



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

Tesis para optar al Título de Doctor en Bioquímica

---

**Vías de señalización dependientes de lípidos bioactivos  
en modelos de neurodegeneración asociados a  
sinucleinopatías**

Farm. Melisa Ailén Conde

Bahía Blanca

Argentina

2019

Directora de tesis: Dra. Gabriela A. Salvador  
Codirectora de tesis: Dra. Romina M. Uranga

## Prefacio

Esta tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Bioquímica de la Universidad Nacional del Sur y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Bahía Blanca dependiente de la Universidad Nacional del Sur (UNS) y del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), durante el período comprendido entre el 8 de septiembre de 2015 y el 22 de noviembre de 2019, bajo la dirección de la Dra. Gabriela Salvador, Profesora de las cátedras Química Biológica I y Animales de Laboratorio de la UNS e Investigador Independiente del CONICET y la Dra. Romina M. Uranga, Jefe de Trabajos Prácticos de Química Biológica II e Investigador Adjunto del CONICET.

22 de noviembre de 2019

Melisa Ailén Conde



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

Secretaría General de Posgrado y Educación Continua

La presente tesis ha sido aprobada el ...../...../..... ,  
mereciendo la calificación de .....(.....)

a mis hijos, Gael y Alejo.  
a mi compañero de vida, Germán.  
a mis papás, Graciela y Carlos.

*AGRADECIMIENTOS*

No podría haber logrado nada de lo que está plasmado en esta tesis sin la compañía, apoyo y cariño de un gran conjunto de personas, que transitaron conmigo este camino y la mayoría aún siguen. Quisiera agradecer en unas pocas líneas a todos ellos...

A Gabi, mi directora, por la oportunidad, por la guía, por el saber y la enseñanza, por cada momento que dedicó y que dedica, por ir más allá del papel de directora, por acompañar, aconsejar, entender, por ser la “mamá del trabajo”, por todo el cariño.

A Romi, mi codirectora, por acompañarme en todo el proceso, por ser otra guía, por todo lo aprendido, por los empujones para adelante, las palmadas en la espalda (Vamos Meli!).

A la Universidad Nacional del Sur por permitirme realizar mis estudios de grado y posgrado, a cada profesor y ayudante que brindaron su conocimiento y tiempo para formarme.

Al Instituto de Investigaciones Bioquímicas (INIBIBB) por brindarme el espacio para el desarrollo de esta tesis.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) por haber hecho posibles mis estudios de posgrado.

A mis compañeros de laboratorio, los que estuvieron y los que están, por cada momento, charlas, mates, tortas (y saberes académicos también) que compartimos en estos años... y los que vendrán...y en especial a Nati, por ser más que una compañera en estos años, por las charlas, por el compañerismo, por la amistad...

A los integrantes de otros laboratorios del instituto, personales de apoyo, todos los que de alguna manera acompañaron cada día con consejos, charlas, compartiendo conocimientos.

A mis compañeros de docencia y cada alumno que pasó en estos años, por mostrarme que enseñar es aprender.

A mis amigas de la uni, por todos estos años, por no necesitar vernos para estar, por todas las historias compartidas, por cada momento, porque cada vez somos más.

A mis amigos de toda la vida, esos de la primaria, la secundaria, por la amistad sincera que no pasa con el correr de los años.

A toda esa gente que está y estuvo en mi vida, todos los que alguna vez se alegraron por algún pequeño o gran logro, todos los que de alguna manera transitaron alguna parte del camino acompañando.

Y a mi familia...

... a mis papás, porque soy todo lo que soy gracias a ellos, por ser mi columna, mi base, el lugar adonde voy cuando hace falta.

... a mis hermanos, tan distintos pero tan en bloque los tres, siempre.

... a mi tío, porque sin tenerlo físicamente está siempre conmigo.

... a mi tía y primos, por cada fin de semana de morir a carcajadas, de acompañarnos en los malos y buenos momentos.

... a la familia elegida, la que no comparte la sangre, pero sí el mismo amor.

... a mi compañero de vida, Germán, por ser la persona al lado mío en cada paso, por tu amor, tu entrega, por ser el mejor papá, por darme la oportunidad de convertirme en madre una vez más.

... a mis hijos, Gael y Alejo, porque son la luz y la razón de todo.

*RESUMEN*

Las enfermedades neurodegenerativas se caracterizan por la muerte de las neuronas de forma selectiva y progresiva que lleva a la pérdida de funciones primordiales, y muchas veces vitales, en distintas zonas del cerebro. Se desarrollan, por lo general, en una forma familiar hereditaria y una esporádica, siendo esta última la de mayor prevalencia. En líneas generales, presentan ciertas características moleculares que parecen ser comunes a todas ellas: la presencia de estrés oxidativo y agregados patológicos de proteínas, lo que desencadena proteotoxicidad y disfunción mitocondrial.

La formación de agregados proteicos intra- o extracelulares ha sido objeto de estudio recurrente en estas patologías. Estas proteínas se encuentran, por lo general, mal plegadas, con predominio de estructuras en lámina  $\beta$ , lo que lleva a la formación de oligómeros en primer lugar, que luego se transforman en fibrillas y, por último, en agregados macromoleculares.

La  $\alpha$ -sinucleína es una proteína de bajo peso molecular (19 kDa) a la que se le han atribuido diversas funciones biológicas entre las que se encuentran la regulación de la plasticidad sináptica y el flujo y liberación de vesículas sinápticas en el proceso de neurotransmisión. Sin embargo, la sobreproducción de la proteína o su agregación patológica son marcadores comunes en un conjunto de enfermedades neurodegenerativas llamadas sinucleinopatías, entre las que se incluye a la enfermedad de Parkinson.

En este trabajo, entonces, buscamos conocer la respuesta neuronal ante la sobreexpresión de la  $\alpha$ -sinucleína inducida por dos mecanismos diferentes: la transfección de una línea neuronal con la forma salvaje de la proteína y el tratamiento con un pesticida cuya exposición ha demostrado ser inductora de parkinsonismo.

En el primer capítulo, sabiendo que una característica aún no completamente dilucidada es la relación de la  $\alpha$ -sinucleína con los lípidos, estudiamos el rol de la vía de la fosfolipasa D1 (PLD1) y su producto, el ácido fosfatídico, en la respuesta a la sobreexpresión de la  $\alpha$ -sinucleína. Utilizamos la línea celular IMR32 transfectada con la forma salvaje de la  $\alpha$ -

sinucleína (WT  $\alpha$ -sin) y como controles, la misma línea sin transfectar (st) y transfectada con el vector vacío (vv). La sobreexpresión de la  $\alpha$ -sinucleína, que fue de entre 2 y 3 veces mayor que en los controles, provocó una significativa disminución de los niveles del marcador neuronal neurofilamento liviano y alteraciones en el citoesqueleto de actina, todos estos efectos se reflejaron en una disminución en la viabilidad celular de un 20 %, por lo que consideramos que el modelo de trabajo representaba los estadios tempranos de la neurodegeneración asociada a las sinucleinopatías.

Se observó que la sobreexpresión de la  $\alpha$ -sinucleína causó la disminución tanto de los niveles proteicos como de ARNm de la PLD1, así como también de la actividad de la enzima, lo cual se manifestó con una menor producción de ácido fosfatídico. La inhibición de la PLD1 inducida por el aumento de expresión de la  $\alpha$ -sinucleína provocó defectos en la señalización de las quinasas 1 y 2 reguladas por señales extracelulares (ERK1/2) representados por una disminuida expresión y fosforilación de estas quinasas, así como su secuestro en la fracción nuclear.

Con estos datos, y para dilucidar una posible relación entre la PLD1, las ERK1/2 y la  $\alpha$ -sinucleína, utilizamos un inhibidor farmacológico de la PLD1 en células st y observamos que el inhibidor produjo una disminución en la fosforilación de las ERK1/2 y un cambio en su distribución subcelular, translocando al núcleo en el caso de las células tratadas con inhibidor. Este efecto se vio potenciado en las células WT  $\alpha$ -sin, lo que indicaría una relación entre la inhibición de la expresión y la actividad de la PLD1 y la desregulación de la vía de las ERK1/2 con su predominante localización nuclear. El uso de este inhibidor selectivo de la actividad de la PLD1 en neuronas st también demostró que el bloqueo farmacológico de esta vía de señalización provocaba una marcada disminución en la expresión del neurofilamento liviano. En células WT  $\alpha$ -sin la inhibición farmacológica de la vía de la PLD1 y de las ERK1/2 provocó una drástica disminución de los niveles del neurofilamento liviano que fueron prácticamente

indetectables, potenciándose, de este modo, los resultados hallados en presencia de sobreexpresión de la  $\alpha$ -sinucleína.

Para corroborar observado, realizamos un ensayo de recuperación de función realizando una transfección transitoria de células WT  $\alpha$ -sin con las formas constitutivamente activas de la PLD1, la fosfolipasa D2 y de las ERK1/2 para luego analizar la expresión del neurofilamento liviano. Observamos una recuperación en los niveles de expresión de este neurofilamento en células positivas para PLD1 y ERK1/2 en neuronas WT  $\alpha$ -sin. También analizamos la expresión del marcador de apoptosis caspasa-3 clivada que resultó aumentado significativamente cuando se sobreexpresó la PLD1 de forma transitoria. Esto nos llevó a concluir que ante la sobreexpresión de la  $\alpha$ -sinucleína las neuronas adoptan una estrategia de supervivencia en detrimento de la pérdida del neurofilamento liviano y, consecuentemente, del fenotipo neuronal.

En el segundo capítulo utilizamos el pesticida maneb, un agroquímico asociado con la inducción de síndrome parkinsoniano, y evaluamos su efecto en las líneas celulares vv y WT  $\alpha$ -sin. Encontramos que el tratamiento con el pesticida produjo un incremento de la muerte celular acompañado de un aumento de las especies reactivas de oxígeno y de la permeabilidad de la membrana plasmática. La sobreexpresión de la  $\alpha$ -sinucleína resultó ser protectora frente al pesticida. Esta observación se vio acompañada por un aumento en la expresión de dos enzimas del sistema de defensa antioxidante, superóxido dismutasa y glutamato-cisteína ligasa.

También evaluamos la expresión y la fosforilación de la  $\alpha$ -sinucleína, y observamos que el tratamiento con el pesticida aumentó la expresión de esta proteína, algo que no sucedió cuando la proteína ya se encontraba sobreexpresada. La fosforilación de la  $\alpha$ -sinucleína se vio significativamente aumentada por tratamiento con maneb en el caso de células vv, y no hubo cambios en las células WT  $\alpha$ -sin con respecto al control. También evaluamos la fosforilación de Tau como marcador de neurodegeneración y encontramos que los niveles de pTau

aumentaron tanto por exposición al pesticida como por sobreexpresión de la  $\alpha$ -sinucleína, siendo aún mayor este incremento en las células WT  $\alpha$ -sin tratadas con maneb.

También tratamos a las células con el antioxidante N-acetilcisteína para determinar las implicancias del incremento de especies reactivas de oxígeno inducido por maneb en la expresión de la  $\alpha$ -sinucleína, y encontramos que efectivamente la expresión de la proteína disminuyó por tratamiento con el antioxidante tanto en células vv como WT  $\alpha$ -sin.

Para indagar en los mecanismos de señalización involucrados en la respuesta a la toxicidad del pesticida, estudiamos el estado de la vía fosfatidilinositol 3 quinasa/proteína quinasa B/y el factor de transcripción FoxO3a (PI3K/Akt/FoxO3a). Encontramos que Akt incrementaba su expresión en el núcleo con el tratamiento con maneb, de igual manera en células vv y WT  $\alpha$ -sin, mientras que su fosforilación se veía incrementada tanto en el citosol como en el núcleo de las dos líneas celulares trabajadas. En el caso de FoxO3a, su expresión se vio aumentada por sobreexpresión de la  $\alpha$ -sinucleína y conjuntamente con el tratamiento con maneb; su fosforilación aumentó de forma muy significativa por tratamiento con maneb en ambas líneas celulares.

Evaluamos, en último lugar, la alteración de la expresión de FoxO3a y la viabilidad celular por tratamiento con el inhibidor de PI3K LY294002. Encontramos un aumento de la expresión del factor de transcripción por tratamiento conjunto con el inhibidor y el pesticida en las dos líneas celulares. En cuanto a la viabilidad, el tratamiento con inhibidor y pesticida produjo una disminución significativa de igual magnitud tanto en células vv como WT  $\alpha$ -sin.

Podemos decir entonces que la respuesta al daño inducido por maneb y la protección por sobreexpresión previa de la  $\alpha$ -sinucleína en este modelo celular podría estar siendo mediada por la vía PI3K/Akt/FoxO3a.

En resumen, en este trabajo de tesis se caracterizó el rol de dos vías de señalización dependientes de la producción de lípidos bioactivos en procesos de daño neuronal asociados con sinucleinopatías.

*SUMMARY*

Neurodegenerative diseases are characterized by neuronal death in a selective and progressive manner leading to the gradual loss of functions in different brain areas. These disorders mostly develop in a sporadic form, being a small percentage due to inheritance. In general, these neurodegenerative disorders have share different molecular features, namely, the presence of oxidative stress and pathological protein aggregates, both of which lead to proteotoxicity and mitochondrial dysfunction.

The formation of intra- or extracellular protein aggregates in these pathologies constitutes a subject of recurrent study. These proteins are generally misfolded, with a predominance of  $\beta$ -sheet structures, which leads to the formation of oligomers, fibrils, and, finally, macromolecular aggregates.

$\alpha$ -Synuclein is a small protein (19 kDa) that has been extensively studied for its structural and biophysical properties. Several biological functions have been attributed to  $\alpha$ -synuclein, namely, the regulation of synaptic plasticity and the flow and release of synaptic vesicles in the neurotransmission process. However, its overexpression and pathological aggregation are hallmarks in a group of neurodegenerative disorders grouped under the name of synucleinopathies, including Parkinson's disease.

This thesis work aimed to study the neuronal response to  $\alpha$ -synuclein overexpression induced by two different methods: transfection of a neuronal cell line with the wild type form of human  $\alpha$ -synuclein and the treatment with an agrochemical pesticide that has been shown to induce parkinsonism.

In the first chapter, on the base of the still not fully dilucidated relationship between  $\alpha$ -synuclein and lipids, we studied the role of the phospholipase D1 (PLD1) pathway and its product, phosphatidic acid, in the response to  $\alpha$ -synuclein overexpression. For this purpose, human IMR32 neuroblastoma cells transfected with either the wild type form of  $\alpha$ -synuclein (WT  $\alpha$ -syn) or the empty vector (vv), and the untransfected cell line (st) were used as

experimental models. WT  $\alpha$ -syn cells, which displayed  $\alpha$ -synuclein levels 2-3-fold higher than the controls (st and vv), showed a significant decrease in the levels of the neuronal marker neurofilament light chain, alterations in the actin cytoskeleton, and a decreased cell viability of 20%. This characterization allowed us to propose this biological model as representative of early-stage neurodegeneration associated with synucleinopathies.

We also observed that  $\alpha$ -synuclein overexpression caused a decrease in the protein and mRNA levels of PLD1, as well as in the activity of the enzyme, which was manifested by a lower production of phosphatidic acid. Also, the inhibition of PLD1 induced by  $\alpha$ -synuclein overexpression caused an impairment in extracellular signal-regulated kinases (ERK1/2) signaling mainly represented by the decreased expression and phosphorylation of both kinases as well as their sequestration in the nuclear compartment.

To elucidate a possible cross-talk between PLD1, ERK1/2, and  $\alpha$ -synuclein, we used a pharmacological inhibitor of PLD1 in st cells. In these conditions, PLD1 inhibition caused a decrease in the phosphorylation level of ERK1/2 and a predominantly nuclear localization of these kinases. These effects were enhanced in WT  $\alpha$ -syn cells, which would indicate a cross-talk between  $\alpha$ -synuclein overexpression-induced PLD1 downregulation and the changes observed in ERK1/2 pathway. Moreover, PLD1 inhibition in st cells also triggered the decreased expression of the neurofilament light chain, and pharmacological inhibition of the PLD1 and ERK1/2 pathways in WT  $\alpha$ -syn cells provoked almost the loss of the expression of the neuronal marker, showing potentiated effects in the latter case.

To support these findings, we performed function recovery assays by inducing the transient expression of the constitutively active forms of PLD1, phospholipase D2, and ERK1/2 in WT  $\alpha$ -syn cells. The restoration of PLD1 and ERK1/2 level in WT  $\alpha$ -syn cells was able to recover the expression level of the neurofilament light chain. We also observed that the recovery of neurofilament light chain expression also triggered an increase in the apoptotic

marker cleaved caspase-3. This led us to conclude that  $\alpha$ -synuclein overexpression triggers a survival strategy in neurons that is characterized by the loss of the neurofilament light chain and, consequently, loss of the neuronal phenotype.

In the second chapter, we evaluated the effect of the pesticide maneb, an agrochemical associated with the induction of parkinsonian syndrome, on vv and WT  $\alpha$ -syn cells. We found that maneb treatment caused an increase in cell death, accompanied by the generation of reactive oxygen species and increased plasma membrane permeability. The exposure to the pesticide showed to be less harmful in neurons with  $\alpha$ -synuclein overexpression than in control cells. The protection exerted by  $\alpha$ -synuclein overexpression was accompanied by the increased expression of two enzymes of the antioxidant defense system: superoxide dismutase and glutamate-cysteine ligase.

Maneb exposure increased  $\alpha$ -synuclein expression and phosphorylation only in vv cells. Tau phosphorylation was also evaluated as a marker of neurodegeneration. p-Tau levels increased both by the exposure to the pesticide and by  $\alpha$ -synuclein overexpression, being this increase even greater in the WT  $\alpha$ -syn cells.

To study the relationship between maneb-induced increase of reactive oxygen species and  $\alpha$ -synuclein expression, we utilized the antioxidant N-acetyl-cysteine in our experiments. N-acetyl-cysteine decreased the levels of  $\alpha$ -synuclein expression in vv and WT  $\alpha$ -syn cells. To investigate the signaling mechanisms involved in the neuronal response to maneb toxicity, we studied the PI3K/Akt/FoxO3a pathway. We found that Akt expression was increased in the nuclear compartment of vv and WT  $\alpha$ -syn cells treated with maneb. However, Akt phosphorylation was found to be increased in the cytosolic and nuclear compartments of both cell lines treated with the pesticide. Similar results were observed in FoxO3a expression and phosphorylation in both cell lines.

Finally, we evaluated the alteration of FoxO3a expression and cell viability by treatment with the PI3K inhibitor LY294002. We found an increase in the transcription factor expression induced by the cotreatment of maneb and the PI3K inhibitor in vv and WT  $\alpha$ -syn cells. In terms of cell survival, the treatment with LY294002, together with the pesticide, produced a similar decrease in cell viability in both cell lines. Based on these results, it can be concluded that the PI3K/Akt/FoxO3a pathway could mediate the response to maneb-induced damage in vv cells and that the neuroprotection exerted by  $\alpha$ -synuclein overexpression could be mediated by different mechanisms that still need to be elucidated.

In summary, this work characterized the role of two signaling pathways that produce bioactive lipids in neuronal damage processes associated with synucleinopathies.