrès oxidatiu a partir d'un altre angle diferent al de l'estudi de la formació dels radicals

lliures, com és el de la quantificació de productes resultants d'alteracions oxidatives patides per lípids, glúcids i proteïnes a dues de les demències més comuns com són la malaltia de Parkinson (PD) i la malaltia d'Alzheimer (AD).

Tots els estudis d'estrès oxidatiu de PD vénen referits a la substància negra. També aquells que analitzen altres paràmetres diferents de la producció de radicals lliures. Per exemple l'augment descrit en la peroxidació lipídica (Dexter i col., 1989-94; Yoritaka i col., 1996; Shelley, 1998) així com el dels àcids grassos poliinsaturats (PUFAs) (Dexter i col., 1986), el malondiladehid i els hidroperòxids (Jenner, 1991; -98), igualment l'increment de l'oxidació proteica evidenciada pels grups carbonil de les proteïnes (Alam i col., 1997a; Floor i col., 1998) i la presència dels productes derivats de la glicosilació avançada o AGEs (Castellani i col., 1996). Per tal de determinar si és realment a la substància negra on s'inicien les alteracions oxidatives o si, d'altra banda, representa un estadi avançat del procés oxidatiu, vam decidir estudiar l'efecte de l'estrès en altres regions del cervell, concretament el córtex, de pacients amb estadis molt primerencs de la malaltia de Parkinson sense cap tipus de simptomatologia i per tant, no sotmesos a tractament anti-parkinsonià. L'únic criteri de classificació d'aquests pacients fou el diagnòstic *post-mortem*, que neuropatològicament es caracteritzava per la presència de pocs cossos de Lewy i neurites de Lewy en l'amígdala i en els nuclis basals de Meynert igual com en l'hipocamp. Aquest pacients no presentaven tampoc cap altra alteració neuropatològica com plaques amiloidees o filaments del neuròpil, típics de la malaltia d'Alzheimer i que en determinades ocasions presenten els malalts de Parkinson.

Utilitzant la tècnica de cromatografia de gasos acoblada a espectrometria de masses es van estudiar els compostos que caracteritzen alteracions oxidatives a proteïnes, lípids i glúcids. També s'han realitzat estudis de western blot per als productes de glicosilació avançada i els seus receptors (AGE i RAGE respectivament) així com també dels grups carbonils reactius a DNP. En la malaltia de Parkinson no s'observen alteracions en els productes derivats de l'MCO, tot i que per western blot sembla que hi ha un augment en els carbonils reactius a DNP. Aquesta discrepància pot ser deguda a que la DNP reacciona de forma inespecífica amb els productes derivats de la lipoxidació (Berlett i Stadman, 1997), representats per l'MDAL, que sí que estan augmentats en aquesta patologia. Per tant, no hi hauria oxidació proteica en estadis primerencs de la malaltia de Parkinson. Els nostres resultats contrasten amb els obtinguts per Alam i col., els quals obtenen un augment de productes reactius a DNP, representatius d'oxidació proteica, en pacients de Parkinson, quan ho comparen amb pacients de DLB incidental, que es correspon amb un estadi primerenc de la malaltia de Parkinson (Alam i col., 1997a). Contràriament als nostres pacients, els PD estaven tractats amb L-dopa, i donat que en el nostre cas els pacients no estan sotmesos a tractament, podem concloure que l'augment en els

carbonils reactius a DNP observat per Alam i col. és degut a la L-Dopa, més que a l'oxidació proteica *per se*. La malaltia d'Alzheimer, en canvi, presenta alteracions oxidatives a tots els nivells: tan oxidació proteica representada per els GSA, els AAA i també la reactivitat dels carbonils a DNP, com lipoxidació representada per l'MDAL. De fet, els resultats obtinguts en el nostre estudi no fan més que corroborar altres estudis realitzats en AD que demostren alteracions oxidatives de proteïnes com la creatina quinasa BB, la glutamina sintasa, la ubiquitin carboxi-terminal hidrolasa L-1 (UCH-L1), l' α -enolasa, la proteïna d'estrès HSP 71 i la DRP2 (Castegna i col, 2002; Cechi i col, 2002) i que es podrien correspondre amb les bandes immunoreactives a DNP obtingudes per western blot. Concretament la creatina kinasa BB i la glutamina sintasa podrien situar-se en la regió d'entre 35-55 kDa, mentre que en la regió compresa entre 55 i 60 kDa hi podríem situar la heat-shock cognate 71 i la DRP2. A més l'augment significatiu tan de AASA com de GSA en AD, podria venir donat en part per alteracions mitocondrials que promourien l'alliberament d'espècies reactives d'oxigen que augmentarien de forma considerable l'oxidació proteica (Mark i col., 1997). Les concentracions de CEL i CML, anomenats també AGEs i resultants de glicoxidació/lipoxidació no enzimàtica també estan augmentades en aquesta patologia, però es desconeixen les dianes concretes, de manera que, tot i que el patró de bandes difereix de l'obtingut amb anti-DNP, no podem descartar que hi hagi altres proteïnes modificades pels AGEs. Igualment es coneix que en AD, la modificació per AGE és freqüent en pacients amb mutacions a la presenilina (Palmer, 1999), a més trobar-se aquest productes en plaques senils i amb neurofilaments del neuròpil (Kimura i col., 1998; Thornalley i col., 1999; Van Muiswinkel i col., 1999). A la malaltia de Parkinson, en canvi, els nivells de CEL estan disminuïts, tret que a primera vista pot semblar contradictori, però que té l'explicació en l'origen d'aquest compost, que és sobretot la glucòlisi (Ahmed i col., 2001;-03), i que podria estar disminuïda a la malaltia de Parkinson, i per tant es correspondria amb la disminució obtinguda dels CEL.

D'altra banda els pacients de PD, comparats amb els controls, també presenten un increment en l'expressió del RAGE. Curiosament, estudis immunohistoquímics descriuen un augment en la reactivitat del seu lligand, els AGE, en DLBD (Castellani i col., 1996). Per tant, les diferències en la sensibilitat dels mètodes utilitzats per a detectar la immunoreactivitat, ens permeten estudiar els increments del RAGE amb la progressió de la patologia de l' α -sinucleïna quan es compara DLB amb PD.

En els córtex de pacients amb AD també s'observa un increment en la immunoreactivitat de RAGE, corroborant el paper d'aquest receptor multiligand en la patogènesi de la malaltia d'Alzheimer (Brett i col, 1993; Schmidt i col., 1999, 2000). En els controls gairebé no s'observa immunoreactivitat per a RAGE, o bé s'aprecia només una banda de

30 kDa aproximadament, que podria correspondre a una variant de RAGE resultant de l'*splicing* alternatiu identificada recentment en astròcits i en cèl.lules sanguínies mononuclears (Park i col., 1999). La manca d'expressió constitutiva en pacients control està d'acord amb les diferències d'expressió interindividuals descrites per a la proteïna (Park i col., 1999). En condicions patològiques, en canvi, apareixen bandes de diferent pes mol.lecular tan a PD com a AD, tot i que en aquest últims apareixen més bandes immunoreactives a RAGE. Ambdues patologies presenten 2 bandes comuns d'immunoreactivitat per RAGE. En primer lloc la banda corresponent a la forma sencera de la proteïna de 55 KDa. En segon lloc s'observa una banda d'aproximadament 46 KDa que podria correspondre o bé a una isoforma mancada de glicosilació descrita en cèl.lules endotelials d'aproximadament 46 KDa, o bé a una isoforma de RAGE truncada en l'extrem C-terminal d'un pes mol.lecular aproximat de 50 KDa (Yonekura i col., 2003). D'altra banda però, en la malaltia d'Alzheimer apareix també una banda al voltant dels 35 KDa, que podria correspondre a la regió N-terminal de la proteïna ja descrita en cervell humà (Sasaki i col., 2001). No coneixem la importància en l'expressió de les diferents isoformes d'aquesta proteïna, però sí que representa la resposta dels RAGE als diferents lligands o AGE, i en al cas d'AD, també de la seva unió amb el pèptid A β . Per exemple està descrit que l'expressió de la forma truncada en C-terminal és citoprotectiva en les cèl.lules endotelials (Yonekura i col., 2003) i per tant la seva expressió vindria a ser un mecanisme de defensa. En canvi, l'expressió de la forma sencera contribuiria a l'acceleració de la mort neuronal a través de l'activació de la resposta inflammatòria (Yan i col., 1994-96), i/o en el cas d'AD, de l'acumulació del pèptid A β en el parènquima cerebral (Deane i col., 2003). A més existeixen dades recents que impliquen el RAGE en una nova via patogènica en la qual activaria crònicament les cèl.lules del sistema immunitari perifèric (Mruthinti i col., 2004).

Els nivells dels àcids grassos també estan alterats en AD i en PD. En PD la concentració de PUFAs, concretament de l'n-3 àcid docosahexanoic (DHA). De manera que per extensió podem suggerir un augment en el grau d'insaturació de la membrana plasmàtica de les neurones de córtex. Recentment s'ha descrit la interacció de l' α -sinucleïna amb els àcids grassos, particularment amb les PUFAs, tan en condicions normals com en condicions patològiques (Sharon i col., 2001;-03a;-03b). Concretament, els PUFA i el DHA en particular té un paper de regulació directe en l'estat d'ensamblatge de l' α -sinucleïna, i a més, sembla que els nivells de PUFA vinguin regulats per la interacció d'aquests amb l' α -sinucleïna, en tan que aquesta actuaria com a una proteïna específica portadora d'àcids grassos. L' α -sinucleïna podria estar directament implicada en el manteniment del nivell vesicular neuronal, a partir de la regulació dels nivells de PUFAs. Dins d'aquest context, els resultats obtinguts en el nostre estudi reforcen la

relació entre els PUFA i la capacitat de l' α -sinucleïna de formar oligòmers, que estaria augmentada en la malaltia de Parkinson, i amb l'estat de progressió de l'esmentada malaltia. Pel què fa als resultats en la concentració dels PUFAs en AD, aquests concorden amb els descrits fins ara en substància gris de pacients d'Alzheimer (Soderberg i col., 1991). Per tant, ambdues patologies aquí estudiades vindrien caracteritzades també per alteracions en el metabolisme dels àcids grassos que podrien ser degudes a alteracions en el metabolisme del transport dels àcids grassos essencials (Farooqui i col., 2001; Rapoport i col., 2001). De totes maneres però, també poden ser producte d'un mecanisme de defensa, ja que s'ha descrit el paper neuroprotectiu del DHA en models experimentals, però l'impacte final en la patologia seria negatiu, en tan que el DHA és un àcid gras fàcilment peroxidable (Barcelo-Coblijn i col., 2003; Favreliere i col., 2003). Els residus del PUFAs en general són molt sensibles a oxidació. Cada fosfolípid de cada membrana cel·lular conté un residu d'àcid gras insaturat. La majoria d'aquests estan poliinsaturats i la presència d'un grup metil entre entre dos dobles enllaços fa que l'àcid gras sigui sensible a alteracions induïdes per ROS, de manera que la sensibilitat a oxidació dels PUFAs augmenta en funció dels dobles enllaços que tingui per mol·lècula (Bielski i col., 1983). En conseqüència l'elevada concentració de PUFAs en els fosfolípids del cervell no només els fa més sensibles a agents oxidants sinó que també els fa que participin en reaccions llargues de radicals lliures. La peroxidació lipídica genera hidroperòxids i endoperòxids, els quals es fragmenten per donar un ampli ventall d'intermediaris reactius com els alcanals, alquenals, hidroxialquenals, glixal i malondialdehid. Aquests compostos carbonil poden reaccionar principalment amb els residus de lisina, arginina i cisteïna i formar compostos indicadors d'estrès oxidatiu proteic *in vivo*. D'aquesta manera queda justificat l'augment d' MDAL en la malaltia de Parkinson. Donat que els residus de lisina són relativament abundants en l' α -sinucleïna, igual com l'índex de peroxidació en la malaltia de Parkinson, suggerim que les modificacions no enzimàtiques de l' α -sinucleïna, particularment les alteracions proteiques derivades de la peroxidació, tindrien un paper important en la nucleació dels agregats proteics, tal com es suggerix per els AGE en la DLB incidental (Munch i col., 2000). La malaltia d'Alzheimer no es caracteritza pels cúmuls d' α -sinucleïna, sinó per l'acumulació del pèptid A β . Donat que una de les fonts d'aquest pèptid està en el metabolisme del colesterol (Cutler i col, 2004), la redistribució dels àcids grassos seria un mecanisme patogènic clau en la progressió de la malaltia d'Alzheimer.

La proteïna β -amiloide en DLBDs

Al llarg dels treballs exposats hem anat demostrant amb experiments molt concrets que la neurodegeneració que semblaria típica de cada malaltia, segueix una patrons idèntics

en els diferents models patològics. Així, dins les sinucleïnopaties, cada una amb els seus trets diferencials, compartirien un mateix mecanisme, ja sigui a nivell d'interacció amb proteïnes sinàptiques, o amb alteracions en el sistema de degradació proteica, com en els mecanismes responsables de l'estrès oxidatiu. Un exemple més d'aquesta integració de mecanismes neurodegeneratius seria el protagonitzat per la deposició amiloidea del pèptid $\beta 4$ en córtex cerebral de pacients amb DLB. Concretament, en aquests pacients la deposició va acompanyada d'un increment relatiu en l'ARNm de les isoformes que contenen l'inhibidor Kunitz de proteases, igual com en aquelles malalties típiques de dipòsits amiloides, formin part o no de les sinucleïnopaties, com és el cas de l'angiopatia amiloidea. La PSP, en canvi, és una taupatia, igual com l'AA o l'AD, però sense dipòsits amiloides al córtex cerebral, caracteritzada per un grau molt elevat de gliosi, de manera que utilitzant-la en el nostre estudi descartem que l'increment relatiu de les isoformes KPI sigui degut a un augment de la glia, que tal com he esmentat en la introducció, expressen en grau molt elevat les isoformes KPI. A més l'alteració en la relació $A\beta PP-KIP^+ / A\beta PP-KIP^-$ es dona, ja sigui per una reducció de la isoforma neuronal ($A\beta PP695$) que portaria a una pèrdua de funció i al seu torn, neurodegeneració com s'observa en la malaltia d'AD, o bé per una reducció tan d' $A\beta PP695$ com de la forma $A\beta PP751$, observada a AA, DLBc i DLBp a més de l'augment de la isoforma $A\beta PP770$ observada en DLBp. Les isoformes que es troben disminuïdes, no tenen l'exó 8, de manera que el fet de tenir o no aquest exó podria afavorir la malignitat de les determinades isoformes. De manera que una regulació òptima del procés d'*splicing* és fonamental per a l'aparició de les formes "malignes" de l' $A\beta PP$ (Li i col., 1999; Poleev i col., 2000). Finalment, l'augment de la relació KPI^+/KPI^- correlaciona amb les malalties que tenen dipòsits amiloides, afavorint la teoria que proposaria que les isoformes KPI serien les implicades en la formació de les plaques senils.