



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**EFFECTOS DE LA EXPRESIÓN DE ALFA-  
SINUCLÉINA Y SINFILINA EN EL SISTEMA  
NERVIOSO DE *Drosophila melanogaster* COMO  
MODELO DE PARKINSON**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**B I Ó L O G O**

**P R E S E N T A:**

**LUIS EDUARDO FONSECA ORNELAS**



**DIRECTOR DE TESIS:  
DR. ENRIQUE REYNAUD GARZA**

**2009**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

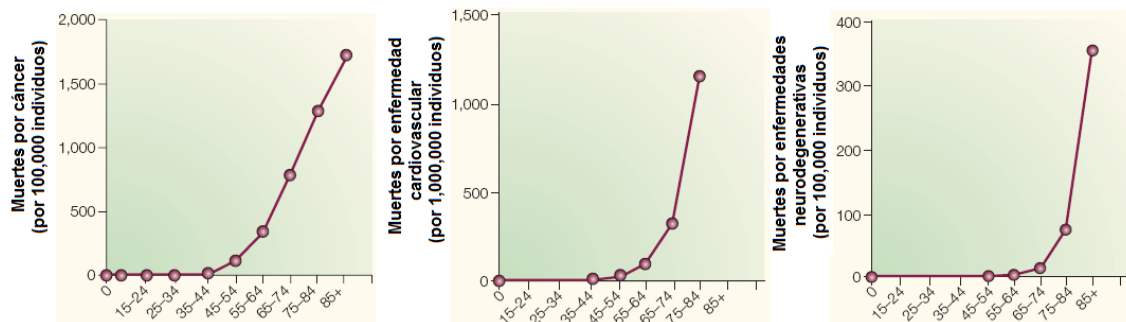
*A mis papás*

# ÍNDICE

1. Introducción.....	3
1.1 Enfermedades neurodegenerativas.....	3
1.2 El mal de Parkinson.....	5
1.2.1 Generalidades.....	5
1.2.2 Historia.....	6
1.2.3 Manifestaciones clínicas y diagnosis de la EP.....	8
1.2.4 Histopatología.....	9
1.2.5 Dopamina.....	11
1.2.6 $\alpha$ -sinucleína (SNCA).....	13
1.2.7 Sinfilina (SNCAIP).....	19
1.3 Modelos animales de la enfermedad de Parkinson.....	26
1.4 Justificación.....	31
1.5 Hipótesis.....	32
1.6 Objetivo general.....	32
2 Materiales y métodos.....	32
3 Resultados.....	36
4 Discusión y conclusiones.....	47
5 Perspectivas.....	51
6 Literatura citada.....	52

## I. INTRODUCCIÓN

Los avances tecnológicos y el manejo de la salud pública han elevado dramáticamente la esperanza de vida de la población mundial. En México, por ejemplo, las innovaciones médicas y la mejoría en las condiciones de salud incrementaron la expectativa de vida de la población. En 1930 la esperanza de vida era de 33 años para los hombres y 35 años para mujeres. Para el año 2000 este valor cambió a 73 y 78 años respectivamente (INEGI). Sin embargo, vivir más no necesariamente significa vivir mejor. A medida que la esperanza de vida aumenta en el mundo, también aumentan los casos de cáncer, enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas que, hasta hace relativamente pocos años, se encontraban lejos de figurar entre las primeras causas de muerte de personas adultas. Por ejemplo, las probabilidades de desarrollar cáncer es 10 veces mayor en personas mayores de 65 años (Finkel, 2005), mientras que la misma tendencia se observó en estudios epidemiológicos de padecimientos cardiovasculares y neurodegenerativos (Figura 1).



**Figura 1.** Tasas de muertes causadas por enfermedades específicas en función de la edad. Las tres formas de enfermedades crónicas muestran un aumento virtualmente exponencial a medida que la edad de la población aumenta (Figura tomada y modificada de Finkel, 2005)

### 1.1 Enfermedades neurodegenerativas.

Las enfermedades neurodegenerativas son un conjunto de padecimientos que se caracterizan a muy grandes rasgos por la pérdida gradual de neuronas en el sistema nervioso y su incidencia aumenta de manera significativa con respecto a la edad. Las

más comunes incluyen al Alzheimer, la enfermedad de Huntington, el mal de las vacas locas (encefalopatía espongiforme bovina), el síndrome de Creutzfeldt-Jakob y el mal de Parkinson. Aunque todas ellas tienen características muy particulares que las diferencian entre sí (como los síntomas que generan, el tipo neuronal que atacan, la dependencia de la edad, etc), también tienen características comunes que las unen de manera evidente: La formación de agregados protéicos que provocan la pérdida de grupos neuronales, a veces discretos y restringidos a un solo tipo celular, y a veces distribuidos por varias zonas cerebrales abarcando más de un tipo neuronal.

*1.1.1 Alzheimer.* Con una incidencia de más del 10% en personas mayores de 65 años, representa la enfermedad neurodegenerativa más común en el mundo. Comprende una sintomatología que comienza con la incapacidad del paciente de consolidar la memoria a corto plazo y puede degenerar hasta niveles en los que las personas con esta enfermedad no pueden siquiera reconocer a miembros de su propia familia. A nivel tisular se encuentran placas amiloides formadas por la acumulación del péptido  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ) tanto en el parénquima del cerebro como en los vasos sanguíneos que lo irrigan. Esta acumulación ocurre por una sobreproducción del  $A\beta$  o por fallos en los mecanismos que se encargan de degradarlo (proteosoma). Estos mismos agregados pueden provocar una actividad mitocondrial deficiente, funcionan como sinaptotoxinas (que inhiben la liberación de distintos neuro-transmisores), alteran los niveles intracelulares de calcio, y activan procesos inflamatorios. Todos estos efectos, en conjunto, provocan la muerte de distintos tipos neuronales en distintas áreas del cerebro (Meyer-Luehmann, 2008).

*1.1.2 Huntington.* Es de carácter hereditario y afecta a 1 de cada 10,000 personas. Los síntomas aparecen entre los 30 y 40 años de edad e incluyen cambios en la personalidad, fallos graves en las habilidades cognitivas y desórdenes motores. A nivel celular, existe

una pérdida considerable de neuronas en el estriado, la región del cerebro que se encarga de regular funciones motrices y aspectos cognitivos y emocionales que influyen en el comportamiento. A nivel molecular, la enfermedad es causada por una mutación en el gen *HTT* que codifica a la huntingtina, una proteína que, en condiciones normales, contiene una cadena de entre 6 y 35 residuos del aminoácido glutamina. Sin embargo, por razones que aún no se entienden del todo, *HTT* tiende a mutar de manera generacional y el número de repeticiones del trinucleótido que codifica para la glutamina (CAG) se amplifica en algunas familias, lo que lleva a la proteína a tener desde 36 hasta 180 repeticiones de este aminoácido, exacerbando la formación de inclusiones de esta proteína tanto en el núcleo como en el citoplasma de las neuronas y provocando su muerte. De manera muy interesante, el número de repeticiones de glutamina correlaciona de manera inversa con la edad de inicio de la enfermedad (Palfi, 2008).

*1.1.3 Creutzfeldt-Jakob y el mal de las vacas locas.* Tanto el síndrome de Creutzfeldt-Jakob como el mal de las vacas locas, tienen una incidencia mucho menor a las enfermedades anteriores. Su sintomatología aparece alrededor de los 60 años de edad. Comienza con problemas de memoria, cambios en el comportamiento, problemas de visión y pobre coordinación muscular y termina avanzando rápidamente hasta la demencia; se caracterizan por la aparición de especies protéicas mal plegadas que se agregan en el citoplasma de las neuronas. Las peculiaridades de estas dos enfermedades son que, a diferencia de las antes descritas, pueden ser esporádicas, heredadas o, incluso, adquiridas por infección (Cali, 2006).

## **1.2 El mal de Parkinson.**

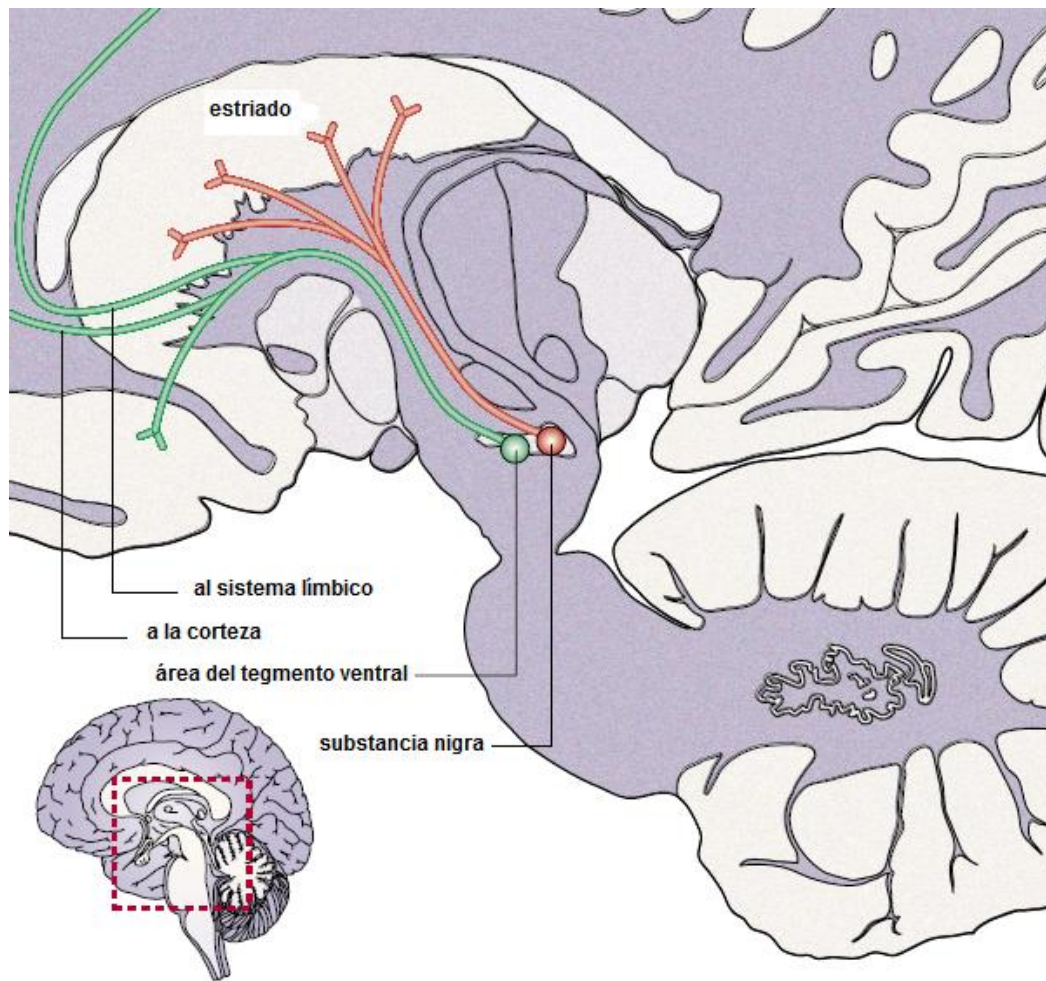
*1.2.1 Generalidades.* La enfermedad de Parkinson (EP) es una enfermedad neurodegenerativa progresiva que afecta la capacidad de movimiento de los individuos y tiene una

incidencia que asciende casi logarítmicamente con respecto a la edad; 1% entre los 50 y los 65 años, 14.9% entre los 65 y 74 y hasta 52.4% en personas mayores a los 85 años (Pariquet et al., 2007).

Aunque la patología primaria y los defectos generales en la neurotransmisión en la EP ya se conocen, las causas del inicio y progresión de la neurodegeneración en esta enfermedad son todavía desconocidas. Sin embargo, un gran número de investigaciones han permitido elucidar alteraciones bioquímicas de las áreas afectadas del cerebro, así como los componentes genéticos y ambientales que contribuyen a los mecanismos moleculares de esta enfermedad, proveyendo perspectivas prometedoras para las investigaciones futuras y estrategias terapéuticas.

*1.2.2 Historia.* La EP fue descrita en 1817 por el médico inglés James Parkinson, que creía que este desorden estaba originado por problemas en la médula espinal. Más de 70 años después, Blocq y Marinesco descubrieron la degeneración de la sustancia nigra en el cerebro de los pacientes que padecían esta enfermedad. Aunado a esto, Friedrich Lewy descubrió en 1912 la formación de agregados eosinofílicos en los cerebros de pacientes parkinsonianos, mismos que desde entonces han sido denominados cuerpos y neuritas de Lewy en honor a su descubridor. Todos estos avances permitieron iniciar investigaciones acerca del papel que jugaba la sustancia nigra en la patogénesis de la EP, culminando en descubrimientos clave, como los de Carlsson y sus colaboradores en 1957 en donde determinaron que la dopamina es un neurotransmisor (y no solamente un precursor en la biosíntesis de adrenalina, como se pensaba hasta entonces) y seguidos por Ehringer y Hornykiewicz en 1962 que describieron que es la degeneración de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra del cerebro y la consecuente deficiencia de dopamina en el estriado la causa de las manifestaciones clínicas de esta enfermedad (Fig. 2). Estos descubrimientos generaron en conjunto las primeras terapias en contra de





**Figura 2.** Vías dopaminérgicas en el cerebro humano. El diagrama indica la localización de neuronas dopaminérgicas en el área del tegmento ventral (en verde) y en la sustancia nigra (en rojo). En los pacientes parkinsonianos las neuronas de la sustancia nigra se degeneran, provocando muchas de las anomalías motoras que se presentan en esta enfermedad. (Modificado de Goedert, 2001).

la EP, como la administración tanto oral como intravenosa de dopamina que constituyen la base de lo que hasta hoy ha resultado una de las estrategias con las que más eficientemente se han tratado a los pacientes parkinsonianos: sustitución de dopamina e implementación de agonistas de dopamina. Diversos estudios epidemiológicos en donde se indicaba que la exposición a distintas toxinas como el MPP+ (un subproducto en la síntesis de la droga meperidina) el paraquat y el maneb (pesticidas que solían ser de uso común) podían generar síntomas muy similares a los de pacientes con el mal de Parkinson (ver sección de modelos experimentales para la enfermedad de Parkinson), aunado con hallazgos de que la sustancia nigra de estos mismos pacientes presentaba

un estrés oxidativo elevado, permitieron realizar investigaciones centradas en componentes tanto celulares como ambientales que estuvieran relacionados con la adquisición y desarrollo de esta enfermedad. El descubrimiento de formas monogénicas de la EP, así como de factores genéticos que generan susceptibilidad en ciertos pacientes han llevado al ahora consenso de que la EP es una enfermedad con etiología claramente multifactorial.

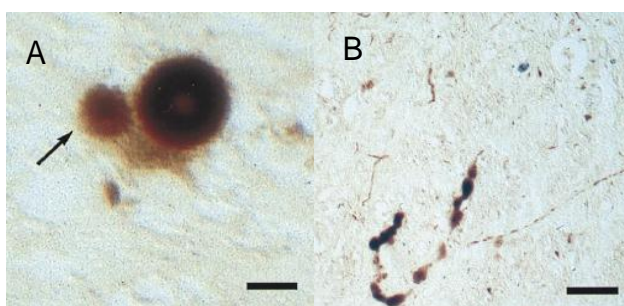
*1.2.3 Manifestaciones clínicas y diagnosis de la EP.* Para una correcta diagnosis de la EP, primero es necesario diferenciar entre el Parkinson idiopático y los síndromes parkinsonianos secundarios. Al contrario de lo que sucede con la EP idiopática y síndromes parkinsonianos asociados con otras enfermedades neurodegenerativas, la etiología de los síndromes parkinsonianos secundarios sí es conocida. Estos parkinsonismos secundarios necesitan ser diagnosticados dado que cada uno requiere distintas estrategias terapéuticas. Algunas de las causas de estos síndromes parkinsonianos secundarios incluyen el parkinsonismo inducido por drogas, por tumores, por lesiones isquémicas, infecciones y desequilibrios metabólicos, entre otras (revisado en Krüeger et al., 2005).

La EP idiopática se caracteriza por desórdenes en los movimientos voluntarios e involuntarios. Existen síntomas cardinales que usualmente comienzan en un lado del cuerpo: Desde un detrimento en la velocidad de los movimientos (bradicinesia) a una reducción en su amplitud (hipocinesia) que puede degenerar en una completa pérdida tanto de los movimientos voluntarios como involuntarios (acinesia). La cara pierde la mímica habitual y la voz se vuelve monotónica. En estados avanzados la saliva no puede ser tragada al ritmo normal y se produce sialorrea. La postura se pierde y el caminar se vuelve lento, con pasos pequeños y sin el clásico movimiento de los brazos. Una limitada capacidad tanto de iniciar como de terminar los movimientos provocada

por una rigidez generalizada resulta en caídas frecuentes. El tremor en reposo es probablemente uno de los síntomas más conocidos de la EP, caracterizada por movimientos rápidos y no controlados especialmente de las manos. En las etapas más avanzadas de la enfermedad se presenta una inestabilidad en la postura, que se caracteriza por la inhabilidad del paciente para cambiar de una postura a otra.

Además de los relacionados con las actividades motoras (cardinales), existen una serie de síntomas vegetativos asociados a la EP. Entre estos se incluye la seborrea (mayor producción de grasa en el cuero cabelludo), disfunción de la vejiga, problemas somatosensoriales (como daños en las capacidades olfatorias y en la discriminación de colores). Cerca del 40% de los pacientes con esta enfermedad sufren de depresión, y en aproximadamente 20% de los pacientes, se puede reconocer demencia. Aunque la medicación que existe en el presente permite a los enfermos de Parkinson tener una esperanza de vida relativamente cercana a lo normal, son estas mismas medicinas las que provocan complicaciones futuras, como la discinesia y una desensibilización al medicamento, lo que genera necesidades de dosis mayores cada vez que se administra.

*1.2.4 Histopatología.* La EP idiopática es un desorden multisistémico, pero una característica esencial para la diagnosis neuropatológica de esta enfermedad son los cuerpos de Lewy y las neuritas de Lewy positivas para  $\alpha$ -sinucleína (Fig. 3). Estos agregados, además de alfa-sinucleína, están constituidos también por una diversidad alta de proteínas, entre las que destaca la sinfilina (Engelender et al., 2000). Ahora se sabe que los cuerpos de Lewy no se generan sólo en cerebros de pacientes con EP, dado que



**Figura 3.** Agregados proteicos en el Parkinson. En el panel A se muestran cuerpos de Lewy inmunopositivos a  $\alpha$ -sinucleína, (flecha). En el panel B se muestran neuritas de Lewy reactivas a  $\alpha$ -sinucleína. Las barras indican 13 y 90  $\mu$ m, respectivamente (Imagen de Spillantini et al, 1998)

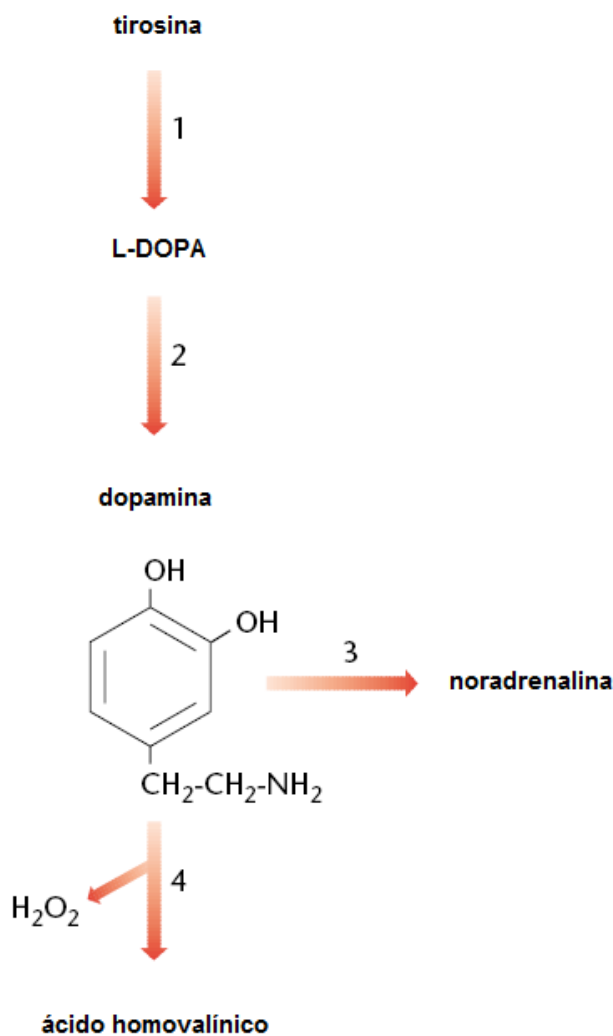
se han encontrado en procesos neurodegenerativos no necesariamente asociados con esta enfermedad, tales como el Alzheimer, el síndrome de Down, la demencia con cuerpos de Lewy o, de manera más general, en las denominadas sinucleopatías, que representan un conjunto de enfermedades en las que el factor común es la aparición de agregados similares a estos cuerpos de Lewy (Szargel, 2008; Spillantini, 1998). Además de las proteínas que lo conforman, los cuerpos de Lewy usualmente provocan una mayor expresión de grupos de proteínas que se generan como respuesta celular a la formación de agregados anormales de proteínas, como la ubiquitina, subunidades del proteosoma y chaperonas. En la EP, las áreas del cerebro con más alta expresión de  $\alpha$ -sinucleína son las que se asocian con la formación de cuerpos de Lewy. Además, Hashimoto y sus colaboradores (2002) demostraron que los cuerpos de Lewy son capaces de secuestrar hierro tóxico, y la expresión de  $\alpha$ -sinucleína es capaz en sí misma de proteger a las células de estrés oxidativo inactivando cascadas de señalización relacionadas con el estrés. Es por ello que se ha especulado que los cuerpos de Lewy se forman como resultado de alteraciones en el manejo de proteínas altamente oxidadas y podrían, al menos en principio, representar un mecanismo de protección celular en contra de la acumulación tóxica de proteínas (Tanaka et al., 2004, revisado en Moore et al., 2005). Sin embargo, también se ha especulado que son precisamente los cuerpos de Lewy los que provocan la patogénesis. Se ha hipotetizado, por ejemplo, que las proteínas que de manera normal son transportadas por los axones comienzan a acumularse en los cuerpos de Lewy, provocando una falla en la función de la neurona y generando eventualmente su muerte. Además, se ha demostrado que una sobreexpresión de  $\alpha$ -sinucleína promueve la formación de radicales libres, suficientes para provocar la muerte celular (Turnbull et al., 2001). Sin embargo, resulta conveniente señalar que la mayoría de las neuronas que se degeneran en estos estudios no forma cuerpos de Lewy

en el sentido estricto, de modo que estas inclusiones no parecen, al menos en principio, ser necesarias para que se lleven a cabo procesos neurodegenerativos.

*1.2.5 Dopamina.* Aunque al inicio de la enfermedad de Parkinson no todos los núcleos dopaminérgicos se ven afectados, la degeneración de las neuronas dopaminérgicas pigmentadas en la sustancia nigra (Fig. 2) causa en última instancia una disminución importante en los niveles de dopamina (DA) en el sistema nervioso. La dopamina, la noradrenalina y la adrenalina son neurotransmisores que se encuentran en la categoría de las catecolaminas, de las que el precursor es el aminoácido tirosina (Fig. 4). El primer paso en la síntesis de las catecolaminas lo cataliza la enzima tirosina-hidroxilasa (TH) que le agrega un grupo hidroxilo a la L-tirosina en una reacción que requiere oxígeno como co-substrato y tetrahidrobiopterina como cofactor para generar 3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA). La TH es la enzima limitante en este proceso y se encuentra presente únicamente en las neuronas catecolaminérgicas. La zona del cerebro con una mayor concentración de dopamina es el estriado, que recibe la mayor parte de ésta gracias a inervaciones que provienen de neuronas dopaminérgicas presentes en la sustancia nigra (Fig. 2). La dopamina se produce gracias a la acción de la dopamina descarboxilasa en la L-DOPA (Fig. 4). Inmediatamente después de su síntesis en el citoplasma de las terminales presinápticas, la dopamina es cargada en vesículas sinápticas gracias a un transportador vesicular de monoaminas (VMAT, por sus siglas en inglés). La acción de la dopamina en el espacio intersináptico es terminada por la reabsorción de la dopamina en las terminales nerviosas o por células gliales circundantes utilizando un transportador de dopamina dependiente de sodio, denominado DAT. Dos de las enzimas más importantes involucradas en el catabolismo de la dopamina son la monoamino oxidasa (MAO) y la catecol-*O*-metiltransferasa (COMT). Tanto neuronas como glia contienen MAO mitocondrial y COMT

citoplásmica. Inhibidores de estas enzimas son utilizados clínicamente en casos de depresión.

Una vez liberada, la dopamina es reconocida específicamente por receptores de membrana acoplados a proteínas G. Estos receptores dopaminérgicos se agrupan en dos grandes familias, D-1 y D-2, que, respectivamente, estimulan e inhiben a la adenilato ciclasa, regulando los niveles de AMP cíclico. Además, la dopamina influye en la excitabilidad de las neuronas postsinápticas modulando la función de canales iónicos dependientes de voltaje. Los efectos de la dopamina en transmisiones sinápticas excitatorias o inhibitorias, metabolismo intracelular o expresión genética dependen en última instancia del complemento de receptores dopaminérgicos que se expresen en las

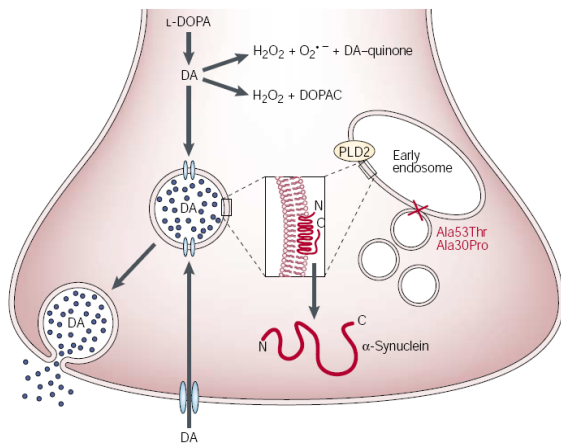


neuronas que reciben la señal dopaminérgica. Una población importante de neuronas dopaminérgicas se encuentra en la sustancia nigra, y sus proyecciones inervan, de manera general, al estriado, donde se cree que la dopamina modula actividades como la postura y el movimiento. Otras neuronas dopaminérgicas se originan en el área del tegmento ventral y sus proyecciones se

**Figura 4.** Biosíntesis de dopamina y sus derivados. 1, tirosina hidroxilasa (TH); 2, dopamina decarboxilasa; 3, dopamina- $\beta$ -hidroxilasa; 4, monoamino-oxidasa (MAO).

dirigen a estructuras límbicas (amígdala y séptum), donde la dopamina regula las emociones y la motivación. También se emiten proyecciones hacia regiones corticales, donde la dopamina afecta la atención y otros procesos cognitivos. Se ha especulado que la dopamina puede jugar diversos papeles en la patogénesis del Parkinson, en conjunto con factores tanto genéticos como ambientales, provocando estos últimos susceptibilidad a esta enfermedad. En la figura 5 se ejemplifica una de estas hipótesis. En ella se propone que ciertas mutaciones en el gen que codifica para la  $\alpha$ -sinucleína (ver siguiente sección) impiden el almacenamiento correcto de la dopamina en las vesículas sinápticas. La dopamina tiende de manera normal a oxidarse a especies que resultan tóxicas para la célula. Es precisamente por esto que los agentes ambientales hacen de las neuronas dopaminérgicas un blanco particularmente susceptible de daño, provocando la adquisición y desarrollo de la EP.

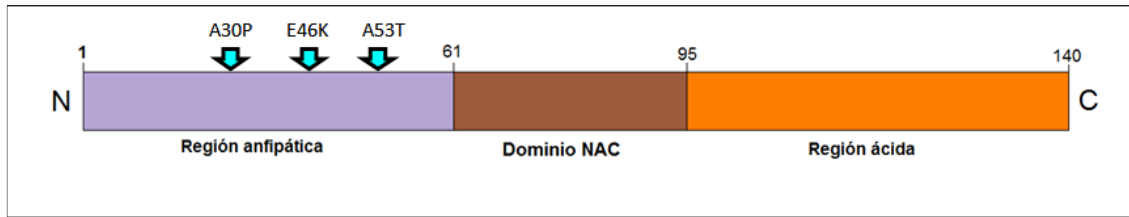
*1.2.6  $\alpha$ -sinucleína (SNCA).* La  $\alpha$ -sinucleína adquirió una relevancia como agente causal del mal de Parkinson inmediatamente después de que se encontró que una mutación en el gen que la codifica predisponía a pacientes de una familia italiano-americana a padecer esta enfermedad (Polymeropoulos, 1997). Polymeropoulos y sus colaboradores encontraron que una mutación en el gen que cambia una alanina en la posición 53 por una treonina predispuso a más de 60 miembros de una familia a lo largo de cinco generaciones a desarrollar Parkinson. Posteriormente, se encontraron mutaciones en el gen de la  $\alpha$ -sinucleína (en las posiciones A30P y E46K, respectivamente) de familias alemanas y españolas que padecían esta enfermedad, mientras que en otros casos de Parkinson familiar se describieron triplicaciones en el gen. También se han descrito casos de Parkinson familiar por polimorfismos en su promotor (Chen, 2005; Moore, 2005).



**Figura 5.** La dopamina es producida en el citoplasma de las neuronas a partir de L-DOPA e inmediatamente se almacena en vesículas sinápticas. Este modelo sugiere que cuando la  $\alpha$ -sinucleína se encuentra mutada las vesículas de reciclaje no son capaces de unirse a endosomas y liberar su contenido, retrasando su tráfico y provocando la acumulación de dopamina en la neurona, que se oxida fácilmente y resulta tóxica para la célula (Figura de Lotharius y Brundin, 2002)

Las sinucleínas son proteínas abundantes en el cerebro de vertebrados. Dicha familia está compuesta por tres miembros, cuyas funciones fisiológicas se encuentran pobremente entendidas:  $\alpha$ -sinucleína,  $\beta$ -sinucleína y  $\gamma$ -sinucleína. La  $\alpha$ -sinucleína tiene 140 aminoácidos de longitud, es una proteína soluble que se expresa en todo el sistema nervioso y se encuentra enriquecida en las terminales presinápticas de las neuronas del sistema nervioso central (Maroteaux, 1988; Di Rosa, *et al.*, 2003). Estructuralmente, la  $\alpha$ -sinucleína está formada por un extremo N-terminal anfipático con seis motivos imperfectos repetidos con una secuencia consenso KTKEGV (lisina, treonina, lisina, ácido glutámico, glicina y valina). Esta región es la que participa en el reconocimiento y la unión a vesículas sinápticas (Jensen, 1998). Posee una región central de 35 aminoácidos altamente hidrofóbica que tiende a agregarse y formar placas amiloides asociadas con la enfermedad de Alzheimer (Hashimoto, 2001) y una región ácida C-terminal [Fig. 6; (Moore, 2005)]. La  $\alpha$ -sinucleína puede participar tanto en el componente rápido del transporte axonal (asociado con estructuras túbulovesiculares e involucrado directamente en la unión a vesículas) como en el componente lento del transporte axonal (relacionado con interacciones con elementos del citoesqueleto). Aunque esta proteína no se encuentra plegada en su forma nativa, se ha especulado que, como otras proteínas con esta característica, adquiere su conformación terciaria funcio-





**Figura 6.** Representación de la  $\alpha$ -sinucleína y sus tres regiones principales, la anfipática, la ácida y la amiloide. A30P, E46K y A53T indican las tres mutaciones encontradas en el gen relacionadas directamente con el desarrollo de Parkinson familiar. NAC representa el componente no amiloide- $\beta$  (Non Amiloid- $\beta$  Component), un dominio de 35 aa. altamente hidrofóbico que tiende a formar placas amiloides asociadas con la enfermedad de Alzheimer (Figura tomada de Moore et al., 2005).

nal hasta el momento en el que se asocia con vesículas (a través de las repeticiones en su región anfipática, Goedert, 2001) de otros elementos celulares. Esto se ha propuesto porque cuando se encuentra de manera libre, la  $\alpha$ -sinucleína presenta solamente un 3% de  $\alpha$ -hélice en su conformación, mientras que el resto de ella se encuentra en una hélice al azar y no es sino hasta que interactúa con membranas lipídicas que cambia su conformación a una con 80% en  $\alpha$ -hélice más estable y, presumiblemente, con su posible función nativa (Jensen, 1998; Tofaris, 2007). De hecho, la  $\alpha$ -sinucleína tiene una alta plasticidad conformacional que le permite, dependiendo del ambiente en donde se encuentre o los elementos celulares con los que esté interactuando, permanecer no plegada, plegarse en  $\alpha$ -hélice o  $\beta$ -conformación, formar especies monoméricas u oligoméricas o formar filamentos amiloidogénicos o amorfos (Uversky, 2003). Aun cuando se conoce la secuencia y el sitio de actividad de esta proteína, existen reportes contradictorios en cuanto a su función específica. Sin embargo, se podría descartar el hecho de que tenga alguna función catalítica dado que, como otras proteínas con secuencias repetitivas, es poco probable que se logre plegar en alguna conformación activa catalíticamente (Maroteaux, 1988). Algunos grupos afirman que la pérdida de esta proteína genera una dramática disminución en la acumulación de vesículas presinápticas y de reciclaje, lo que contribuiría también a una disminución en la

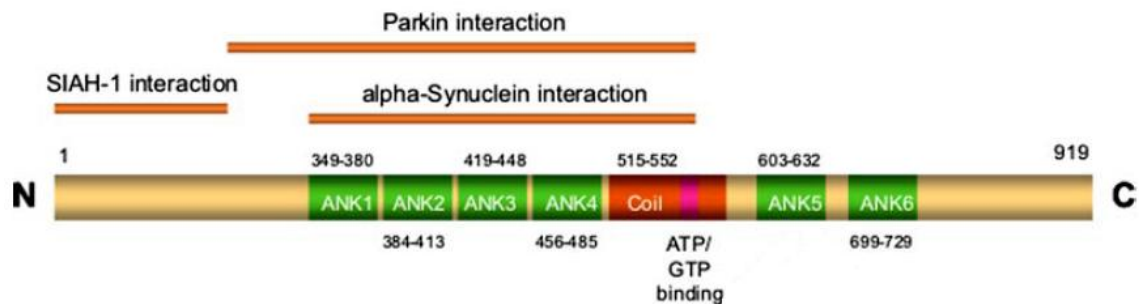
respuestas sinápticas durante estimulación repetitiva y a una pérdida considerable de la plasticidad sináptica (Cabin *et al.*, 2002). Otros grupos afirman que la eliminación tanto de la  $\alpha$ -sinucleína como de la  $\beta$ -sinucleína no afecta ni a la acumulación de vesículas sinápticas ni a la liberación de los neurotransmisores al medio extracelular (Chandra, 2004). Se ha demostrado también que en el pinzón cebra, la presencia de un homólogo de la  $\alpha$ -sinucleína en áreas específicas del telencéfalo es crítica en la adquisición y consolidación de los patrones de canto asociados a ciertas etapas del desarrollo, y que una variación en la dosis génica de esta proteína resulta de manera irremediable en la incapacidad del individuo para aprender a cantar (George, 1995). De modo consistente, se ha encontrado que en mamíferos la  $\alpha$ -sinucleína interactúa e inhibe la función normal de la fosfolipasa D (Recchia, 2004), una proteína que de manera normal se encuentra anclada a la membrana plasmática y regula funciones del citoesqueleto y de endocitosis. También puede regular la actividad de la adenilato ciclasa y, por lo tanto, de los niveles intracelulares de AMP cíclico (Goedert, 2001). Aunado a todo esto, la  $\alpha$ -sinucleína tiene la capacidad de interactuar de manera específica con otras proteínas como la proteína amiloide- $\beta$  ( $A\beta$ ) que forma fibras amiloides en la enfermedad de Alzheimer (Jensen, 1997); la proteína tau asociada a microtúbulos (MAPT), que interviene de manera directa en el transporte axonal en los cerebros de todos los vertebrados (Jensen, 1999), la tirosina hidroxilasa (TH), enzima limitante en la biosíntesis de dopamina, disminuyendo su eficiencia y provocando en última instancia un detrimento en los niveles de dopamina y sus metabolitos derivados (Perez, 2002); la parkina (PARK2), una E3 ubiquitín-ligasa que forma parte de una maquinaria de señalización y degradación de proteínas por la vía del proteosoma (Choi, 2001); la hidrolasa carboxilo terminal de ubiquitina (UCH-L1, PARK5), enzima específica de neuronas que se encarga de hidrolizar cadenas poliméricas de ubiquitina a monómeros de ubiquitina que

pueden entrar de nuevo a la vía de degradación de proteínas por la vía del proteosoma, y en donde se piensa que interactúa con la  $\alpha$ -sinucleína ubiquitinada (Sharma, 2001); y  $\beta$ -sinucleína (SNCB), un homólogo no amiloidogénico de la  $\alpha$ -sinucleína (dado que carece de manera natural del dominio NAC, Fig. 4). Esta interacción entre  $\alpha$  y  $\beta$ -sinucleína se ha correlacionado de manera directa con la disminución en la formación de agregados de  $\alpha$ -sinucleína en condiciones neurodegenerativas (Hashimoto, 2001). Fortin (2000) propone que la función normal de la  $\alpha$ -sinucleína depende de su asociación correcta con microdominios enriquecidos en colesterol presentes en la membrana plasmática (denominados “balsas lipídicas” o *lipid rafts*) y que al menos la mutación A30P impide que esta asociación se lleve a cabo, generando un mal funcionamiento o impidiendo la localización nativa funcional de la  $\alpha$ -sinucleína, hecho que podría contribuir a su toxicidad en el Parkinson. También se ha descrito que una de las posibles vías de toxicidad generada por la  $\alpha$ -sinucleína reside en su tendencia a formar agregados proteicos insolubles, ya sea consigo misma o en asociación con otras proteínas, y que las mutaciones en su secuencia no hacen sino exacerbar la formación de estos agregados, generando una estructura primaria que tiende más hacia la autoagregación que la secuencia silvestre (Sharme, 2001). Otra teoría apunta más bien a que, teniendo como premisa principal que la función putativa de la  $\alpha$ -sinucleína es la de regular la estabilidad y el tráfico de las vesículas sinápticas, mutaciones en ella provocan un deterioro de esta función, lo que a su vez impediría la asociación de las vesículas de reciclaje con los endosomas que permiten la liberación y reciclaje de su contenido. Dado que no pueden liberarse, no existirían entonces vesículas libres disponibles para incorporar la recién formada dopamina (Fig. 5). Es de esta manera que la dopamina se va acumulando dentro de la neurona y se oxida a versiones tóxicas como la dopamina-quinona y el ácido dihidroxifenilacético, y se supera la capacidad de

respuesta de las neuronas dopaminérgicas. Éstas terminan muriendo como resultado del envenenamiento provocado por los subproductos de oxidación de la dopamina (Lotharius, 2002). Otro posible mecanismo de toxicidad fue propuesto por un grupo de investigación encabezado por Auluck, que han logrado asociar la toxicidad de la  $\alpha$ -sinucleína con fallas en la función de las chaperonas encargadas de facilitar su plegamiento. Estos investigadores propusieron que la  $\alpha$ -sinucleína secuestra a la Hsp70, impidiéndole hacer su trabajo normal, y promoviendo así la acumulación de proteínas mal plegadas en la célula. A este respecto, los investigadores encuentran que la adición de sustancias que envenenan a las chaperonas exacerbaban la formación de inclusiones de  $\alpha$ -sinucleína, y además demuestran que una sobreexpresión de Hsp70 impide la formación de estos agregados y logra abolir la toxicidad de la  $\alpha$ -sinucleína, impidiendo la muerte de neuronas dopaminérgicas (Auluck, 2002). De hecho, proponen ésta como una posible estrategia terapéutica en contra de los efectos del Parkinson. Estudios en *Drosophila* han demostrado que a medida que se degeneran las neuronas dopaminérgicas, la  $\alpha$ -sinucleína humana que se expresa de manera heteróloga en ellas comienza a fosforilarse en mayor medida en la Ser129, de manera que si se inhibe la fosforilación en este residuo se evita la formación de fibras y agregados protéicos y se disminuye significativamente su toxicidad (Chen, 2005) (ver sección de modelos experimentales de la EP).

De especial interés es, sin embargo, la interacción que tiene con la sinfilina, proteína que Engelender y colaboradores (2000) encontraron interactuando con la sinucleína en estudios de doble híbrido de levadura. Estos investigadores propusieron entonces que la sinfilina es un componente clave en la formación de los cuerpos de Lewy. Aún cuando la interacción lleva descrita casi diez años, las vías que la regulan están todavía pobremente entendidas.

1.2.7 *Sinfilina (SNCAIP)*. La sinfilina (o  $\alpha$ -sinuclein interacting protein, SNCAIP) fue descubierta como resultado de la búsqueda de proteínas que interactuaran físicamente con la  $\alpha$ -sinucleína utilizando como metodología el doble híbrido de levadura <sup>3</sup>. La sinfilina es una proteína de 919 aminoácidos con un peso molecular que puede oscilar entre 115 y 140 kD. Aunque su función específica es todavía desconocida, se han logrado identificar en su secuencia varios dominios, tales como el de repeticiones similares a anquirina, hélice-hélice, un dominio putativo de unión a ATP/GTP y regiones secuencias blanco para las caseína cinasa I y II (Lee, 2004; Chung, 2001; Kruger, 2004) (Fig. 7).



**Figura 7.** Representación esquemática del marco de lectura abierto de la sinfilina. Las repeticiones similares a anquirina se muestran en verde, mientras que los dominios hélice-hélice (C-C) y de unión a ATP/GTP se muestran en rojo y magenta, respectivamente. En la parte superior se encuentran las regiones que interactúan con otras proteínas relacionadas con la patogénesis del Parkinson (Figura tomada de Krüger, 2004).

Los dominios de anquirina son una de las firmas más comunes que denotan interacciones proteína-proteína. En general los dominios de anquirina son módulos repetidos en tándem de aproximadamente 33 aminoácidos y pueden encontrarse en proteínas de muy diversas funciones que abarcan desde iniciadores transcripcionales y reguladores del ciclo celular hasta transportadores iónicos, proteínas del citoesqueleto y transductores de señales, pero de manera general se consideran como firmas que denotan interacciones proteína-proteína. Aunque la sinfilina cuenta con homólogos en todos los vertebrados, se considera que tienen funciones similares sólo aquellos que se

encuentran en los mamíferos, con los que la sinfilina humana comparte hasta 86% de aminoácidos (como el caso del chimpancé *Pan troglodytes* y el ratón *Mus musculus*). Sin embargo, la homología con la sinfilina del ratón asciende hasta el 96.5% en la región central de la proteína en la que se encuentran los dominios similares a anquirina y la repetición hélice-hélice. Esto apoya la idea de que esta región altamente conservada entre diferentes organismos tiene una función fisiológica similar que depende en muy buena medida de la integridad de estas secuencias (Kruger, 2004). Esto ha permitido localizar dominios indispensables en la secuencia de con la  $\alpha$ -sinfilina que le permiten interactuar, además de la  $\alpha$ -sinucleína, con otras E3 ligasas involucradas en la degradación de proteínas por la vía del proteosoma: parkina, dorfina, SIAH1 y SIAH3. Al igual que la  $\alpha$ -sinucleína, la sinfilina muestra un patrón de expresión significativamente neural, y se localiza predominantemente en la región presináptica de las neuronas. Aunque su función específica se conoce pobremente, las especulaciones más recientes apuntan hacia una función en las vesículas sinápticas, probablemente regulando en algún nivel la liberación de varios neurotransmisores y, en particular, el tráfico de dopamina en neuronas dopaminérgicas. En tejido neural de humanos, la sinfilina se expresa predominantemente en neuronas como las células de Purkinje, y neuronas de la sustancia nigra y piramidales de la corteza (Kruger, 2004; Engelender, 2000). En extractos neuronales se ha encontrado que el peso molecular de la sinfilina puede variar en extremos que van desde los 50 y 56 kD hasta los 120 kD, apoyando la idea de que el *splicing* alternativo o procesamiento postranscripcional son básicos en la expresión de la sinfilina y es gracias a estos procesos que existe una gran variedad de formas de sinfilina. Éstas podrían dedicarse a una amplia gama de funciones, todas ellas encaminadas probablemente a la regulación del tráfico de diferentes tipos de vesículas

sinápticas y, en particular, a la regulación directa de la unión de la  $\alpha$ -sinucleína a la membrana de las vesículas sinápticas.

El estudio de Engelender y colaboradores no sólo determinó que en efecto estas dos proteínas interactúan *in vitro*, sino que la sinfilina lo hace de manera mucho más potente con la  $\alpha$ -sinucleína mutante A30P, lo cual tendría implicaciones directas en la patogénesis del Parkinson. Esto sugiere probablemente que las mutaciones en el gen que codifica para la  $\alpha$ -sinucleína promueven en mayor o menor medida la interacción con otras proteínas (como la sinfilina) y éstas a su vez alteran la tasa de formación de inclusiones similares a los cuerpos de Lewy, elementos centrales en la patogénesis de esta enfermedad. Otro estudio determinó que esta interacción depende en buena medida de la fosforilación que sufre la sinfilina por la caseína cinasa II (CKII) (Lee, 2004), sin el cual la  $\alpha$ -sinucleína y la sinfilina no logran interactuar de manera adecuada y por lo tanto la formación de agregados se afecta. Este fenómeno también fue propuesto como eslabón en la cadena de eventos que en última instancia generan Parkinson, dado que la capacidad de formar inclusiones es, para muchos, una señal que más bien ejemplifica una estrategia celular encaminada a la protección y no un resultado patológico de daño o señal inequívoca de la antesala de la muerte celular. La sinfilina llamó la atención de los investigadores cuando se encontró que la relación no sólo era un artefacto del estudio *in vitro*, sino que formaba en efecto una parte esencial en la generación de cuerpos de Lewy no únicamente en pacientes parkinsonianos, sino en general en muchas de las sinucleiopatías que implican la formación de agregados de  $\alpha$ -sinucleína, como la demencia con cuerpos de Lewy. Todas estas nociones cobraron mayor importancia por el hallazgo de que la sinfilina es parte fundamental del núcleo denso de los cuerpos de Lewy, mientras que la  $\alpha$ -sinucleína forma parte de la región periférica hialina de estos. Esto fortaleció la idea de que para que la  $\alpha$ -sinucleína logre formar agregados similares

a los cuerpos de Lewy tendría que interactuar con la sinfilina (Wakabayashi, 2002), y consolidó la noción de que la sinfilina es un componente que funciona como conector fundamental en la formación de agregados protéicos. Si bien ya se ha determinado que la sinfilina interactúa de manera importante con la  $\alpha$ -sinucleína, y estudios independientes han concluido también que la sinfilina funciona como sustrato para la E3 ligasa *Parkina*, investigaciones en donde se analice la interacción particular de estas tres proteínas no han logrado establecer avances importantes que permitan entender los mecanismos moleculares que modulan la patogénesis del Parkinson.

Son varias las regiones de la sinfilina que se han encontrado interactuando de manera específica con la  $\alpha$ -sinucleína, tanto la región central como la amino-terminal. Ya que la interacción es tan clara, resulta razonable asumir que la sinfilina participe de manera activa en la patogénesis del Parkinson. De hecho, se ha encontrado que la expresión conjunta de estas dos proteínas en cultivos de líneas celulares *in vitro* promueve la formación de muchas más inclusiones similares a cuerpos de Lewy con respecto a las que se forman cuando la  $\alpha$ -sinucleína y la sinfilina se expresan de manera separada e independiente. Esto ha sido apoyado por estudios que señalan que, en ausencia de sinfilina, la parkina no logra interactuar con la  $\alpha$ -sinucleína no glicosilada (la especie más abundante en el cerebro humano). Sorprendentemente, la parkina interactúa con la sinfilina de manera muy específica, de modo que en este trinomio de proteínas, cada una parece ser tan importante como la otra (Chung, 2001; Kruger, 2004).

Una vez que se asoció a la sinfilina con la formación de cuerpos de Lewy en el cerebro de pacientes parkinsonianos, se diseñaron estrategias para encontrar polimorfismos y mutaciones en el gen que codifica la para la sinfilina con el interés de encontrar mutaciones en la sinfilina que produjeran efectos similares a los que se



encontraron en otros genes asociados al Parkinson familiar (Engelender, 2000). Solamente se encontraron unas pocas mutaciones en la sinfilina, entre las cuales hay una sustitución de cisteína por arginina en la posición 621 (R621C) de la secuencia de aminoácidos del quinto dominio de anquirina. Sin embargo, en cultivos celulares en los que se co-expresó a la sinfilina mutante con  $\alpha$ -sinucleína se formaron menos inclusiones en comparación a los generados con  $\alpha$ -sinucleína y sinfilina silvestre. A pesar de esto, se generó la hipótesis de que mutaciones en la sinfilina también podrían estar directamente relacionadas con la adquisición y desarrollo de la enfermedad (Marx, 2003). Posteriormente se determinó en estudios más detallados que mutaciones y/o variaciones en la secuencia de aminoácidos de la sinfilina no generan diferencias significativas en la adquisición y desarrollo ni de Parkinson ni de enfermedades relacionadas con agregados anormales de  $\alpha$ -sinucleína y de otras proteínas que se relacionan con ella (Myhre, 2008); por lo tanto se ha desechado la idea de que mutaciones en la sinfilina sean agentes causales directos del mal de Parkinson, a diferencia de mutaciones en la  $\alpha$ -sinucleína y/o en la parkina. Además de la interacción que guarda con la  $\alpha$ -sinucleína, la sinfilina también se asocia con otras proteínas involucradas directamente con la patogénesis del Parkinson. Una de las más estudiadas ha sido la que tiene con la caseína cinasa II (CKII). En experimentos en líneas celulares se ha observado que la CKII fosforila a la sinfilina, y que en ausencia de esta fosforilación la sinfilina es incapaz de interactuar con la  $\alpha$ -sinucleína, lo que disminuye de manera significativa la formación de inclusiones citoplasmáticas. Lo realmente interesante de esto es que las células que no logran formar estos agregados son en general más susceptibles a daño y mueren en una tasa mucho más alta con respecto a las que expresan de manera correcta a la sinfilina con la CKII (Lee, 2004). Otra relación que ha sido descrita es la que se lleva a cabo entre la sinfilina y la glicógeno sintasa

cinasa-3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ). La GSK3 $\beta$  también fosforila a la proteína tau, que está involucrada de manera íntima con la patogénesis del Alzheimer. Se ha especulado de manera muy general que el papel que tiene GSK3 $\beta$  con respecto a la sinfilina es, o bien el marcarla como blanco de degradación (fallas en este sentido provocarían un desequilibrio capaz de afectar de manera significativa la manera en la que la sinucleína es a su vez señalada para degradación), o bien, modificarla de manera postraduccional para que sea funcional (Tanji, 2003) Cualquiera que sea el caso, es claro que todavía se necesitan más estudios en este sentido. Sin embargo, el hallazgo de que la sinfilina interactúa de manera importante con la parkina (una E3 ligasa de ubiquitina) estableció el primer eslabón en la cadena de investigaciones que toman como premisa el hecho de que cuando existen fallos en la señalización para degradación de la sinfilina es cuando se genera un desequilibrio en la conformación y concentración de la  $\alpha$ -sinucleína que puede llegar a ser nocivo para la célula (Chung, 2001). Todo esto ha sido soportado por estudios que apoyan la idea de que la sinfilina puede ser poliubiquitinizada y de manera subsecuente degradada por la vía del proteosoma. Entre estos estudios destacan aquellos en los que se ha descrito cómo tres diferentes E3 ligasas ubiquitinan específicamente a la sinfilina y la señalan para su degradación. Esas ligasas son: Dofina, SIAH1 y SIAH2 (Revisado en Kruger, 2004); todas ellas, junto con la parkina, han sido encontradas en los cuerpos de Lewy de pacientes que padecieron la enfermedad de Parkinson. La cinasa con repeticiones de anquirina ricas en leucina 2 (LRRK2 por sus siglas en inglés), gen implicado directamente en la patogénesis del Parkinson esporádico cuando se encuentra mutado (Liu, 2008), podría también interactuar de manera importante tanto con la  $\alpha$ -sinucleína como con la sinfilina, aunque no se ha demostrado su interacción *in vitro*; se requiere profundizar en estos estudios para determinar esta interacción. Se ha demostrado, por ejemplo, que mutaciones en este gen impiden que su producto sea

reconocido por la parkina, de manera que no se logra señalar para su degradación correcta, y en cultivos celulares donde se co-expresan la parkina y el LRRK2, se promueve la formación de agregados proteicos donde éste es el componente principal, mientras que si se expresa alguna de sus formas mutantes, las células mueren por apoptosis (Smith, 2005). Esto permite proponer una vez más que la sinfilina puede actuar como puente conector entre la parkina y sus diferentes blancos, funcionando probablemente como un sustrato para ella. Comprender la relación entre la sinfilina y la  $\alpha$ -sinucleína será crítico para entender cómo se desarrolla no solamente la enfermedad de Parkinson, sino de muchos otros síndromes en donde los agregados proteicos en el sistema nervioso son una característica fundamental, tales como la demencia con cuerpos de Lewy, en donde también la sinfilina es parte del núcleo denso de los agregados (Wakabayashi, 2000).

Estudios relativamente recientes especulan que la formación de agregados proteicos en donde esté involucrada la sinfilina son en general citoprotectores. Estos agregados proteicos son una manera en la que la célula responde a la acumulación de proteínas indeseables en el citoplasma. Esto se ha demostrado por el hecho de que una vez que se inhibe la formación de estos agregados, la acumulación de las proteínas que debían ser degradadas resulta altamente tóxica para la célula. La presencia de la sinfilina es fundamental para que estos agregados multiméricos se formen y las proteínas tóxicas no hagan daños irreparables a las células. Esto resulta válido también para sistemas en donde la sinfilina ha sido mutada o no se encuentra presente, pues la formación de agregados multiméricos se reduce. En conclusión, resulta central generar modelos que permitan estudiar si la sinfilina interactúa de manera activa con otras muchas proteínas relacionadas directamente con la adquisición y desarrollo de la enfermedad de

Parkinson, y si es que esta interacción juega o no papeles relevantes en eventos que predispongan a padecer esta enfermedad.

### **1.3 Modelos animales de la enfermedad de Parkinson.**

Según la revisión de Beal (2001) para que exista una relevancia directa con el humano, un modelo experimental acerca del Parkinson debe tener las siguientes características (Tabla 2): Primero, un complemento normal de neuronas dopaminérgicas al momento del nacimiento que vayan desapareciendo una vez que se llega a la edad adulta, un elemento experimental presente en el ratón, los simios y la mosca. Segundo, el modelo debe presentar un déficit motriz detectable, algo que no se ha logrado en el ratón y que resulta complicado determinar en simios. Tercero, el modelo debe presentar la formación de los característicos cuerpos de Lewy. Cuarto, si el modelo es genético, debe estar basado en una mutación simple que permita su propagación rápida y de manera relativamente sencilla. Por último, los efectos deben presentarse en un corto período de tiempo, permitiendo hacer más análisis a menos costo.

- i. *6-hidroxidopamina*. Una inyección de este compuestos en la sustancia nigra provoca la acumulación de esta toxina en las neuronas dopaminérgicas y, tras una generación de radicales libres, su muerte. Aunque sí se puede caracterizar un déficit motriz en ratones inyectados con esta toxina (movimientos de rotación), no ha sido posible generar cuerpos de Lewy y la pérdida de neuronas no solamente se limita a las dopaminérgicas.
- ii. *Rotenona*. Se ha señalado en estudios epidemiológicos que la exposición a ciertos pesticidas son un factor de riesgo para desarrollar Parkinson. La rotenona, un insecticida relativamente común, inhibe fuertemente el complejo I de la cadena respiratoria y cuando se administra en ratas, genera déficit motriz, pérdida gradual de neuronas dopaminérgicas e inclusiones celulares inmunopositivas a  $\alpha$ -sinucleína.

Sin embargo, el problema de la rotenona como modelo es que afecta de manera diferente a los individuos a los que se les administra. Por ejemplo, solamente 12 de 25 ratas tratadas con una dosis estandarizada de rotenona desarrollan lesiones, por lo que estudios a gran escala resultarían muy costosos y poco eficientes.

iii. *Modelos de  $\alpha$ -sinucleína en ratón.* Los ratones que no expresan  $\alpha$ -sinucleína son viables, fértiles y presentan un desarrollo cerebral normal y, de manera muy interesante, no se observa en ellos un fenotipo parkinsoniano típico, sugiriendo que la ausencia de la función de la  $\alpha$ -sinucleína no es un factor causal de la enfermedad, y que las mutaciones asociadas con el Parkinson familiar deben más bien estar relacionadas con una ganancia de función. Sin embargo, estos ratones sí muestran una disminución en los niveles de dopamina en el estriado, lo que señala a la sinucleína como un modulador del metabolismo de la dopamina. En ratones que sobreexpresan a la  $\alpha$ -sinucleína silvestre y sus mutantes, se llegan a observar agregados de ésta pero, a diferencia de lo que ocurre en el Parkinson, las inclusiones no se forman únicamente en el citoplasma de las neuronas, sino también en el núcleo. Además, las inclusiones no son siquiera parecidas a los característicos cuerpos de Lewy y, aunque se pierden terminales dopaminérgicas, no se ha encontrado una pérdida de neuronas dopaminérgicas en la sustancia nigra. Los problemas motrices son ligeros incluso a tiempos largos, después de un año de edad, de manera que las conclusiones obtenidas por este modelo son poco claras.

iv. *Modelo de MPTP.* La neurotoxina 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), es un subproducto de la manufactura de algunos análogos de la heroína y, como mencioné en la sección *factores ambientales*, fue descubierta gracias a que algunos drogadictos que la consumieron desarrollaron síntomas severos de parkinsonismo. Una vez que se aisló, se generaron modelos de Parkinson en ratón y

primates a partir de la administración de MPTP. El MPTP es metabolizado en los astrocitos como 1-metil-4-fenilpiridinio (MPP<sup>+</sup>) por la enzima monoamina oxidasa B. El MPP<sup>+</sup> es transportado exclusivamente al interior de las neuronas dopaminérgicas donde se acumula en mitocondrias, inhibiendo fuertemente la función del complejo I de la cadena respiratoria, reduciendo la generación de ATP e incrementando enormemente la producción de radicales libres altamente tóxicos para la célula. La toxicidad provocada por el MPTP en primates genera las características clásicas de los pacientes con Parkinson, y ha servido enormemente para conocer los circuitos del estriado involucrados en los mecanismos de esta enfermedad, dado que las neuronas más afectadas son precisamente las de la sustancia nigra. Otras zonas del cerebro también se afectan, pero lo hacen de manera muy similar a como ocurre en humanos. La utilización de MPTP como modelo también ha permitido encontrar agentes neuroprotectores que en general se encargan de interferir con las vías apoptóticas y con la generación de radicales libres. Estas sustancias podrían formar parte de terapias en contra de la enfermedad de Parkinson. Sin embargo, una gran diferencia entre este modelo y el Parkinson es que la administración de MPTP no genera inclusiones similares a cuerpos de Lewy.

- v. *Expresión de  $\alpha$ -sinucleína en Drosophila.* En el año 2000, Feany y Bender publicaron una investigación en la cual expresaron el gen humano de la  $\alpha$ -sinucleína y sus mutantes A53T y A30P en moscas transgénicas. Los resultados arrojaron conclusiones muy importantes. Por un lado, se observó degeneración específica de neuronas dopaminérgicas con respecto al tiempo, déficit motriz y la formación de inclusiones muy similares a cuerpos de Lewy, algo difícil de lograr con otros modelos de Parkinson, lo que ha hecho a la mosca un modelo ejemplar en el estudio de enfermedades neurodegenerativas y, en particular, del Parkinson, dado que se

pueden expresar de manera tejido-específica las proteínas involucradas en su patogénesis. Además, determinó que el fenotipo observado es independiente de la  $\alpha$ -sinucleína que se esté expresando, es decir, no hay diferencias significativas entre los efectos causados por la  $\alpha$ -sinucleína silvestre y sus mutantes A30P y A53T.

La mosca de la fruta resulta un muy buen modelo experimental para estudiar la EP por diversas razones: En principio, es un organismo que cuenta con un sistema nervioso lo suficientemente complejo como para poder extrapolar algunos de los resultados obtenidos en ella a fenómenos que ocurren en cerebros tan complejos como el del humano y, al mismo tiempo, es mucho más sencillo de utilizar, dado que la mosca cuenta solamente con unas 200,000 neuronas, un número mucho menor al del cerebro humano. *Drosophila* tiene un ciclo de vida muy corto (poco más de 70 días desde la etapa embrionaria hasta la muerte), lo que permite realizar estudios de envejecimiento en un período de tiempo muy corto. La genética en *Drosophila* también es otra ventaja, ya que obtener una mosca transgénica requiere mucho menos tiempo y es más sencillo generarla comparada con, digamos, un ratón transgénico. Por si fuera poco, mantener un gran número de moscas es también muy sencillo; varios cientos de moscas pueden conservarse en el espacio que ocuparía un solo ratón. Herramientas de expresión bipartita establecidas en *Drosophila* como UAS-GAL4 (que permiten expresar genes de interés en tejidos específicos) hacen de la mosca un modelo experimental bastante atractivo. Este sistema aprovecha el activador transcripcional de levadura GAL4, capaz de reconocer una secuencia UAS (upstream activating sequence) en regiones del genoma. Cuando GAL4 se une a su secuencia UAS, los genes que se encuentran río debajo serán transcritos por la actividad de GAL4. Si no se encuentra GAL4, estos genes bajo el control de UAS no se transcriben. Este sistema fue introducido por Perrimon y colaboradores (1993) en *Drosophila*. Generaban moscas con construcciones

que llevaran el activador transcripcional GAL4 controlado por promotores específicos, ya fueran ubicuos (como el promotor de actina que se expresa en todo el cuerpo, por ejemplo) o específicos para algún tipo de tejido (como el de la tirosina hidroxilasa, que se expresa únicamente en las neuronas dopaminérgicas de la mosca). También generaron moscas que llevan genes de interés río debajo de la secuencia UAS que reconoce GAL4, por ejemplo, a la proteína verde fluorescente (GFP). De este modo, cuando se cruzan estas dos líneas de moscas transgénicas la progenie que hereda ambos componentes del sistema (tanto GAL4 controlado por un promotor específico, como la secuencia UAS río arriba de algún gen de interés) éste se expresará solamente en los tejidos en donde se exprese GAL4. Si bien es cierto que algunas de las características de la EP no pueden ser recapituladas en la mosca (como la degeneración de la sustancia nigra o problemas específicos del estriado), también es cierto que la relación costo-beneficio resulta altamente favorable para *Drosophila*.

**Tabla 1.** Características de modelos animales para la enfermedad de Parkinson.

Modelo	Pérdida gradual de neuronas DA en estado adulto	Déficit motriz fácilmente detectable	Desarrollo de cuerpos de Lewy	Basado en mutación simple	Período de tiempo corto
Expresión $\alpha$ -sinucleína en <i>Drosophila</i>	Si	Si	Si	Si	Si
Rotenona	Si (variable)	Si	Si	N.A.	Si
MPTP agudo	No	Si	No	N.A.	Si
Sobreexpresión $\alpha$ -sinucleína en ratón	Sí, pero no en sustancia nigra	Si	Inclusiones nucleares y citoplásmicas	N.A.	No
6-hidroxi dopamina	No	Si	No	N.A.	Si



## 1.4 Justificación

En el laboratorio del Dr. Enrique Reynaud en el Instituto de Biotecnología de la UNAM, se generó un modelo de estudio basado en la expresión transgénica de los genes humanos que codifican a la  $\alpha$ -sinucleína y a la proteína que interactúa principalmente con ella, la sinfilina, de manera específica en las neuronas dopaminérgicas de *Drosophila melanogaster* para estudiar sus funciones. Los fenotipos resultantes serán debidos a la presencia de estas dos proteínas, dado que ni la  $\alpha$ -sinucleína ni la sinfilina tienen homólogos funcionales en *Drosophila*. Entender el componente genético que sienta las bases que predisponen a los individuos a desarrollar esta enfermedad debe ser un esfuerzo conjunto en la investigación científica tanto básica como aplicada, dado que si entendemos cómo es que relaciones normales entre distintas proteínas son modificadas en el mal de Parkinson, podremos atacar de manera mucho más fina las bases que tanto se le han escapado a las técnicas epidemiológicas que, si bien han permitido relacionar componentes ambientales con la adquisición y desarrollo del Parkinson, también han minimizado el papel que juegan los factores genéticos. Si entendemos cómo funcionan los genes relacionados con la enfermedad de Parkinson, seremos capaces de anticipar un diagnóstico en pacientes predispuestos pero asintomáticos, y así mejorar enormemente la calidad de vida de las personas que alcanzan edades avanzadas. Resulta interesante recalcar que, aunque se sabe de la presencia de la sinfilina en los cuerpos de Lewy y cómo ésta tiende a interactuar fuertemente con la  $\alpha$ -sinucleína, los estudios acerca de dicha interacción son muy escasos y los resultados que se obtengan seguramente serán valiosos en varios niveles. Así como las actividades cognitivas complejas se basan en la jerarquización de circuitos neuronales, las bases moleculares de las enfermedades también se pueden reducirse en

muchos casos a interacciones proteína-proteína que van adquiriendo complejidad a medida que se agregan elementos a la ecuación. Si somos capaces de entender cómo es que funciona uno de los módulos basales (en este caso, la interacción de la  $\alpha$ -sinucleína y sus mutantes con la sinfilina), estaremos, sin duda, un paso más cerca de entender los mecanismos del Parkinson.

### **1.5 Hipótesis**

Si la alfa-sinucleína y la sinfilina están directamente involucradas en el mal de Parkinson, entonces la coexpresión de ambas proteínas en el sistema nervioso de *Drosophila melanogaster* generará un fenotipo particular que será distinto al derivado de la expresión independiente de cada una de estas proteínas.

### **1.6 Objetivo general.**

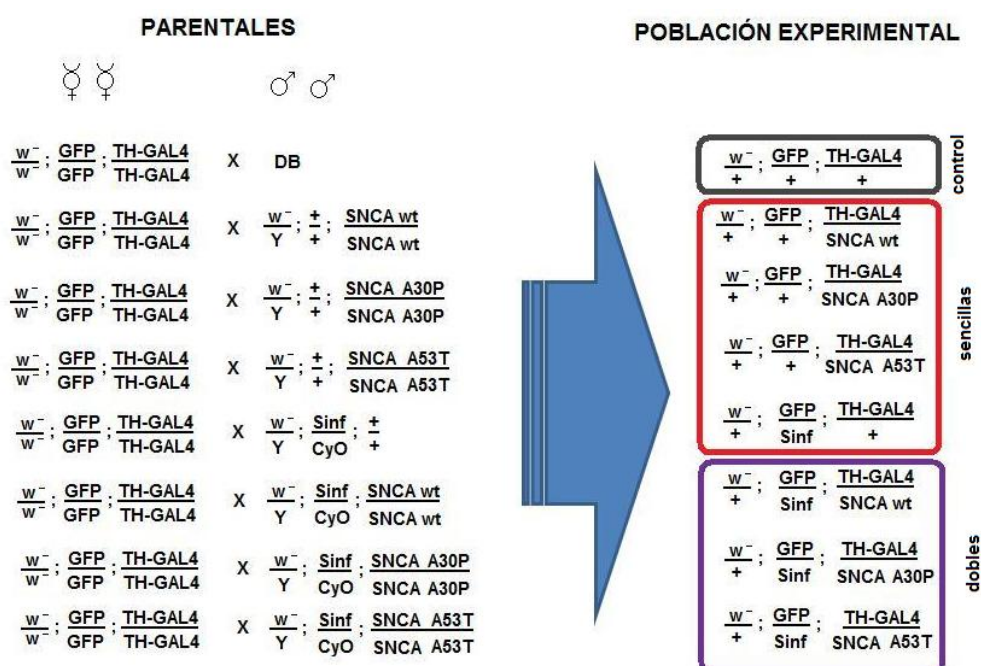
Determinar los efectos que genera la expresión independiente y la coexpresión de la  $\alpha$ -sinucleína y sus mutantes con la sinfilina en el sistema nervioso de *Drosophila melanogaster*.

## **II. MATERIALES Y MÉTODOS.**

*Líneas transgénicas.* Las moscas transgénicas que expresan la  $\alpha$ -sinucleína fueron obtenidas directamente del banco de *Drosophila* en Bloomington, en la universidad de Indiana, Estados Unidos (flystocks.bio.indiana.edu). De ahí se obtuvieron también moscas que expresan a las mutantes A53T y A30P de la  $\alpha$ -sinucleína, todas ellas inserciones en el cromosoma 3 de *Drosophila*. Las moscas que llevan la construcción de la sinfilina fueron generadas previamente en el laboratorio.

En el laboratorio se obtuvieron líneas que fueron denominadas como sencillas (aquellas que expresan sólo una de las proteínas humanas, sea  $\alpha$ -sinucleína silvestre, A53T, A30P o sinfilina) y dobles (las que expresan las dos proteínas humanas en la

misma mosca). Una vez que se estabilizaron las líneas, los machos obtenidos se cruzaron con hembras vírgenes que llevan el activador transcripcional GAL4 fusionado con el gen de la tirosina hidroxilasa (TH), de manera que, cuando la progenie hereda el gen humano de interés (ya sea  $\alpha$ -sinucleína y/o sinfilina) bajo el control de una secuencia UAS, este gen se expresa únicamente en las células que expresen GAL4, es decir, solamente las células que expresen a la TH (Fig. 8). Dado que en *Drosophila* las únicas neuronas catecolaminérgicas son las dopaminérgicas, y dado que los insectos no cuentan con neuronas ni adrenérgicas ni noradrenérgicas, el marcador de TH es universalmente aceptado en la mosca como específico de neuronas dopaminérgicas. Además, estas líneas también llevan la construcción UAS-GFP, de manera que la proteína verde fluorescente dirige su expresión de manera específica a las neuronas dopaminérgicas. De este modo, en el laboratorio se obtuvieron moscas que expresan en las neuronas dopaminérgicas, a las proteínas humanas  $\alpha$ -sinucleína y sinfilina en diferentes combinaciones (Tabla 3), además de expresar a la proteína verde fluorescente. Así fue posible cuantificar el número de neuronas dopaminérgicas en cada condición genética, y cómo éste va disminuyendo a medida que las moscas envejecen.



**Figura 8.** Esquema de las cruizas utilizadas en esta tesis. DB: *Double balancer*.

*Conteos neuronales y estadística en moscas adultas.* Se contabilizaron las neuronas en moscas de cada condición genética a 1, 15, 30, 45 y 60 días posteriores a la eclosión en al menos cinco individuos en cada punto. Brevemente, se anestesian con CO<sub>2</sub>, y se separan por genotipo y edad. Una vez separadas, se sumergen en alcohol al 70% entre 30 y 60 segundos para remover el exceso de aceites que llevan en la cutícula, lo que facilita el manejo. De ahí se transfieren a pozos de disección con PBS: en mM (137 NaCl, 2.7 KCl, 10 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y 1.7 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), pH 7.4. Con ayuda de un par de fórceps de disección y bajo un estereomicroscopio Zeiss Stemi 2000-C, se remueven las patas y las alas de la mosca, de manera que la región ventral quede hacia arriba. Para obtener el sistema nervioso completo, se corta cuidadosamente el tórax de la mosca y se separa la cutícula que cubre las patas. Una vez que el ganglio torácico abdominal (GTA) se observa, todo el tejido que lo rodea se remueve. Una vez que el GTA está limpio, se toma firmemente la probóscide con uno de los fórceps y con el otro se toma la parte trasera de la cabeza, y se jalan para lados opuestos. Esto debe liberar la probóscide, dejando un hueco al frente de la cabeza que permite tener un manejo más sencillo de la cabeza. Así, cada par de fórceps debe tomar un extremo de este hueco que se acaba de formar y jalar para lados opuestos. Esto debe liberar el cerebro sin cutícula. Una vez obtenido, sólo hace falta remover las tráqueas que rodean al sistema nervioso, tras lo cual se fija con formaldehído al 4% en PBS durante 20 minutos. Posteriormente se realizan tres lavados consecutivos con PBS y se monta el cerebro en 14 µl de citifluor (Ted Pella, Inc.). Los conteos neuronales se llevan a cabo indistintamente en microscopio de fluorescencia y confocal y los datos resultantes se analizan en el paquete informático Sigma Plot. Las comparaciones se hacen únicamente entre un punto y otro de las curvas por una prueba t-Student.

*Inmunohistoquímica.* Para comprobar que la  $\alpha$ -sinucleína se esté expresando en las neuronas dopaminérgicas de las moscas transgénicas, se realizaron ensayos de inmunohistoquímica con los que se pretendió co-localizar la expresión de la  $\alpha$ -sinucleína con la de la GFP. Para hacerlo, cerebros de moscas adultas de 60 días fueron disectados como se describió en la sección anterior. Una vez fijados por 20 minutos en paraformaldehído al 4%, se transfirieron a fijador fresco durante 50 minutos adicionales. Transcurrido este tiempo, se hicieron tres lavados rápidos en PBT (0.3% tritón X/PBS), de cinco minutos cada uno. Se procedió a agregar el bloqueo, una solución al 4% de suero de chivo/PBT (400  $\mu$ l/10 ml PBT) para bloquear todas las regiones no específicas de unión a anticuerpos, durante una hora a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se añadió el primer anticuerpo, anti- $\alpha$ -sinucleína de ratón a una concentración 1:50 durante toda una noche a 4°C en la solución bloqueadora con suero de chivo previamente utilizada. El anticuerpo se recuperó y almacenó a 4°C, lo que permitió reutilizarlo en un par de repeticiones más. Una vez transcurrido el tiempo de incubación del anticuerpo primario contra la  $\alpha$ -sinucleína, se lavó tres veces en PBT, por cinco minutos cada una, tras lo cual se procedió a agregarle el anticuerpo secundario (alexa anti-ratón 1:500 en 4% de suero de chivo/PBT) a temperatura ambiente durante dos horas. El anticuerpo secundario también puede ser recuperado, almacenado a 4°C y reutilizado en otra sesión. Posteriormente, se lavaron los cerebros tres veces, durante cinco minutos cada una con PBS, para eliminar los restos de Tritón X. Finalmente los tejidos se montaron en 14  $\mu$ l de citifluor (Ted Pella, Inc.), sellados con barniz de uñas común y se observaron bajo microscopio confocal. Con la misma metodología se realizaron inmunotinciones utilizando anticuerpos anti-oligómeros de  $\alpha$ -sinucleína, (Biosource), y Cy3 acoplado a un anticuerpo secundario.

*Curva de supervivencia.* Cohortes de al menos 100 individuos de cada genotipo fueron monitoreados para determinar su supervivencia. Las moscas fueron mantenidas en medio normal de maíz, y cambiado por uno fresco cada dos o tres días. La mortalidad fue anotada diariamente y analizada como porcentaje (moscas sobrevivientes/moscas nacidas). El experimento se repitió dos veces.

*Ensayo de movilidad.* Se determinó la capacidad de movimiento de las moscas de cada genotipo analizando su capacidad de “escalar” (geotaxis negativa). Cohortes de diez machos fueron anestesiados y colocados en viales de plástico de 10 cm de altura y, tras 30 minutos de recuperación de la anestesia, el tubo fue golpeado para colocar a las moscas en el fondo del vial. Se analizó el porcentaje de moscas que alcanzaron una línea arbitraria colocada a siete centímetros del fondo del vial, en un tiempo de diez segundos. El experimento se realizó a 1, 15, 30, 45 y 60 días de eclosionadas, y en cada genotipo y edad se repitió tres veces. Una vez más, el análisis estadístico fue comparación de punto contra punto de la curva, utilizando la prueba t-Student.

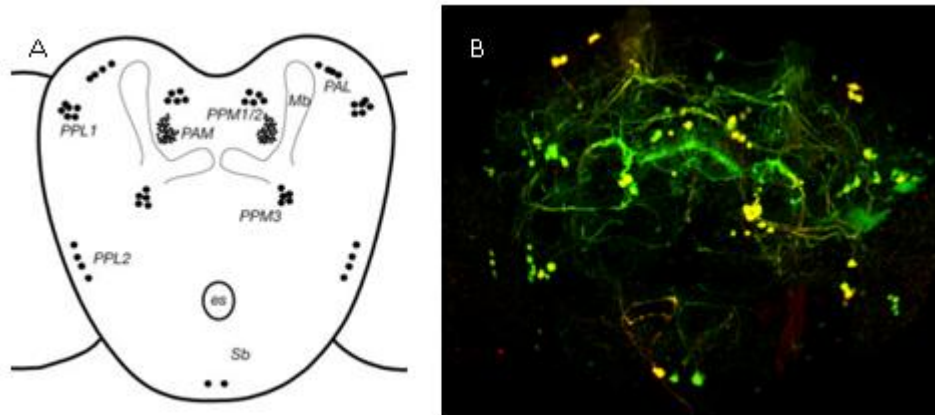
### **III. RESULTADOS**

*La sinfilina y la mutante  $\alpha$ -sinucleína A30P son las más tóxicas para las neuronas dopaminérgicas.*

Para determinar el papel que podrían desempeñar las proteínas humanas en el mal de Parkinson, en el laboratorio se decidió realizar conteos neuronales en diferentes combinaciones genéticas (Figura 8). Dado que Feany y Bender en el 2000 demostraron que la expresión de  $\alpha$ -sinucleína de manera específica en la retina de *Drosophila* (con el driver *GMR*) provoca una degeneración de ésta mucho más evidente con respecto a la que se observa en condiciones de envejecimiento normales, y que cuando se expresa de manera ubicua en el sistema nervioso (con el driver panneural *elav*) la movilidad se ve también mucho más afectada, la cuestión era determinar si este efecto se puede observar

también a nivel de muerte neuronal en el sistema nervioso. Para hacerlo, utilizamos el driver de la tirosina-hidroxilasa (TH) específico de neuronas dopaminérgicas, lo que permitió establecer de manera mucho más sencilla la ausencia o presencia de neuronas, dado que la metodología permite hacerlo en mucho menos tiempo y sin la necesidad de realizar inmunotinciones.

En el cerebro de la mosca adulta están descritos al menos seis conjuntos de neuronas dopaminérgicas en cada hemisferio, positivos todos para la tinción contra tirosina-hidroxilasa (Friggi-Grelin, 2003; Liu, 2008). Nosotros, partiendo de los mapas descritos (Figura 9, panel A), pudimos determinar que la expresión independiente de cada una de estas proteínas ligadas al mal de Parkinson genera los fenotipos más acusados en términos de degeneración neuronal. Como se puede observar en la tabla 2, mientras que todas las líneas con las que se cuenta en el laboratorio eclosionan con aproximadamente el mismo número de neuronas dopaminérgicas ( $45.9 \pm 1.2$  en el cerebro y  $18.5 \pm 0.7$  en el ganglio torácico abdominal; número promedio de neuronas  $\pm$  error estándar), las que a los 60 días de edad tienen la menor cantidad son aquellas que expresan cualquiera de las proteínas humanas de manera independiente (a las que denominamos *sencillas*) pero, de manera muy interesante, dentro de este grupo resultan mucho más agresivas la sinfilina ( $24.6 \pm 1.5$  en el cerebro y  $10.6 \pm 1.2$  en el GTA) y la  $\alpha$ -sinucleína A30P ( $28.7 \pm 1.9$  en el cerebro y  $12.4 \pm 1.8$  en el GTA) con respecto al grupo control ( $33.5 \pm 1.8$  en el cerebro y  $14.6 \pm 1.2$  en el GTA). Se consideró que  $p < 0.05$  representa una diferencia significativa.



**Figura 9.** La construcción *TH-GAL 4* induce la expresión genética de manera específica a las neuronas dopaminérgicas en el sistema nervioso de *Drosophila*. En el panel A se muestra de manera esquemática el patrón en el que se distribuyen las neuronas dopaminérgicas en el sistema nervioso central de *Drosophila* (Friggi-Grelin et al 2002). En el panel B se muestra la misma construcción inmunoteñida en el laboratorio. Nótese que el patrón es el mismo que el obtenido por Friggi-Grelin y sus colaboradores.

**Tabla 2.** Número promedio de neuronas dopaminérgicas por condición genética y edad.

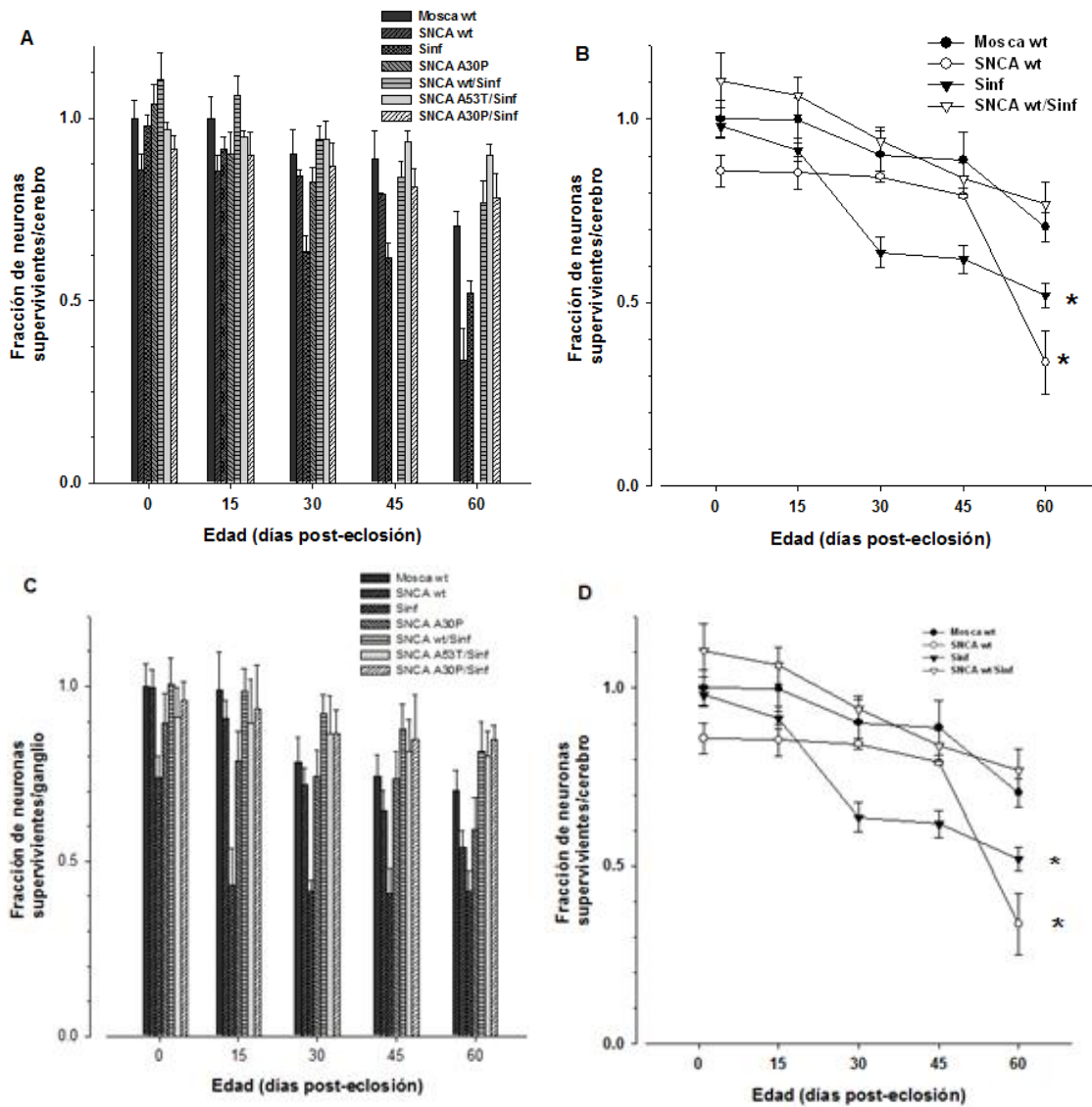
Edad	Control	SNCA wt	Sinf	SNCA A30P	Sinf;SNCA wt	Sinf;SNCA A53T	Sinf;SNCA A30P
1	47.43 ± 2.40	40.67 ± 2.06	46.50 ± 1.31	49.25 ± 2.66	52.43 ± 3.58	46.00 ± 0.91	43.40 ± 1.72
15	47.33 ± 2.90	40.50 ± 2.08	43.44 ± 1.52	42.86 ± 2.84	50.48 ± 2.45	45.00 ± 0.88	42.60 ± 3.12
30	42.83 ± 3.06	40.00 ± 0.67	30.18 ± 1.98	39.10 ± 1.96	44.67 ± 1.79	44.67 ± 2.34	41.17 ± 3.03
45	42.17 ± 3.62	37.50 ± 0.29	29.33 ± 1.82	30.10 ± 1.85	39.75 ± 2.03	44.38 ± 1.45	38.50 ± 2.44
60	33.50 ± 1.85	16.00 ± 4.08	24.67 ± 1.56	19.27 ± 2.04	36.45 ± 2.93	42.67 ± 1.45	37.17 ± 3.16

En la tabla se muestra el número promedio de neuronas dopaminérgicas por edad (en días) y condición genética ± el error estándar.

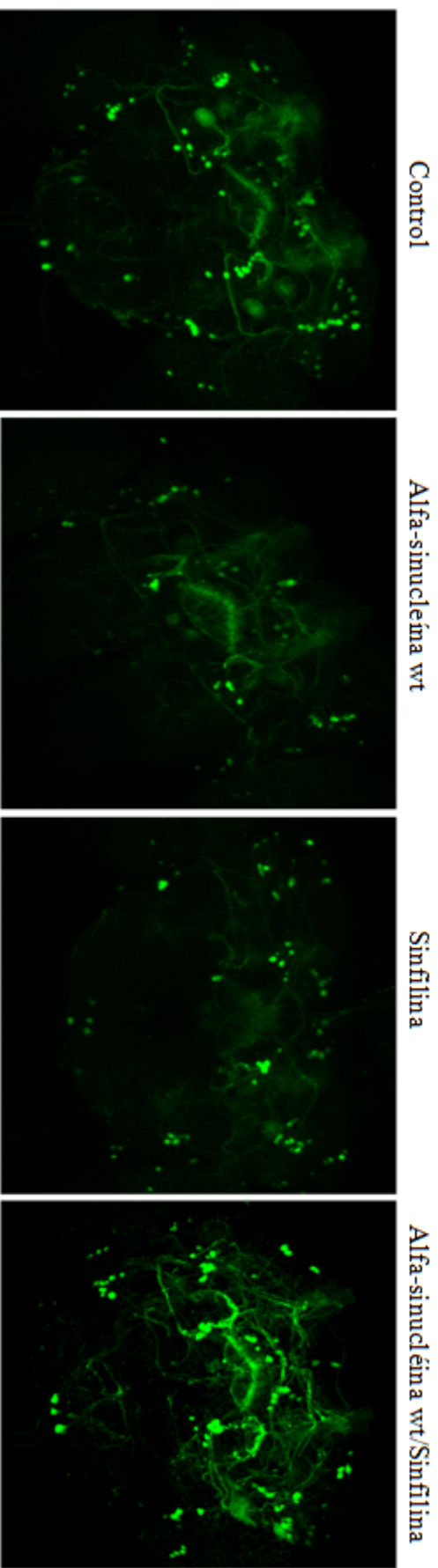
*La co-expresión de  $\alpha$ -sinucleína y sinfilina en las neuronas dopaminérgicas neutraliza la toxicidad de ambas proteínas y evita la degeneración neuronal.*

Una vez que se determinó que el efecto de la  $\alpha$ -sinucleína no sólo es agresivo en la retina y en la movilidad, sino también en la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas de todo el sistema nervioso de *Drosophila*. El siguiente punto fue establecer el fenotipo resultante de la coexpresión de la  $\alpha$ -sinucleína con la sinfilina. Para hacerlo, utilizamos el driver de la tirosina-hidroxilasa para expresar específicamente en las neuronas dopaminérgicas a las dos proteínas, junto con la GFP.





**Figura 10 A.** La expresión independiente tanto de sinfilina como de  $\alpha$ -sinucleína silvestre dirigida de manera específica a las neuronas dopaminérgicas con el driver de tirosina-hidroxilasa promueve su degeneración. En los paneles A y C se muestran los resultados obtenidos en las siete diferentes combinaciones genéticas tanto en el cerebro como en el ganglio torácico abdominal, respectivamente. Los paneles B y C muestran de manera simplificada los casos más significativos de muerte y protección neuronal. Nótese que tanto en el ganglio torácico abdominal como en el cerebro la sinfilina es la proteína más agresiva, seguida inmediatamente por la  $\alpha$ -sinucleína silvestre. Sin embargo, la expresión conjunta de estas dos proteínas inhibe la toxicidad y recupera el fenotipo silvestre. Los asteriscos denotan una diferencia significativa en una prueba t-Student con respecto al control ( $p < 0.05$ ). Ver imágenes de microscopía confocal en la página siguiente.



**Figura 10 B.** Sistema nervioso de mosca 60 días que expresan bajo diferentes combinaciones a las proteínas alfa-sinucleína y/o sinfilina. Nótese que la mosca control mantiene un número razonable de neuronas incluso a los sesenta días de edad. Sin embargo, tanto la mosca que expresa alfa-sinucleína silvestre y sinfilina por separado (paneles centrales) muestran un número considerablemente reducido de neuronas dopaminérgicas. Por el contrario, las moscas en las que se coexpresaron la alfa-sinucleína y la sinfilina mostraron un evidente abatimiento de la toxicidad que generan por separado. Este fenómeno de inhibición de la toxicidad se observó en todas las líneas transgénicas dobles, es decir, el proceso citoprotector se desarrolla sin que sea un factor fundamental la presencia o ausencia de las mutaciones en el gen de la alfa-sinucleína.

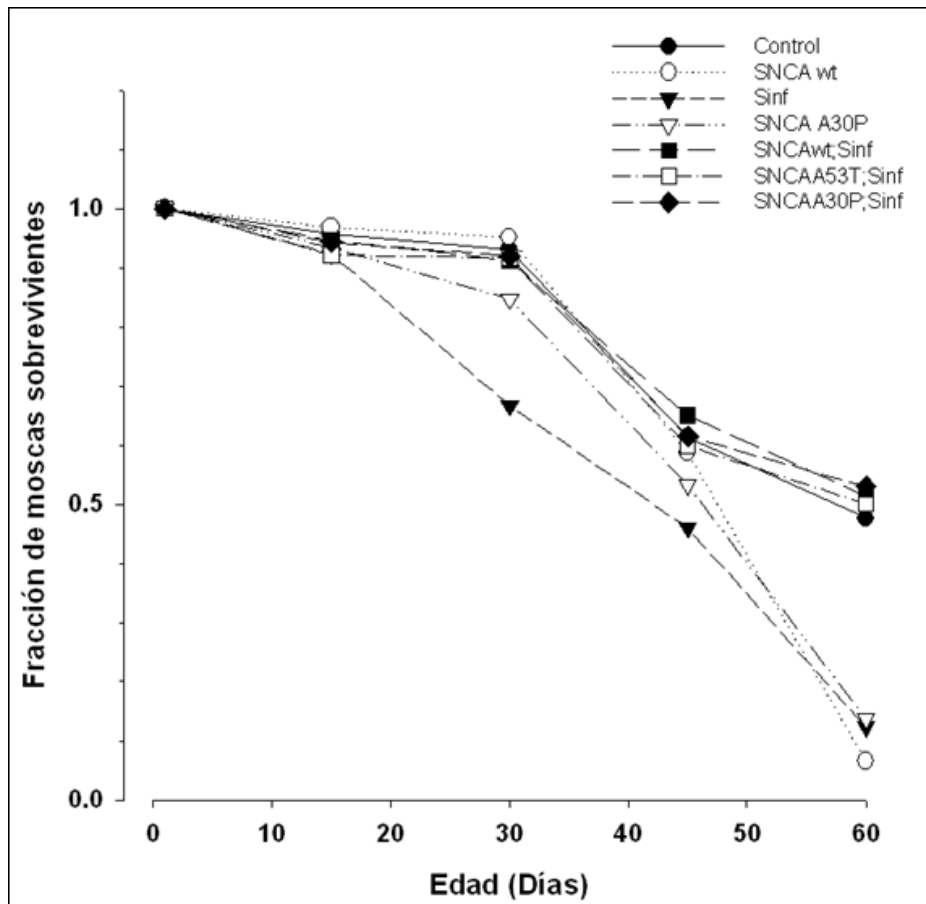
Estas líneas fueron denominadas *dobles* (Fig. 8), y el resultado fue notable: La alta toxicidad que genera cada una de estas proteínas expresadas de manera independiente se elimina de manera completa, y el hecho más remarcable no es sólo que las neuronas se degeneran a una menor tasa que las transgénicas *sencillas*, sino que lo hacen de una forma mucho más similar a nuestro control e, incluso, la coexpresión parece ser no solamente no tóxica sino también protectora.

*La expresión independiente de  $\alpha$ -sinucleína y sinfilina genera mortandad temprana y daños en la capacidad de movimiento.*

En el laboratorio utilizamos curvas de supervivencia para analizar si es que la expresión independiente de  $\alpha$ -sinucleína y sinfilina causa o no problemas en la viabilidad de las moscas que la llevan. Los resultados revelaron que la expresión independiente de  $\alpha$ -sinucleína silvestre,  $\alpha$ -sinucleína A30P y sinfilina provocan mortalidad prematura (Figura 11). Las edades a las que el 50% de las moscas transgénicas de  $\alpha$ -sinucleína silvestre,  $\alpha$ -sinucleína A30P y sinfilina sobrevivieron fueron, en los tres casos, cercanos a 40 días, mientras que para los controles fueron próximos a los 60 días.

Para determinar las diferencias en comportamiento generadas por la expresión de  $\alpha$ -sinucleína silvestre,  $\alpha$ -sinucleína A30P y sinfilina en neuronas dopaminérgicas, en el laboratorio utilizamos el ensayo de movilidad (prueba de geotaxis negativa). Cuando son enviadas al fondo de un vial, casi todas las moscas de nuestra línea control (UAS-GFP/CyO;TH-GAL4/MKRS) muestran habilidades de movimiento iguales estadísticamente hasta los 15 días, en donde casi el 100% de los individuos alcanzaba la marca arbitraria en los diez segundos disponibles para hacerlo. A medida que las moscas control envejecieron, éstas comenzaron a recorrer distancias cada vez menores cuando se aplicaba el ensayo. En lugar de avanzar una distancia normal, las moscas al

parecer sólo comienzan el movimiento para subir por el tubo, pero caen al fondo de ésta tras haber avanzado sólo algunos centímetros. Encontramos también que las moscas transgénicas jóvenes de  $\alpha$ -sinucleína silvestre,  $\alpha$ -sinucleína A30P y sinfilina se comportan de manera muy parecida a los controles, avanzando la misma distancia en cada ensayo. Sin embargo, el deterioro motriz que sufren las transgénicas es mucho más rápido y evidente que el que pasa en los controles (figura 12).

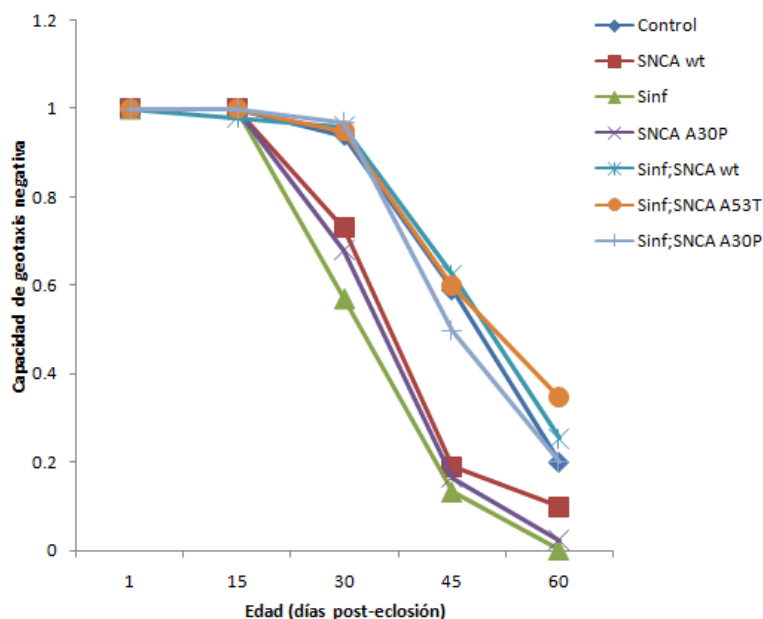


**Figura 11.** Curva de supervivencia de moscas transgénicas que expresan  $\alpha$ -sinucleína silvestre, A53T o A30P de manera independiente o en combinación con sinfilina. El control utilizado fue una mosca que expresó únicamente GFP bajo el control de la tirosina-hidroxilasa. Nótese que hay dos poblaciones claramente diferenciadas: Las moscas que expresan solamente una de las proteínas mueren mucho antes que aquellas que expresan tanto a la  $\alpha$ -sinucleína como a la sinfilina. Nótese también que no hay una diferencia clara entre el fenotipo generado por la  $\alpha$ -sinucleína silvestre y cualquiera de sus mutantes.

*La expresión conjunta de  $\alpha$ -sinucleína y sinfilina neutraliza la toxicidad y recupera el fenotipo silvestre de las moscas, tanto en la supervivencia como en la movilidad.*

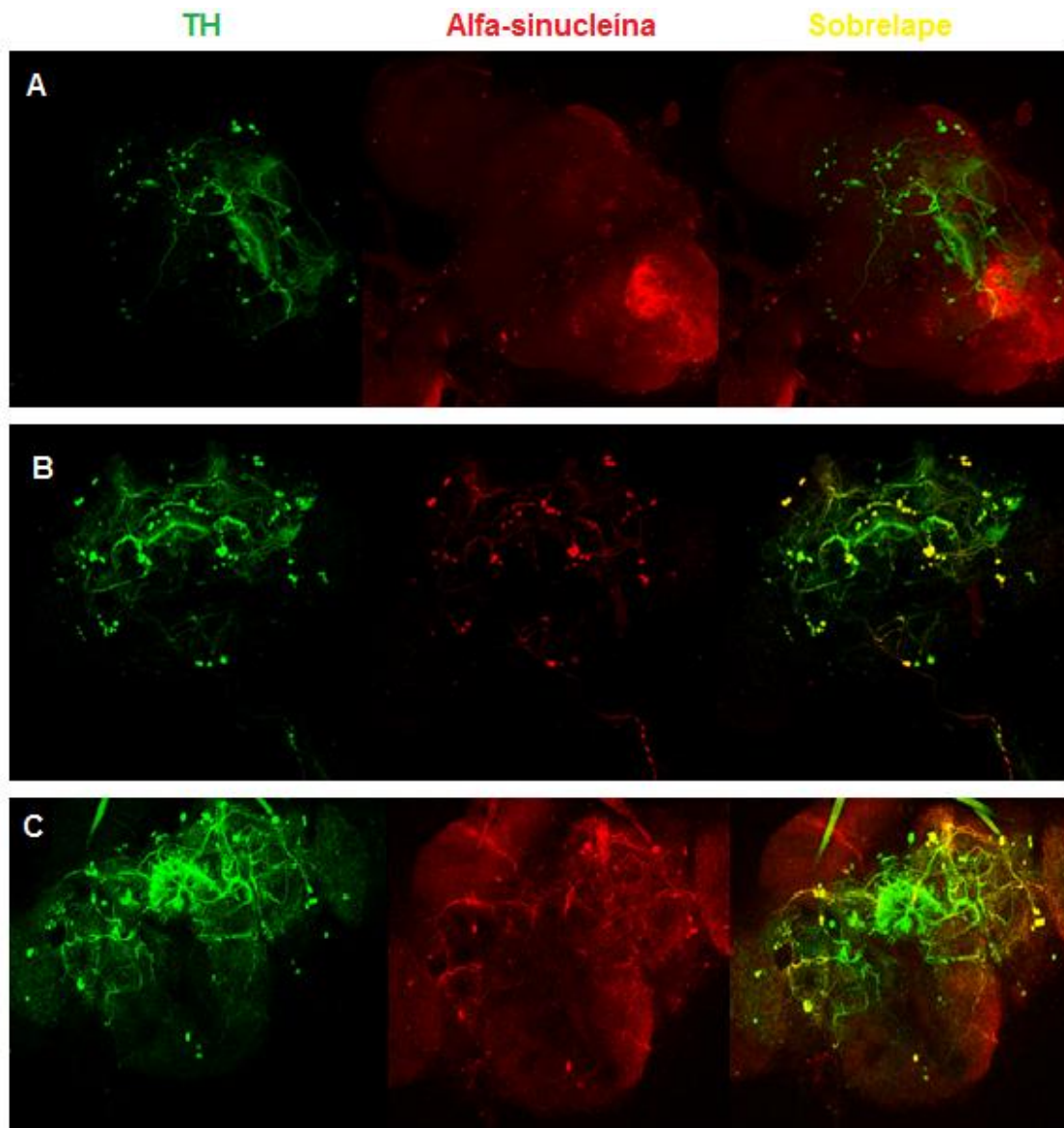
A diferencia de la expresión por separado de las proteínas humanas relacionadas al mal de Parkinson, cuando se coexpresan en las neuronas dopaminérgicas de *Drosophila* UAS-Sinf/GFP;TH-GAL4/SNCA wt, UAS-Sinf/GFP;TH.GAL4/SNCA A53T y UAS-Sinf/GFP;TH GAL4/SNCA A30P, la supervivencia de los individuos replica de manera muy cercana a la desarrollada por los controles utilizados. De este modo, el 50% de los individuos que expresaron  $\alpha$ -sinucleína silvestre-sinfilina,  $\alpha$ -sinucleína A53T-sinfilina y  $\alpha$ -sinucleína A30P-sinfilina sobrevivieron hasta los 60 días de edad (figura 11).

Del mismo modo en el que la coexpresión de  $\alpha$ -sinucleína y sinfilina mantiene la esperanza de vida de las moscas, también preserva sus habilidades motrices. Así, tenemos que las moscas transgénicas dobles (aquellas en donde se expresó tanto la alfa-sinucleína como la sinfilina) mantuvieron la geotaxis negativa de mucho mejor manera incluso a los 60 días de edad, en donde casi el 30% de los individuos analizados alcanzaron la marca arbitraria en la parte superior del vial (Figura 12).



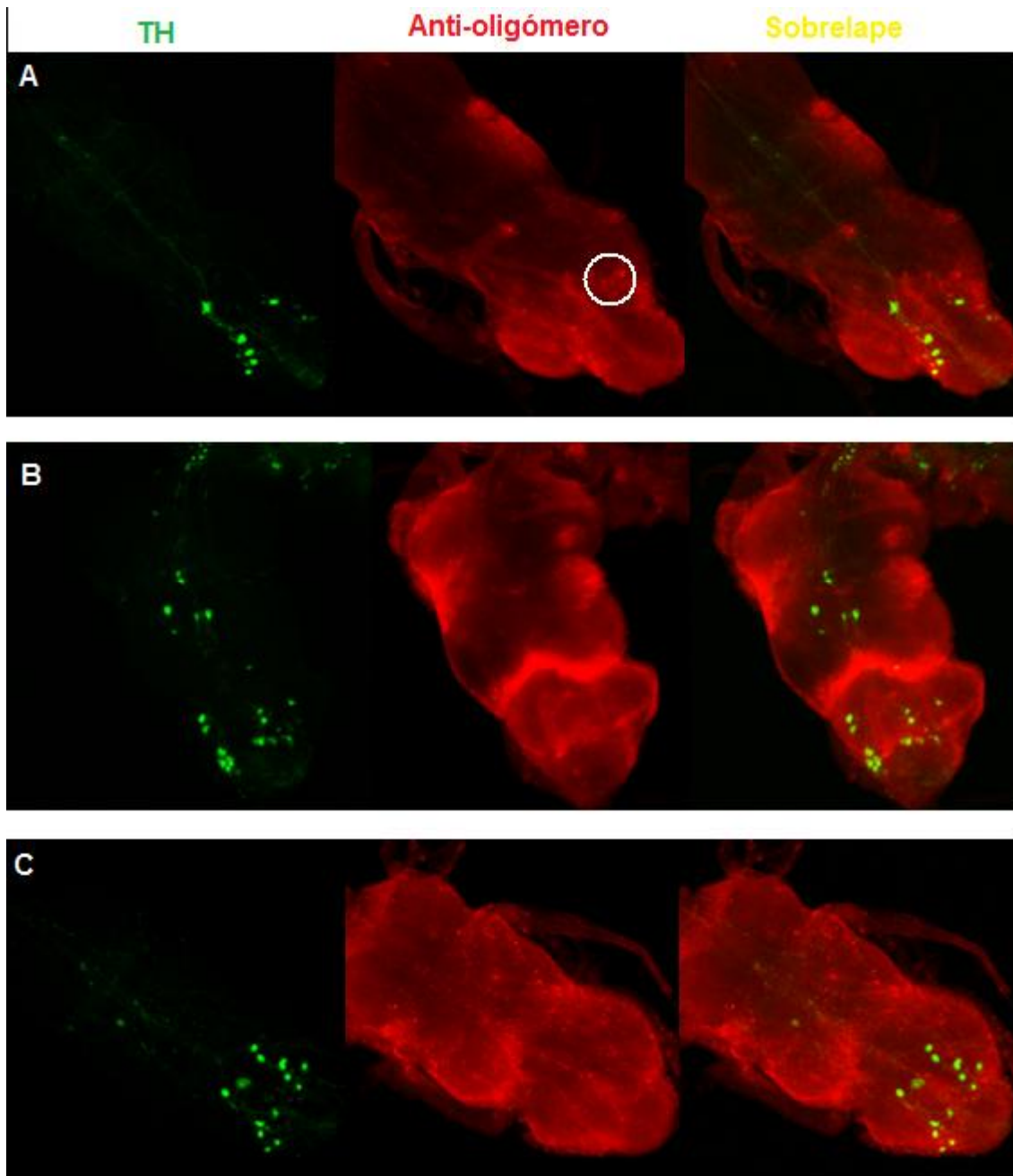
**Figura 12.** Pérdida prematura en la habilidad de escalar por las paredes del vial (geotaxis negativa). Las moscas que expresan solamente alfa-sinucleína silvestre y A30P o sinfilina (sencillas) son significativamente distintas a las moscas control desde el día 30. Sin embargo, las moscas que expresan tanto alfa sinucleína (silvestre y A30P) junto con la sinfilina (dobles), presentan un comportamiento de geotaxis negativa como los controles.

El fenotipo generado por la expresión independiente de  $\alpha$ -sinucleína o sinfilina no se debe al abatimiento de la expresión de  $\alpha$ -sinucleína. En la figura 13 se muestra que cuando se co-expresan ambas proteínas, el nivel de la  $\alpha$ -sinucleína se mantiene intacto incluso a los sesenta días de edad. También resulta interesante notar la aparición de agregados oligoméricos de  $\alpha$ -sinucleína. Aquellos individuos que expresan solamente a la  $\alpha$ -sinucleína tienden a formar pequeñas inclusiones citoplásmicas que son reconocidas por un anticuerpo anti-oligómeros de  $\alpha$ -sinucleína, además de un reducido número de neuronas dopaminérgicas. Sin embargo, las moscas que expresan ambas proteínas, además de conservar el número de neuronas, no presentan reactividad positiva para el anticuerpo antioligómeros (Figura 14).



**Figura 13.** La expresión de GFP controlada por el promotor de la tirosina hidroxilasa permitió determinar la presencia o ausencia de neuronas dopaminérgicas de manera específica, así como el efecto que tiene en su supervivencia la expresión de  $\alpha$ -sinucleína y sinfilina. En el panel A se muestra el cerebro de una mosca adulta control en la que no se expresó ni sinfilina ni  $\alpha$ -sinucleína. En verde se observa la expresión de GFP sólo en las neuronas dopaminérgicas, mientras que la tinción en rojo contra la  $\alpha$ -sinucleína no mostró ninguna respuesta positiva. En el panel B muestra una mosca que expresa tanto la  $\alpha$ -sinucleína (rojo) como la sinfilina. En el panel C se muestra una mosca de la misma edad que solamente expresa a la  $\alpha$ -sinucleína silvestre. Nótese que la expresión de las dos proteínas mantiene la supervivencia normal de las neuronas dopaminérgicas, mientras que cuando se expresa únicamente la  $\alpha$ -sinucleína, se degeneran cúmulos discretos de estas células (flechas). Las moscas disectadas e inmunoteñidas para los tres paneles tienen 60 días de edad.





**Figura 14.** En el ganglio torácico abdominal se encuentran también neuronas dopaminérgicas que responden diferencialmente a la expresión de cada proteína humana. En el panel A se muestra el ganglio torácico abdominal de una mosca de 30 días que expresa únicamente a la  $\alpha$ -sinucleína en las neuronas dopaminérgicas. Nótese las formaciones positivas para la tinción contra oligómeros (círculo blanco) y el reducido número de neuronas dopaminérgicas en la región. En el panel B se muestra el ganglio torácico abdominal de una mosca de la misma edad que expresa tanto a la sinucleína silvestre como a la sinfilina. Se encuentran más neuronas que en la anterior y no hay estructuras positivas para el anticuerpo contra oligómeros. En el panel C se muestra el ganglio torácico abdominal de una mosca con el mismo genotipo que la anterior (tanto  $\alpha$ -sinucleína como sinfilina) pero de menor edad (10 días). Nótese que sí hay estructuras positivas para la tinción contra oligómeros pero también que la arquitectura de las neuronas dopaminérgicas se encuentra estable.



#### IV. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Las enfermedades neurodegenerativas más comunes presentan características que las diferencian claramente entre sí, por ejemplo, las zonas del cerebro que afectan o las familias neuronales que se degeneran. Sin embargo, aún cuando las diferencias parecieran ser claras, una similitud importante entre muchas enfermedades neurodegenerativas radica precisamente en la formación de inclusiones proteicas en el cerebro, ya sea en el núcleo, citoplasma o en el parénquima extracelular de las neuronas. La formación de estos agregados parece no tener un origen común dentro de las enfermedades neurodegenerativas, pero podría representar, sin embargo, una estrategia general de defensa en contra de diversos factores tanto ambientales como genéticos que ponen en riesgo la estabilidad del sistema. Así, mientras que en la enfermedad de Alzheimer se forman placas amiloides fuera de las neuronas, en el Parkinson se forman cuerpos de Lewy en el citoplasma y núcleo de éstas.

En el laboratorio fue posible simular un modelo de Parkinson en *Drosophila* utilizando como premisa que la coexpresión de dos proteínas ligadas a esta enfermedad, la  $\alpha$ -sinucleína y la sinfilina, modificaría el fenotipo generado por cada una de ellas por separado. Al hacerlo de manera específica en las neuronas dopaminérgicas, bajo el control de la TH, fuimos capaces de determinar que, si se expresan independientemente, cada una de estas proteínas resulta altamente tóxica. La razón bien podría estar dada por la misma biogénesis de los propios agregados de  $\alpha$ -sinucleína que terminan generando cuerpos de Lewy (Figura 15): La  $\alpha$ -sinucleína comienza como un monómero que no tiene una conformación tridimensional nativa que, por diversos factores, tiende a agregarse en protofibras oligoméricas con altas concentraciones de estructuras  $\beta$ -plegadas, presumiblemente la especie más tóxica de la  $\alpha$ -sinucleína, dado que se ha demostrado que estos agregados ricos en conformaciones  $\beta$  se unen de manera mucho

más ávida a superficies membranales que los monómeros o las fibras, permeabilizando vesículas y destruyendo membranas celulares. Si se unen más oligómeros, entonces se forman fibras de carácter amiloide que eventualmente, y tras la interacción con otras proteínas, como la parkina y la sinfilina, se convierten en los cuerpos de Lewy (Fig. 7), que son agregados mucho menos tóxicos para la célula (Eliezer et al, 2001). Así, factores endógenos que prevengan la formación de las protofibras podrían representar un mecanismo de protección en contra de la acumulación de  $\alpha$ -sinucleína y, por lo tanto, del Parkinson. Por otro lado, factores que inhiban la conversión de las protofibras en fibras, y éstas a su vez en cuerpos de Lewy, podrían promover la acumulación de las especies tóxicas y acelerar el proceso degenerativo que implica el mal de Parkinson.

En esta tesis tratamos de entender el fenómeno de degeneración neuronal. Para esto utilizamos diferentes técnicas mediante las cuales nos fue posible determinar que tanto la  $\alpha$ -sinucleína como la sinfilina son altamente tóxicas cuando se expresan por separado, evidenciado por conteos neuronales que muestran que la degeneración de cúmulos de neuronas dopaminérgicas excede por mucho a la pérdida celular en procesos normales de envejecimiento en moscas silvestres. La expresión conjunta de estas dos proteínas (sin importar si se tratara de las mutantes de la  $\alpha$ -sinucleína o su forma silvestre) resultó ser una combinación protectora de los daños causados por la expresión de cada una de las proteínas por separado. Estas moscas no solo tienen el mismo porcentaje de supervivencia que las moscas silvestres, sino que además mantienen a sus poblaciones de neuronas dopaminérgicas virtualmente intactas a lo largo de su vida, superando, incluso, a los controles. El hecho de que sean ciertas poblaciones de neuronas dopaminérgicas las que resultan sistemáticamente afectadas en los individuos experimentales sencillos podría ser la base para identificar grupos neuronales discretos que estén involucrados en funciones específicas en la mosca, y sin

duda requeriría una investigación más detallada. Además, el entender por qué cada una de estas proteínas actúa diferencialmente en el ganglio torácico abdominal y en el cerebro también podría ser una perspectiva de estudios interesante.

Por otro lado, las inmunotinciones de cuerpos oligoméricos de alfa-sinucleína nos permitieron observar un fenómeno interesante: Aquellos individuos en donde se lograron encontrar formaciones que resultaran positivas a la tinción del anticuerpo anti-oligómeros, también resultaron ser los individuos en donde el número de neuronas reflejó el daño más profundo. Por el contrario, aquellos individuos en los que no se encontraron estructuras positivas para la tinción contra oligómeros tenían siempre el número más conservado de neuronas dopaminérgicas, y también una esperanza de vida semejante a los controles.

Lo anterior apoya de manera importante el modelo teórico que establece a los oligómeros como la especie más tóxica para la célula. Nuestros experimentos sugieren que si las neuronas logran convertir los oligómeros de  $\alpha$ -sinucleína en otra cosa, ya sea una fibra amiloide o, incluso, cuerpos de Lewy, inhiben la toxicidad que ostentan por separado tanto la sinfilina como la  $\alpha$ -sinucleína (Figura 12).

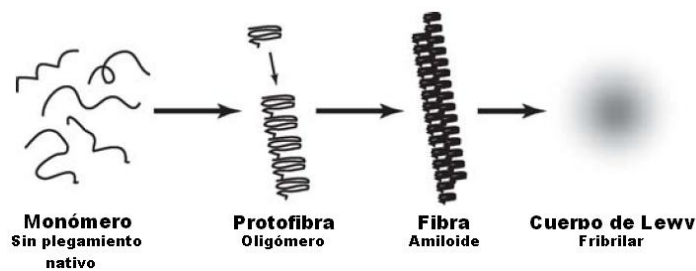
Esta teoría valida como modelo experimental a la mosca de la fruta, dado que los resultados que obtenemos se deben exclusivamente a la interacción de las dos proteínas humanas expresadas en ellas. Nosotros determinamos *in vivo* la interacción de dos proteínas implicadas directamente en la patogénesis del Parkinson, proveyendo un ambiente óptimo para que dicha interacción se lleve a cabo, dado que, como quedó planteado en los antecedentes de este trabajo, para que la sinfilina y la  $\alpha$ -sinucleína puedan interaccionar, se requiere la participación de la parkina. A diferencia de la sinfilina y la  $\alpha$ -sinucleína, la parkina sí tiene un homólogo funcional en *Drosophila*, por

lo que los resultados obtenidos reflejan en muy buena medida lo que de hecho podría estar ocurriendo en el cerebro de humanos.

Todo lo anterior nos ha permitido establecer que: 1) Tanto la  $\alpha$ -sinucleína silvestre como sus mutantes A53P y A30P son tóxicas para las neuronas, especialmente para las dopaminérgicas, probablemente porque ésta es una proteína cuyo paisaje de plegamiento tiende a llevarla hacia conformaciones tridimensionales susceptibles de formar agregados que, de no ser neutralizados, resultan altamente tóxicos para la célula que los produce.

Las neuronas dopaminérgicas son altamente susceptibles de sufrir daños derivados de la generación de radicales libres y toxinas ambientales. 2) La interacción de la  $\alpha$ -sinucleína y la sinfilina puede representar un mecanismo de defensa celular en contra de la formación de estos agregados, y mientras los niveles de sinfilina se mantengan en rangos comparables con los de la  $\alpha$ -sinucleína, el paso de oligómeros a fibras amiloides y a cuerpos de Lewy protegerá a las neuronas. Es probable que precisamente por eso, los casos de pacientes que tienen duplicaciones o incluso triplicaciones del gen que codifica a la  $\alpha$ -sinucleína resulten ser los más agresivos y de más rápida degeneración. Sería en ellos donde la cantidad de sinfilina no alcanza a contender con la formación de oligómeros de  $\alpha$ -sinucleína, y la degeneración neuronal avanza de manera más rápida. Lo mismo podría suceder con los individuos que tengan mutaciones en el promotor del gen que codifica a la  $\alpha$ -sinucleína, que exacerben su expresión y generen mucha más  $\alpha$ -sinucleína de la que la sinfilina puede procesar. Si lográramos establecer alguna estrategia que permitiera balancear los niveles proteicos de sinfilina y  $\alpha$ -sinucleína en pacientes susceptibles a desarrollar la enfermedad de Parkinson, probablemente lograríamos evitar la acumulación de los agregados de  $\alpha$ -sinucleína en el estadio de oligómeros, facilitando la conversión hacia fibras amiloides y

cuerpos de Lewy que no resultaran tóxicos para las neuronas dopaminérgicas, retrasando los efectos de esta enfermedad y mejorando la calidad de vida del siempre creciente número de personas que alcanzan edades avanzadas. Según cifras de la organización mundial de la salud (OMS), de acuerdo con la creciente esperanza de vida, se espera que la incidencia de estos padecimientos se incremente al menos cuatro veces en los próximos 20 años en los países industrializados, lo que genera importantes retos en ámbitos médicos, sociales y económicos.



**Figura 15.** Esquema del proceso de fibrilización de la  $\alpha$ -sinucleína. Monómeros sin plegamiento nativo tienden a formar protofibras oligoméricas ricas en estructuras  $\beta$ -plegadas. Las protofibras pueden dar lugar a fibras de carácter amiloide con estructura más estable. Las fibras de  $\alpha$ -sinucleína forman después, interactuando con otras proteínas, precipitados que en última instancia pueden formar cuerpos de Lewy *in vivo*. Imagen modificada de Moore et al 2005.

## V. PERSPECTIVAS

- Determinar la cantidad de proteína humana expresada para validar que los fenotipos no se deben a una mayor o menor cantidad de proteína expresada, según sea el caso.
- Establecer la tasa exacta de muerte neuronal con la técnica de TUNEL, para demostrar de manera fehaciente que en las moscas que se expresan únicamente uno de los dos genes utilizados en el presente trabajo mueren más neuronas que aquellas en las que se expresan de manera conjunta los dos.

- Establecer ensayos de fluorescencia bimolecular o FRET para determinar que el fenotipo de protección observado en nuestras dobles mutantes se dé como resultado de que la sinfilina y la  $\alpha$ -sinucleína de hecho interactúan *in vivo*.

### Literatura citada

Auluck, P. K., H. Y. Chan, et al. (2002). "Chaperone suppression of alpha-synuclein toxicity in a Drosophila model for Parkinson's disease." Science **295**(5556): 865-8.

Beal, M. F. (2001). "Experimental models of Parkinson's disease." Nat Rev Neurosci **2**(5): 325-34.

Cali, I., R. Castellani, et al. (2006). "Classification of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease revisited." Brain **129**(Pt 9): 2266-77.

Chandra, S., F. Fornai, et al. (2004). "Double-knockout mice for alpha- and beta-synucleins: effect on synaptic functions." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(41): 14966-71.

Chen, L. and M. B. Feany (2005). "Alpha-synuclein phosphorylation controls neurotoxicity and inclusion formation in a Drosophila model of Parkinson disease." Nat Neurosci **8**(5): 657-63.

Choi, P., N. Golts, et al. (2001). "Co-association of parkin and alpha-synuclein." Neuroreport **12**(13): 2839-43.

Chung, K. K., Y. Zhang, et al. (2001). "Parkin ubiquitinates the alpha-synuclein-interacting protein, synphilin-1: implications for Lewy-body formation in Parkinson disease." Nat Med **7**(10): 1144-50.

Cornbrooks, C., C. Bland, et al. (2006). "Delta expression in post-mitotic neurons identifies distinct subsets of adult-specific lineages in Drosophila." J Neurobiol **67**(1): 23-38.

Engelender, S., Z. Kaminsky, et al. (1999). "Synphilin-1 associates with alpha-synuclein and promotes the formation of cytosolic inclusions." Nat Genet **22**(1): 110-4.

Engelender, S., T. Wanner, et al. (2000). "Organization of the human synphilin-1 gene, a candidate for Parkinson's disease." Mamm Genome **11**(9): 763-6.

Farrer, M. J. (2006). "Genetics of Parkinson disease: paradigm shifts and future prospects." Nat Rev Genet **7**(4): 306-18.

Feany, M. B. and W. W. Bender (2000). "A Drosophila model of Parkinson's disease." Nature **404**(6776): 394-8.

- Finkel, T. (2005). "Radical medicine: treating ageing to cure disease." Nat Rev Mol Cell Biol **6**(12): 971-6.
- Fortin, D. L., M. D. Troyer, et al. (2004). "Lipid rafts mediate the synaptic localization of alpha-synuclein." J Neurosci **24**(30): 6715-23.
- Friggi-Grelin, F., H. Coulom, et al. (2003). "Targeted gene expression in Drosophila dopaminergic cells using regulatory sequences from tyrosine hydroxylase." J Neurobiol **54**(4): 618-27.
- George, J. M., H. Jin, et al. (1995). "Characterization of a novel protein regulated during the critical period for song learning in the zebra finch." Neuron **15**(2): 361-72.
- Goldberg, M. S. and P. T. Lansbury, Jr. (2000). "Is there a cause-and-effect relationship between alpha-synuclein fibrillization and Parkinson's disease?" Nat Cell Biol **2**(7): E115-9.
- Hashimoto, M., E. Rockenstein, et al. (2001). "beta-Synuclein inhibits alpha-synuclein aggregation: a possible role as an anti-parkinsonian factor." Neuron **32**(2): 213-23.
- Jensen, P. H., H. Hager, et al. (1999). "alpha-synuclein binds to Tau and stimulates the protein kinase A-catalyzed tau phosphorylation of serine residues 262 and 356." J Biol Chem **274**(36): 25481-9.
- Jensen, P. H., P. Hojrup, et al. (1997). "Binding of Abeta to alpha- and beta-synucleins: identification of segments in alpha-synuclein/NAC precursor that bind Abeta and NAC." Biochem J **323** ( Pt 2): 539-46.
- Jensen, P. H., M. S. Nielsen, et al. (1998). "Binding of alpha-synuclein to brain vesicles is abolished by familial Parkinson's disease mutation." J Biol Chem **273**(41): 26292-4.
- Kruger, R. (2004). "The role of synphilin-1 in synaptic function and protein degradation." Cell Tissue Res **318**(1): 195-9.
- Lee, G., M. Tanaka, et al. (2004). "Casein kinase II-mediated phosphorylation regulates alpha-synuclein/synphilin-1 interaction and inclusion body formation." J Biol Chem **279**(8): 6834-9.
- Liu, Z., X. Wang, et al. (2008). "A Drosophila model for LRRK2-linked parkinsonism." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(7): 2693-8.
- Lotharius, J. and P. Brundin (2002). "Pathogenesis of Parkinson's disease: dopamine, vesicles and alpha-synuclein." Nat Rev Neurosci **3**(12): 932-42.
- Maroteaux, L., J. T. Campanelli, et al. (1988). "Synuclein: a neuron-specific protein localized to the nucleus and presynaptic nerve terminal." J Neurosci **8**(8): 2804-15.
- Marttila, R. J., J. Kaprio, et al. (1988). "Parkinson's disease in a nationwide twin cohort." Neurology **38**(8): 1217-9.

- Marx, F. P., C. Holzmann, et al. (2003). "Identification and functional characterization of a novel R621C mutation in the synphilin-1 gene in Parkinson's disease." Hum Mol Genet **12**(11): 1223-31.
- Meyer-Luehmann, M., T. L. Spires-Jones, et al. (2008). "Rapid appearance and local toxicity of amyloid-beta plaques in a mouse model of Alzheimer's disease." Nature **451**(7179): 720-4.
- Moore, D. J., A. B. West, et al. (2005). "Molecular pathophysiology of Parkinson's disease." Annu Rev Neurosci **28**: 57-87.
- Myhre, R., H. Klungland, et al. (2008). "Genetic association study of synphilin-1 in idiopathic Parkinson's disease." BMC Med Genet **9**: 19.
- Palfi, S. and B. Jarraya (2008). "Huntington's disease: Genetics lends a hand." Nature.
- Perez, R. G., J. C. Waymire, et al. (2002). "A role for alpha-synuclein in the regulation of dopamine biosynthesis." J Neurosci **22**(8): 3090-9.
- Polymeropoulos, M. H., C. Lavedan, et al. (1997). "Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease." Science **276**(5321): 2045-7.
- Recchia, A., P. Debetto, et al. (2004). "Alpha-synuclein and Parkinson's disease." Faseb J **18**(6): 617-26.
- Sharma, N., P. J. McLean, et al. (2001). "Alpha-synuclein has an altered conformation and shows a tight intermolecular interaction with ubiquitin in Lewy bodies." Acta Neuropathol **102**(4): 329-34.
- Sharon, R., M. S. Goldberg, et al. (2001). "alpha-Synuclein occurs in lipid-rich high molecular weight complexes, binds fatty acids, and shows homology to the fatty acid-binding proteins." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(16): 9110-5.
- Smith, W. W., Z. Pei, et al. (2005). "Leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) interacts with parkin, and mutant LRRK2 induces neuronal degeneration." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(51): 18676-81.
- Spillantini, M. G., R. A. Crowther, et al. (1998). "alpha-Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with lewy bodies." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(11): 6469-73.
- Szargel, R., R. Rott, et al. (2008). "Synphilin-1 isoforms in Parkinson's disease: regulation by phosphorylation and ubiquitylation." Cell Mol Life Sci **65**(1): 80-8.
- Tanji, K., T. Toki, et al. (2003). "Glycogen synthase kinase-3beta phosphorylates synphilin-1 in vitro." Neuropathology **23**(3): 199-202.
- Tofaris, G. K. and M. G. Spillantini (2007). "Physiological and pathological properties of alpha-synuclein." Cell Mol Life Sci **64**(17): 2194-201.



Uversky, V. N. (2003). "A protein-chameleon: conformational plasticity of alpha-synuclein, a disordered protein involved in neurodegenerative disorders." J Biomol Struct Dyn **21**(2): 211-34.

Wakabayashi, K., S. Engelender, et al. (2002). "Immunocytochemical localization of synphilin-1, an alpha-synuclein-associated protein, in neurodegenerative disorders." Acta Neuropathol **103**(3): 209-14.

Wakabayashi, K., S. Engelender, et al. (2000). "Synphilin-1 is present in Lewy bodies in Parkinson's disease." Ann Neurol **47**(4): 521-3.