

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 943 113**

51 Int. Cl.:

A61K 31/496 (2006.01)

A61K 31/506 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.05.2013 PCT/US2013/039283**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.11.2013 WO13166295**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.05.2013 E 13784480 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.02.2023 EP 2844256**

54 Título: **Tratamiento de la esclerosis lateral amiotrófica con inhibidores de las tirosina cinasas**

30 Prioridad:

02.05.2012 US 201261641441 P

01.03.2013 US 201361771515 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

09.06.2023

73 Titular/es:

GEORGETOWN UNIVERSITY (100.0%)

37th & O Streets, N.W.

Washington, DC 20057, US

72 Inventor/es:

MOUSSA, CHARBEL

74 Agente/Representante:

CONTRERAS PÉREZ, Yahel

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 943 113 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Tratamiento de la esclerosis lateral amiotrófica con inhibidores de las tirosina cinasas

5 DECLARACIÓN CON RESPECTO A LA INVESTIGACIÓN FINANCIADA CON FONDOS FEDERALES

La presente invención se ha realizado con financiación pública a través de la subvención AG30378 concedida por los Institutos Nacionales de Salud. El gobierno posee determinados derechos sobre la invención.

10 Antecedentes

Las enfermedades neurodegenerativas incluyen trastornos genéticos y esporádicos asociados con disfunción progresiva del sistema nervioso. Se ha estimado que uno de cada cuatro estadounidenses desarrollará una afección neurodegenerativa en su vida. En general, sin embargo, los mecanismos subyacentes que provocan las afecciones no se comprenden bien y hay pocas opciones de tratamiento eficaces disponibles para prevenir o tratar enfermedades neurodegenerativas. De manera similar, las opciones de tratamiento para las enfermedades miodegenerativas y las enfermedades priónicas también son limitadas.

La solicitud de patente internacional WO2010/017541 divulga compuestos, composiciones, kits y métodos para tratar afecciones relacionadas con la neurodegeneración o enfermedades oculares. El trastorno neurodegenerativo puede ser esclerosis lateral amiotrófica, que se propone tratar con sunitinib, que es un inhibidor de ataques.

Sumario

En el presente documento se proporciona un compuesto para su uso en un método de tratamiento o prevención de la esclerosis lateral amiotrófica en un sujeto como se define en las reivindicaciones, que comprende seleccionar un sujeto con esclerosis lateral amiotrófica, en donde opcionalmente el sujeto tiene una patología por TDP-43 (del inglés *TAR DNA-binding protein 43*, proteína de unión al ADN de TAR 43) y administrar al sujeto una cantidad efectiva de un inhibidor de las tirosina cinasas como se define en las reivindicaciones, en donde el inhibidor de las tirosina cinasas no es Gleevec y en donde el inhibidor de las tirosina cinasas cruza la barrera hematoencefálica. El inhibidor de las tirosina cinasas es nilotinib, bosutinib, o una combinación de los mismos.

Los detalles de una o más realizaciones de la invención se exponen en los dibujos adjuntos y la descripción a continuación. Otras características, objetos y ventajas de la invención resultarán evidentes a partir de la descripción y los dibujos, así como de las reivindicaciones. Los dibujos que no se relacionan con la materia objeto abarcada por las reivindicaciones son para referencia.

Descripción de los dibujos

La Figura 1 es un diagrama que muestra los mecanismos celulares asociados con la actividad de la parkina en condiciones neurodegenerativas (izquierda) y tras la intervención con inhibidores de las tirosina cinasas (derecha). La intervención activa la actividad de la parkina para estimular la eliminación de las vacuolas autofágicas.

La Figura 2 es un diagrama que muestra que la acumulación de amiloide conduce a la inducción autofágica y el secuestro en fagóforos. En animales transgénicos o que expresan amiloide, la interacción de la parkina con la beclina 1 se reduce, lo que conduce a una maduración disminuida del fagóforo en autofagosomas y a defectos autofágicos. La inhibición de las cinasas activa la parkina y aumenta su interacción con la beclina 1, lo que da como resultado la maduración de los fagóforos en fagosomas y la eliminación. Se utilizó fraccionamiento subcelular mediante gradientes de metrazimida para aislar el fagóforo (AV-10), los autofagosomas (AV-20) y los lisosomas, para demostrar cómo la célula maneja la acumulación y eliminación de amiloide.

La Figura 3 muestra que la parkina interactúa con la beclina 1 en ratones de tipo silvestre pero no ratones -/- para parkina: El ensayo de ligadura de proximidad (PLA, del inglés *Proximity Ligation Assay*) *in situ* en cortes cerebrales de 20 mm de grosor mostró la interacción de parkina y beclina 1 en A) ratones C57BL/6 pero no en B) ratones -/- para parkina (control), lo que indica que la parkina interactúa con la beclina 1. El PLA *in situ* en cortes cerebrales de 20 mm de grosor mostró la interacción de la parkina y la beclina 1 en C) ratones Tg-A53T y D) Tg-APP tratados con DMSO, E) Tg-A53T y F) Tg-APP tratados con nilotinib 10 mg/kg durante 3 semanas, G) Tg-A53T y H) Tg-APP tratados con bosutinib 5 mg/kg durante 3 semanas.

La Figura 4 es un gráfico que representa los niveles de ELISA de A β ₁₋₄₂ humana en lisados cerebrales de ratones triple mutantes APP-AD (del inglés *Amyloid precursor protein-alzheimer disease*, proteína precursora del péptido amiloide-enfermedad de Alzheimer) (Tg-APP) tratados con Nilotinib 1 mg/kg o 5 mg/kg una vez cada dos días durante 6 semanas. N=10 animales. P<0,05. ANOVA, con comparación múltiple de Neuman Keuls. Un asterisco indica una diferencia significativa al comparar con DMSO. Las barras son la media \pm DT.

La Figura 5 es un gráfico que representa los niveles de ELISA de A β ₁₋₄₂ humana en lisados cerebrales de ratones triple mutantes APP-AD (Tg-APP) tratados con bosutinib 1 mg/kg o 5 mg/kg una vez cada dos días durante 6 semanas. N=10 animales. P<0,05. ANOVA con comparación múltiple de Neuman Keuls. Un asterisco indica una diferencia significativa en comparación con DMSO. Las barras son la media \pm DT.

La Figura 6 es un gráfico que representa los niveles de ELISA de sinucleína α humana en lisados cerebrales de ratones A53T (A53T-Tg) tratados con Bosutinib 5 mg/kg una vez al día durante 3 semanas. N=10 animales. $P<0,05$. ANOVA, con comparación múltiple de Neuman Keuls. Un asterisco indica una diferencia significativa en comparación con DMSO. Las barras son la media \pm DT.

La Figura 7 es un gráfico que representa los niveles de ELISA de sinucleína α humana en lisados cerebrales de ratones A53T (A53T-Tg) tratados con Bosutinib 1 mg/kg o 5 mg/kg una vez cada 2 días durante 6 semanas. N=10 animales. $P<0,05$. ANOVA, con comparación múltiple de Neuman Keuls. Un asterisco indica una diferencia significativa en comparación con DMSO. Las barras son la media \pm DT.

La Figura 8 es un gráfico que representa los niveles de ELISA de sinucleína α humana en la sangre de ratones A53T (A53T-Tg) tratados con Bosutinib 1 mg/kg o 5 mg/kg una vez cada 2 días durante 6 semanas. N=10 animales. $P<0,05$. ANOVA, con comparación múltiple de Neuman Keuls. Un asterisco indica una diferencia significativa en comparación con DMSO. Las barras son la media \pm DT.

La Figura 9 es un gráfico que representa los niveles de ELISA de sinucleína α humana en lisados cerebrales de ratones A53T (A53T-Tg) tratados con Nilotinib 1 mg/kg o 5 mg/kg una vez cada segundo día durante 6 semanas. N=10 animales. $P<0,05$. ANOVA, con comparación múltiple de Neuman Keuls. Un asterisco indica una diferencia significativa en comparación con DMSO. Las barras son la media \pm DT.

La Figura 10 es un gráfico que representa los niveles de ELISA de sinucleína α humana en la sangre de ratones A53T (A53T-Tg) tratados con Nilotinib 1 mg/kg o 5 mg/kg una vez cada segundo día durante 6 semanas. N=10 animales. $P<0,05$. ANOVA, con comparación múltiple de Neuman Keuls. Un asterisco indica una diferencia significativa en comparación con DMSO. Las barras son la media \pm DT.

La Figura 11 muestra A) un gráfico que representa los niveles de ELISA de $A\beta_{1-42}$ humana, B) un gráfico que representa $A\beta_{1-40}$ humana en lisados cerebrales de ratones triple mutantes APP-AD (Tg-APP) tratados con Bosutinib 5 mg/kg todos los días durante 3 semanas, C) un gráfico que representa los niveles de ELISA de parkina de ratón y D) un gráfico que representa Tau fosforilada (Ser 396) de ratón en lisados cerebrales de ratones triple mutantes APP-AD (Tg-APP) tratados con Bosutinib 5 mg/kg todos los días durante 3 semanas. N=10 animales. $P<0,05$. ANOVA con comparación múltiple de Neuman Keuls. Un asterisco indica una diferencia significativa en comparación con DMSO. Las barras son la media \pm DT.

La Figura 12 es un gráfico que representa los niveles de ELISA de $A\beta_{1-42}$ humana en lisados cerebrales de ratones a los que se les inyectó $A\beta_{1-42}$ lentivírica (tipo silvestre y Δ para parkina, durante 3 semanas y tratados con Bosutinib 5 mg/kg todos los días durante 3 semanas adicionales. N=10 animales. $P<0,05$. ANOVA con comparación múltiple de Neuman Keuls. Un asterisco indica una diferencia significativa en comparación con DMSO. Las barras son la media \pm DT.

La Figura 13 muestra que la expresión de sinucleína α en el cerebro aumenta su nivel en sangre y la inhibición de las tirosina cinasas invierte estos efectos de una manera dependiente de parkina. Se inyectó a ratones de forma estereotáctica (bilateralmente) sinucleína α lentivírica en la sustancia negra durante 3 semanas. A continuación, a la mitad de los animales se les inyectó nilotinib 10 mg/kg y a la otra mitad DMSO. Se compararon los efectos de la expresión de sinucleína α y la inhibición de las tirosina cinasas en A) el cerebro y B) los niveles sanguíneos de sinucleína α . Un asterisco indica una diferencia significativa en comparación con DMSO. Las barras son la media \pm DT.

La Figura 14 muestra que la expresión de sinucleína α en el cerebro aumenta su nivel en sangre y la inhibición de las tirosina cinasas invierte estos efectos de una manera dependiente de parkina. Se inyectó a ratones de forma estereotáctica (bilateralmente) sinucleína α lentivírica en la sustancia negra durante 3 semanas. A continuación, a la mitad de los animales se les inyectó bosutinib 5 mg/kg y a la otra mitad DMSO. Se compararon los efectos de la expresión de sinucleína α y la inhibición de las tirosina cinasas en A) el cerebro y B) los niveles sanguíneos de sinucleína α . Un asterisco indica una diferencia significativa en comparación con DMSO. Las barras son la media \pm DT.

La Figura 15 muestra que la sinucleína α indujo la pérdida de los niveles de dopamina y de ácido homovanílico (HVA, del inglés *homovanillic acid*). La inhibición de las tirosina cinasas invirtió estos efectos y mejoró el rendimiento motor. Se inyectó a ratones de forma estereotáctica (bilateralmente) sinucleína α lentivírica en la sustancia negra durante 3 semanas. A continuación, a la mitad de los animales se les inyectó Nilotinib 10 mg/kg o Bosutinib 5 mg/kg y a la otra mitad DMSO. Se compararon los efectos de la expresión de sinucleína α y la inhibición de las tirosina cinasas sobre A) los niveles de dopamina y de ácido homovanílico (HVA) (ELISA). Los efectos del tratamiento sobre B) el rendimiento motor se evaluaron utilizando rotarod (varilla giratoria). Un asterisco indica una diferencia significativa en comparación con DMSO. Las barras son la media \pm DT.

La Figura 16 muestra que $A\beta_{1-42}$ se acumula en las AV-10 en animales Tg-APP, pero el tratamiento farmacológico potencia la eliminación autofágica mediante el depósito de $A\beta_{1-42}$ en AV-20 y el lisosoma. Los histogramas muestran $A\beta_{1-42}$ en fracciones subcelulares, incluyendo vacuolas autofágicas 10 (AV-10; fagóforos + autofagosomas), AV-20 (autofagosomas) y lisosomas. A ratones transgénicos 3xAPP se les inyectó i.p. Nilotinib 10 mg/kg o Bosutinib 5 mg/kg o DMSO una vez al día durante 3 semanas consecutivas. Los tejidos cerebrales se fraccionaron para aislar las AV (del inglés *autophagic vacuoles*, vacuolas autofágicas) y se realizó ELISA específico para ser humano para determinar el contenido en proteínas. N=5 animales por tratamiento.

La Figura 17 muestra que $A\beta_{1-40}$ se acumula en las AV-20 en animales Tg-APP, pero el tratamiento farmacológico potencia la eliminación autofágica mediante el depósito de $A\beta_{1-40}$ en AV-20 y el lisosoma. Los histogramas muestran $A\beta_{1-40}$ en fracciones subcelulares, incluyendo vacuolas autofágicas 10 (AV-10; fagóforos + autofagosomas), AV-20 (autofagosomas) y lisosomas. A ratones transgénicos 3 x APP se les inyectó i.p. Nilotinib

10 mg/kg o Bosutinib 5 mg/kg o DMSO una vez al día durante 3 semanas consecutivas. Los tejidos cerebrales se fraccionaron para aislar las AV y se realizó un ELISA específico para determinar el contenido de proteínas. N=5 animales por tratamiento.

La Figura 18 muestra que P-Tau se acumula en las AV-10 en animales Tg-APP, pero el tratamiento farmacológico potencia la eliminación autofágica mediante el depósito de p-Tau en las AV-20 y el lisosoma, que contienen enzimas degradativas. Los histogramas muestran hiperfosforilación de Tau (p-Tau) en la serina 396 en fracciones subcelulares, incluyendo vacuolas autofágicas 10 (AV-10; fagóforos+ autofagosomas), AV-20 (autofagosomas) y lisosomas. A ratones transgénicos 3 x APP se les inyectó i.p. Nilotinib 10 mg/kg o Bosutinib 5 mg/kg o DMSO una vez al día durante 3 semanas consecutivas. Los tejidos cerebrales se fraccionaron para aislar las AV, y se realizó un ELISA específico para ratón para determinar el contenido de proteínas. N=5 animales por tratamiento.

La Figura 19 muestra que el tratamiento farmacológico aumenta la actividad de la parkina, lo que conduce a la eliminación de proteínas, incluyendo la propia parkina. Los histogramas muestran la parkina en fracciones subcelulares, incluyendo vacuolas autofágicas 10 (AV-10; fagóforos + autofagosomas), AV-20 (autofagosomas) y lisosomas. A ratones transgénicos 3 x APP se les inyectó i.p. Nilotinib 10 mg/kg o Bosutinib 5 mg/kg o DMSO una vez al día durante 3 semanas consecutivas. Los tejidos cerebrales se fraccionaron para aislar las AV y se realizó un ELISA específico para ratón para determinar el contenido de proteínas. La parkina se acumula en las AV-10 en animales Tg-APP, pero el tratamiento farmacológico potencia la eliminación autofágica mediante el depósito de parkina en las AV-20 y el lisosoma, que contienen enzimas degradativas. N=5 animales por tratamiento.

La Figura 20 muestra que la eliminación autofágica es dependiente de parkina. Los histogramas muestran $A\beta_{1-42}$ en fracciones subcelulares, incluyendo vacuolas autofágicas 10 (AV-10; fagóforos + autofagosomas), AV-20 (autofagosomas) y lisosomas. Se les inyectó a ratones de tipo silvestre o -/- para parkina $A\beta_{1-42}$ lentivírica durante 3 semanas y se trataron i.p. con Nilotinib 10 mg/kg o Bosutinib 5 mg/kg o DMSO una vez al día durante 3 semanas (adicionales) consecutivas. Los tejidos cerebrales se fraccionaron para aislar las AV y se realizó ELISA específico para ser humano para determinar el contenido en proteínas. $A\beta_{1-42}$ se acumula en las AV-10 en cerebros a los que se les inyectó lentivirus, pero el tratamiento farmacológico potencia la eliminación autofágica mediante el depósito de $A\beta_{1-42}$ en las AV-20 y el lisosoma. N=5 animales por tratamiento.

La Figura 21 muestra que P-Tau en la serina 396 se acumula en las AV-10 en cerebros a los que se les inyectó lentivirus, pero el tratamiento farmacológico potencia la eliminación autofágica mediante el depósito de p-Tau en las AV-20 y el lisosoma, donde se degrada. Los histogramas muestran p-Tau en fracciones subcelulares, incluyendo vacuolas autofágicas 10 (AV-10; fagóforos + autofagosomas), AV-20 (autofagosomas) y lisosomas. Se les inyectó a ratones de tipo silvestre o -/- para parkina $A\beta_{1-42}$ lentivírica durante 3 semanas y se trataron i.p. con Nilotinib 10 mg/kg o Bosutinib 5 mg/kg o DMSO una vez al día durante 3 semanas (adicionales) consecutivas. Los tejidos cerebrales se fraccionaron para aislar las AV y se realizó un ELISA específico para ratón para determinar el contenido de proteínas. La eliminación autofágica es dependiente de parkina. N=5 animales por tratamiento.

La Figura 22 muestra que la sinucleína α se acumula en las AV-10 en cerebros a los que se les inyectó lentivirus, pero el tratamiento farmacológico potencia la eliminación autofágica mediante el depósito de sinucleína α en las AV-20 y el lisosoma, que contienen enzimas degradativas. Los histogramas muestran la sinucleína α en fracciones subcelulares, incluyendo vacuolas autofágicas 10 (AV-10; fagóforos + autofagosomas), AV-20 (autofagosomas) y lisosomas. Se les inyectó a ratones de tipo silvestre o -/- para parkina sinucleína α lentivírica en la SN durante 3 semanas y se trataron i.p. con Nilotinib 10 mg/kg o Bosutinib 5 mg/kg o DMSO una vez al día durante 3 semanas (adicionales) consecutivas. Los tejidos de la SN se fraccionaron para aislar las AV y se realizó un ELISA específico para ser humano para determinar el contenido de proteínas. La eliminación autofágica es dependiente de la parkina. N=5 animales por tratamiento.

La Figura 23 muestra que P-Tau se acumula en las AV-10 en cerebros a los que se les inyectó lentivirus, pero el tratamiento farmacológico potencia la eliminación autofágica mediante el depósito de p-Tau en las AV-20 y el lisosoma, que contienen enzimas degradativas. Los histogramas muestran p-Tau en la serina 396 en fracciones subcelulares, incluyendo vacuolas autofágicas 10 (AV-10; fagóforos + autofagosomas), AV-20 (autofagosomas) y lisosomas. Se les inyectó a ratones de tipo silvestre o -/- para parkina sinucleína α lentivírica en la SN durante 3 semanas y se trataron i.p. con Nilotinib 10 mg/kg o Bosutinib 5 mg/kg o DMSO una vez al día durante 3 semanas (adicionales) consecutivas. Los tejidos de la SN se fraccionaron para aislar las AV y se realizó un ELISA específico para ratón para determinar el contenido de proteínas. La eliminación autofágica es dependiente de parkina. N=5 animales por tratamiento.

La Figura 24 muestra que la sinucleína α se acumula en las AV-10 en los cerebros de A53T, pero el tratamiento farmacológico potencia la eliminación autofágica mediante el depósito de sinucleína α en las AV-20 y los lisosomas. Los histogramas muestran la sinucleína α en fracciones subcelulares, incluyendo vacuolas autofágicas 10 (AV-10; fagóforos + autofagosomas), AV-20 (autofagosomas) y lisosomas, que contienen enzimas digestivas. A ratones transgénicos A53T se les inyectó i.p. Nilotinib 10 mg/kg o Bosutinib 5 mg/kg o DMSO una vez al día durante 3 semanas consecutivas. Los tejidos cerebrales se fraccionaron para aislar las AV y se realizó ELISA específico para ser humano para determinar el contenido en proteínas. N=5 animales por tratamiento.

La Figura 25 muestra que P-Tau se acumula en las AV-10 en los cerebros de A53T, pero el tratamiento farmacológico potencia la eliminación autofágica mediante el depósito de p-Tau en las AV-20 y el lisosoma. Los histogramas muestran p-Tau en la Serina 396 en fracciones subcelulares, incluyendo vacuolas autofágicas 10 (AV-10; fagóforos + autofagosomas), AV-20 (autofagosomas) y lisosomas, que contienen enzimas digestivas. A ratones transgénicos A53T se les inyectó i.p. Nilotinib 10 mg/kg o Bosutinib 5 mg/kg o DMSO una vez al día durante 3 semanas consecutivas. Los tejidos cerebrales se fraccionaron para aislar las AV y se realizó un ELISA específico

para ratón para determinar el contenido de proteínas. N=5 animales por tratamiento.

La Figura 26 muestra que la parkina se acumula en las AV-10 en los cerebros de A53T, pero el tratamiento farmacológico potencia la eliminación autofágica mediante el depósito de parkina en las AV-20 y el lisosoma. Los histogramas muestran la parkina en fracciones subcelulares, incluyendo vacuolas autofágicas 10 (AV-10; fagóforos + autofagosomas), AV-20 (autofagosomas) y lisosomas, que contienen enzimas digestivas. A ratones transgénicos A53T se les inyectó i.p. Nilotinib 10 mg/kg o Bosutinib 5 mg/kg o DMSO una vez al día durante 3 semanas consecutivas. Los tejidos cerebrales se fraccionaron para aislar las AV y se realizó un ELISA específico para ratón para determinar el contenido de proteínas. N=5 animales por tratamiento.

La Figura 27 es un diagrama que ilustra cómo la inhibición de las tirosina cinasas aumenta la actividad de la parkina y facilita la eliminación autofágica de p-Tau. Este proceso precisa la estabilización de Tau de los microtúbulos intactos. La activación de las tirosina cinasas, la acumulación de p-Tau y la autofagia alterada tienen un papel reconocido en la neurodegeneración. Se produce una disminución de la solubilidad de la parkina y su acumulación con A β intracelular y p-Tau en vacuolas autofágicas en cerebros con EA, al tiempo que la parkina exógena facilita la eliminación autofágica en modelos animales.

La Figura 28 muestra A) c-Abl fosforilada en la tirosina 412 (T412) y B) la expresión endógena de parkina combinadas en C) el hipocampo de ratones C57BL/6 de 6 meses de edad tratados i.p. con DMSO diariamente durante 3 semanas. La Figura 28 también muestra D) la disminución de c-Abl fosforilada en la tirosina 412 (T412) y E) el aumento de la expresión endógena de parkina combinadas en F) el hipocampo de ratones C57BL/6 de 6 meses de edad tratados i.p. con Bosutinib 5 mg/kg diariamente durante 3 semanas.

La Figura 29 muestra la expresión de A) parkina y B) A β combinadas en C) la corteza de ratones Tg-APP de 6 meses de edad, tratados con DMSO o Bosutinib 5 mg/kg (D-F) una vez al día durante 3 semanas. Usando una combinación distinta de anticuerpos (véase la Figura G-I que muestra la expresión de parkina (G) y A β (H) en el hipocampo de ratones Tg-APP tratados con DMSO. J-H muestran el aumento del nivel de parkina en animales tratados durante 3 semanas una vez al día con Bosutinib (J) junto con niveles de placa disminuidos (K y L) en el hipocampo.

La Figura 30 muestra A β de placas teñida con anticuerpo 6E10 y contrateñida con DAB en el cerebro de animales Tg-APP tratados i.p. con DMSO una vez al día durante 3 semanas.

La Figura 31 muestra A β de placas teñida con anticuerpo 6E10 y contrateñida con DAB en el cerebro de animales Tg-APP tratados i.p. con Bosutinib 5 mg/kg una vez al día durante 3 semanas.

La Figura 32 muestra que Bosutinib reduce los niveles de sinucleína α en ratones transgénicos que expresan A53T en todo el cerebro. A-D muestran la expresión de sinucleína α humana en sustancia negra a la que se le inyectó LacZ lentivírica (durante 3 semanas) con A) DMSO y B) Bosutinib 5 mg/kg una vez al día durante 3 semanas. C y D muestran la expresión de sinucleína α humana en sustancia negra a la que se inyectó sinucleína α lentivírica (durante 3 semanas) con C) DMSO y D) o Bosutinib una vez al día durante 3 semanas. E-H muestran la expresión de tirosina hidroxilasa (TH) en sustancia negra a la que se le inyectó LacZ lentivírica (durante 3 semanas) con E) DMSO y F) Bosutinib 5 mg/kg una vez al día durante 3 semanas. G y H muestran la expresión de TH en sustancia negra a la que se le inyectó sinucleína α lentivírica (durante 3 semanas) con G) DMSO y H) o Bosutinib una vez al día durante 3 semanas. La sinucleína α disminuye las neuronas con TH y el Bosutinib rescata estas células. I-J muestran la expresión de sinucleína α humana en ratones A53T en I) la corteza, J) el cuerpo estriado, G) el tronco encefálico y L) el hipocampo, tratados con DMSO durante 3 semanas. M-P muestran la expresión de sinucleína α humana en ratones A53T en M) la corteza, N) el cuerpo estriado, O) el tronco encefálico y P) el hipocampo, tratados con Bosutinib 5 mg/kg durante 3 semanas.

La Figura 33 proporciona gráficos que representan el rendimiento en una prueba del laberinto acuático de Morris (en segundos) que muestran que el tratamiento i.p. con Bosutinib 5 mg/kg una vez al día durante 3 semanas mejoró el comportamiento cognitivo en ratones a los que se les había inyectado bilateralmente A β ₁₋₄₂ lentivírica durante 3 semanas antes del tratamiento farmacológico. Los ratones tratados con Bosutinib encontraron la plataforma (A) pero los ratones tratados con DMSO emplearon más tiempo en el área NO, donde se colocaron inicialmente, o la NE o SO, sin encontrar de forma efectiva el área de la plataforma. Bosutinib mejoró el rendimiento cognitivo de una manera dependiente de parkina, ya que los ratones +/- para parkina no parecían aprender mucho. B) muestra que los ratones tratados con Bosutinib recorrieron menos distancia con menos velocidad, pero entraron en el área de la plataforma más que los ratones tratados con DMSO.

La Figura 34 muestra que los inhibidores de las tirosina cinasas aumentan los niveles de actividad de la parkina. A) muestra los niveles ELISA de actividad de la parkina en células de neuroblastoma M17 humanas tratadas con Nilotinib 10 mg/kg o Bosutinib 5 mg/kg durante 24 horas. N=12. P<0,05. ANOVA, con comparación múltiple de Neuman Keuls. Un asterisco indica una diferencia significativa en comparación con DMSO. Las barras son la media \pm DT. B) muestra los niveles de parkina (ELISA) en lisados cerebrales de ratones de tipo silvestre a los que se les inyectó sinucleína α lentivírica durante 3 semanas y luego se los trató con Nilotinib 10 mg/kg una vez cada dos días durante 3 semanas. N=10 animales. P<0,05. ANOVA, con comparación múltiple de Neuman Keuls. Un asterisco indica una diferencia significativa en comparación con DMSO. Las barras son la media \pm DT.

La Figura 35 es un análisis de transferencia de Western de lisados cerebrales de ratones Tg-APP tratados con Bosutinib 5 mg/kg durante 3 semanas adicionales. Estas transferencias muestran niveles disminuidos de c-Abl, aumento de parkina y alteración de distintos marcadores moleculares de autofagia, lo que indica que A β altera la autofagia normal y Bosutinib refuerza la autofagia para eliminar A β ₁₋₄₂.

La Figura 36 es un análisis de transferencia de Western de lisados cerebrales de ratones Tg-APP tratados con Bosutinib 5 mg/kg durante 3 semanas. Estas transferencias muestran alteraciones en los niveles de marcadores

moleculares de autofagia.

La Figura 37 es un análisis de transferencia de Western de lisados cerebrales de ratones Tg-APP tratados con Bosutinib 5 mg/kg durante 3 semanas adicionales. Estas transferencias muestran niveles disminuidos de fragmentos carboxiterminales (CTF, del inglés *C-terminal fragments*) y fosfo-tirosina.

5 La Figura 38 es un análisis de transferencia de Western de lisados cerebrales de ratones Tg-APP tratados con Bosutinib 5 mg/kg una vez al día durante semanas adicionales. Estas transferencias muestran niveles disminuidos de distintos isótopos de Tau.

10 La Figura 39 es un análisis de transferencia de Western de lisados cerebrales de ratones de tipo silvestre que expresaban A β ₁₋₄₂ lentivírica (3 semanas) con y sin tratamiento con Bosutinib (5 mg/kg) durante 3 semanas adicionales. Estas transferencias muestran los niveles de distintos marcadores moleculares de autofagia, lo que indica que A β ₁₋₄₂ altera la autofagia normal y Bosutinib refuerza la autofagia para eliminar A β ₁₋₄₂. La Figura 40 es un análisis de transferencia de Western de lisados cerebrales de ratones de tipo silvestre que expresaban A β ₁₋₄₂ lentivírica (3 semanas) con y sin tratamiento con Bosutinib durante 3 semanas adicionales. Estas transferencias muestran niveles disminuidos de ubiquitina (transferencia de la parte superior) y pan fosfo-tirosina (segunda transferencia) y SIAH2 (del inglés *seven in absentia homolog*, siete en ausencia homóloga), lo que sugiere que Bosutinib es un amplio inhibidor de las tirosina cinasas. La Figura 41 es un análisis de transferencia de Western de lisados cerebrales de ratones de tipo silvestre que expresaban A β ₁₋₄₂ lentivírica (3 semanas) con y sin tratamiento con Bosutinib durante 3 semanas adicionales. Estas transferencias muestran niveles disminuidos de distintos isótopos de Tau. La Figura 42 es un análisis de transferencia de Western de lisados cerebrales de ratones de tipo silvestre que expresaban sinucleína α lentivírica (3 semanas) con y sin tratamiento con Bosutinib durante 3 semanas adicionales. Las transferencias muestran en orden aumento de sinucleína α en animales a los que se les inyectó sinucleína lentivírica, junto con niveles disminuidos de c-Abl y fosforilación, niveles aumentados de parkina y marcadores de autofagia, incluyendo P62, HDAC6, LC3 y ATG12, en comparación con los controles de carga de tubulina y MAP2. La Figura 43 muestra que la parkina es insoluble en el cuerpo estriado cadavérico de pacientes humanos con EP. A) Los histogramas representan la medición de ELISA de la parkina humana en el caudado de pacientes con EP y sujetos de control. B) es un análisis de TW en gel de SDS-NuPAGE al 4-12 % de lisados de cuerpo estriado humanos cadavéricos solubles en pacientes con EP y sujetos de control, que muestra la parkina (1ª transferencia) y las proteínas ubiquitinadas (2ª transferencia) en comparación con el control de carga de actina. C) Los histogramas representan la cuantificación de las transferencias. D) es un análisis de TW en gel SDS NuPAGE al 4-12 % que muestra los niveles de parkina insoluble (1ª transferencia), fosfo-parkina (2ª transferencia), proteínas ubiquitinadas (3ª transferencia) y actina (4ª transferencia). E) Los histogramas representan la cuantificación de las transferencias. Los asteriscos indican una diferencia significativa. F) El diagrama de cajas representa muestras individuales de pacientes humanos con EP y controles de la misma edad. Los histogramas son la media \pm DT expresada como % respecto al control. ANOVA, Neumann Keuls con comparación múltiple o prueba de la t no paramétrica. P<0,05. N=12 pacientes con EP y 7 sujetos de control.

20 La Figura 44 muestra la inmunotinción de tejidos humanos con anticuerpos para humano y GFAP. Inmunotinción de cerebros cortados en serie e incluidos en parafina de 20 μ m de grosor con A) tinción anti-parkina humana (PRK8) y contratinción con el marcador nuclear DAPI que muestra la proteína citosólica, B) cotinción para parkina y para el marcador glial GFAP que muestra la expresión de parkina en astrocitos, C) tinción para TH en el caudado de un sujeto de control, D) tinción para parkina y contratinción con el marcador nuclear DAPI que muestra la proteína citosólica, E). Cotinción para parkina y marcador glial GFAP que muestra la expresión de parkina en astrocitos, F). tinción para TH en el caudado de un paciente con EP/EA, G) tinción para parkina y contratinción con DAPI que muestra proteína citosólica, H) cotinción con parkina y marcador glial GFAP que muestra la expresión de parkina en astrocitos, I) tinción para TH en el mesencéfalo/SN de un sujeto de control, J) tinción para parkina y contratinción con DAPI que muestra proteína citosólica, K) cotinción para parkina y marcador glial GFAP que muestra expresión de parkina en astrocitos, L) tinción de TH en el mesencéfalo/SN de un paciente con EP. M). tinción anti-parkina humana (AB5112) y contratinción con el marcador nuclear DAPI que muestra proteína citosólica, N) cotinción para parkina y marcador glial GFAP que muestra expresión de parkina en astrocitos, O) tinción para TH en el caudado de un sujeto de control.

35 La Figura 45 muestra el fraccionamiento subcelular en tejidos cerebrales con EP humanos congelados. A) muestra la tinción con anti-parkina humana (AB5112) y la contratinción con marcador nuclear DAPI que muestra proteína citosólica. B) muestra la tinción para el marcador neuronal MAP-2 y DAPI y C) muestra parkina y MAP-2 combinados en cortes en serie teñidos. D) muestra la TH en el mesencéfalo/SN de un sujeto de control. E) muestra la tinción con anti-parkina humana (AB5112) y la contratinción con marcador nuclear DAPI que muestra proteína citosólica. F) muestra la tinción del marcador neuronal MAP-2 y DAPI y G) muestra parkina y MAP-2 combinados en cortes en serie teñidos para H) TH en el mesencéfalo/SN de un paciente con EP y demencia. I) muestra un análisis de TW en un gel SDS NuPAGE al 4-12 % de lisados de cuerpo estriado humano que muestra la expresión de LC3-I y LC3-II (primer panel), LC3-B (segundo panel), en comparación con el control de carga de actina (panel inferior) J) muestra histogramas que representan el análisis densitométrico de las transferencias. K) muestra una transferencia de Western en extractos subcelulares que muestra a LC3-B en las AV-10 y las AV-20 y a LAMP-3 en la fracción lisosómica, así como el marcador mitocondrial COX-IV y el marcador nuclear PARP-1. Los gráficos representan el fraccionamiento subcelular y la medición por ELISA de L) sinucleína α humana, M) parkina humana y N) p-Tau humana (AT8). Los asteriscos indican significativamente diferente del control. ANOVA, Neumann Keuls con comparación múltiple, P<0,05. N=12 pacientes con EP y 7 sujetos de control.

50 La Figura 46 muestra que la expresión lentivírica de sinucleína α conduce a p-Tau y la actividad de la parkina

invierte estos efectos. A) es un análisis de TW en un gel SDS-NuPAGE al 4-12 % de extractos de cuerpo estriado de rata que muestra los niveles de expresión de parkina (transferencia de la parte superior) y de sinucleína α (transferencia central) y los niveles de actina (transferencia de la parte inferior). B) muestra histogramas que representan la cuantificación de los niveles de sinucleína α humana mediante ELISA. C) muestra histogramas que representan la cuantificación de la actividad de la parkina humana. D) es una medición por ELISA de p-Tau de rata. Tinción de tioflavina-S de cortes de cuerpo estriado de 20 μ m en cerebros a los que se les inyectó E) parkina, F) sinucleína α y G) parkina+sinucleína α lentivíricas. Se muestra la tinción de sinucleína α humana de cortes de 20 μ m cortados en serie con cortes para tioflavina S en cerebros a los que se les inyectó K) parkina, L) sinucleína α y M) parkina+sinucleína α lentivíricas. Los asteriscos indican significativamente diferentes. Los histogramas son la media \pm DT expresada como % del control. ANOVA, Neumann Keuls con comparación múltiple, $P < 0,05$. N=8 animales por tratamiento para TW y ELISA, 8 para IHQ.

La Figura 47 muestra que la parkina de tipo silvestre, pero no la T240R, invierte la acumulación de autofagosomas inducida por la sinucleína α . Micrografías electrónicas de cortes del cuerpo estriado en cerebros de rata a los que se les inyectó A) LacZ lentivírica (Lv-LacZ) como control, B) sinucleína α lentivírica (Lv-Sin), C) parkina lentivírica + sinucleína α lentivírica (Lv-Sin+Lv-Par), las vacuolas contienen desechos y D) sinucleína α lentivírica + T240R lentivírica (Lv-Sin+Lv-T240R). El asterisco indica vacuolas autofágicas. N=8. Los gráficos representan el fraccionamiento subcelular y la medición por ELISA de E) sinucleína α y F) p-Tau en modelos animales de transferencia génica. ANOVA, Neumann Keuls con comparación múltiple, $P < 0,05$. N=5 animales por tratamiento para fraccionamiento subcelular.

La Figura 48 muestra que la parkina funcional, T240R no mutante, invierte la alteración de la sinucleína α de la autofagia normal. A) muestra un análisis de TW en un gel SDS NuPAGE al 4-12 % de lisados de cuerpo estriado de rata que muestra la expresión de beclina (primer panel), Atg7 (segundo panel) y Atg12 (tercer panel) en comparación con el control de carga de actina (panel inferior) en animales a los que se les inyectó Lv-LacZ, Lv-Par, Lv-Sin y Lv-Par+Lv-Sin. B) muestra un análisis de TW de lisados cerebrales de cuerpo estriado de rata que muestra la expresión de LC3-B (primer panel) y HDAC6 (segundo panel) en comparación con el control de carga de actina (panel inferior) en animales a los que se les inyectó Lv-LacZ, Lv-Par, Lv-Sin y Lv-Par+Lv-Sin. Se muestra la tinción de cortes cerebrales corticales de 20 μ m de grosor al que se le inyectó C) parkina lentivírica (Lv-Par), D) sinucleína α lentivírica (Lv-Sin) E) parkina lentivírica + sinucleína α lentivírica (Lv-Par+Lv-Sin) y F) T240R lentivírica + sinucleína α lentivírica (Lv-T240R+Lv-Sin). G) muestra histogramas que representan el recuento estereológico de células positivas para LC3-B en el cuerpo estriado. H) es un análisis de transferencia de Western en gel en SDS NuPAGE al 4-12 % con anticuerpo para P62. Los asteriscos indican una diferencia significativa. Los histogramas son la media \pm DT convertidos en % del control. ANOVA, Neumann Keuls con comparación múltiple, $P < 0,05$. N=8 animales por tratamiento para TW y ELISA, 8 para IHQ.

La Figura 49 muestra que la parkina aumenta en los cerebros con EA. A) muestra un análisis de TW en un gel SDS-NuPAGE al 4-12 % de lisados corticales humanos en la EA. B) muestra histogramas que representan los niveles de parkina humana medidos por ELISA. C) es un análisis de TW en un gel SDS-NuPAGE al 4-12 % que muestra el nivel de expresión de las posibles dianas de degradación de la parkina, incluyendo proteínas ubiquitinadas (transferencia de la parte superior), tubulina (2ª transferencia) y Ciclina E (3ª transferencia) y actina (4ª transferencia). D) muestra histogramas que representan la cuantificación de transferencias por densitometría. E) es un análisis de TW en gel SDS-NuPAGE al 4-12 % que muestra proteínas insolubles extraídas en urea 4 M, incluyendo parkina total (transferencia de la parte superior) y parkina fosforilada en la Serina 378 (2ª transferencia) y actina (3ª transferencia). F) muestra histogramas que representan la cuantificación de transferencias por densitometría. Los asteriscos indican una diferencia significativa. Los histogramas son la media \pm DT expresada como % del control. Todas las bandas se cuantificaron con respecto a los niveles de actina. ANOVA, Neumann Keuls con comparación múltiple, $P < 0,05$.

La Figura 50 muestra la $A\beta_{1-42}$ intraneuronal aumentada y la colocalización de la parkina en el hipocampo de cerebros con EA. Se muestran IHQ de cortes de hipocampo humano de 30 μ m de grosor incluidos en parafina de un sujeto de control (caso n.º 1252) teñidos con A) anticuerpo anti- $A\mu_{1-42}$ humana+DAPI y B) anticuerpo anti-parkina+DAPI. C) es una figura combinada que muestra la cotinción de $A\beta_{1-42}$ y parkina. Se muestran IHQ de cortes de hipocampo de un paciente con EA (caso n.º 1774) teñidos con D) anticuerpo anti- $A\beta_{1-42}$ humana+DAPI y E) anticuerpo anti-parkina humana+DAPI. F) es una figura combinada que muestra la cotinción de $A\beta_{1-42}$ y parkina. Se muestran IHQ de cortes de hipocampo de un paciente con EA (caso n.º 1861) teñidos con G) anticuerpo 4G8 anti- $A\beta_{1-42}$ +DAPI y H) anticuerpo anti-parkina humana+DAPI, e I) es una figura combinada que muestra la cotinción de $A\beta_{1-42}$ (4G8) y parkina.

La Figura 51 muestra que la parkina colocaliza con $A\beta_{1-42}$ intraneuronal en la corteza de cerebros con EA. Se muestran IHQ de cortes de corteza entorrinal humana de 30 μ m de grosor incluidos en parafina de un paciente con EA (caso n.º 1833) teñidos con A) anticuerpo anti- $A\beta_{1-42}$ humana+DAPI y B) anticuerpo anti-parkina+DAPI. C) es una figura combinada que muestra la cotinción de $A\beta_{1-42}$ y parkina. Se muestran IHQ de cortes de neocorteza humana de paciente con EA (caso n.º 1851) teñidos con D) anticuerpo anti- $A\beta_{1-42}$ humana+DAPI y E) anticuerpo anti-parkina+DAPI. F) es una figura combinada que muestra la cotinción de $A\beta_{1-42}$ y parkina. Se muestran IHQ de cortes de neocorteza de un paciente con EA (caso n.º 1861) teñidos con G) anticuerpo 4G8 anti- $A\beta_{1-42}$ humana+DAPI y H) anticuerpo anti-parkina humana+DAPI. I) es una figura combinada que muestra la cotinción de $A\beta_{1-42}$ (4G8) y parkina.

La Figura 52 muestra que la parkina, la $A\beta_{1-42}$ y la p-Tau se acumulan en vacuolas autofágicas de cerebros con EA. A) es un análisis de TW en un gel de SDS-NuPAGE al 4-12 % de lisados corticales cadavéricos humanos en

EA explorados con anticuerpo anti-LC3 que muestra a LC3-I y LC3-II (1ª transferencia) y LC3-B (2ª transferencia) y actina (3ª transferencia). B) muestra histogramas que representan la cuantificación de transferencias por densitometría. C) es un análisis por TW de fracciones aisladas con Metrazimida de tejido cerebral congelado que muestra el marcador lisosómico LAMP-3 en la fracción flotante y la detección de LC3-B en las AV-10 y AV-20. Los gráficos representan la medición por ELISA en vacuolas autofágicas de D) A β ₁₋₄₂, E) A β ₁₋₄₀, F) p-Tau (AT8) y G) parkina humanas. Los asteriscos indican una diferencia significativa. Los histogramas son la media \pm DT expresada como % del control. Todas las bandas se cuantificaron con respecto a los niveles de actina. ANOVA, Neumann Keuls con comparación múltiple, P<0,05.

La Figura 53 muestra que la parkina disminuye el nivel de A β ₁₋₄₂ lentivírica y de p-Tau en modelos animales de transferencia génica. A) es un análisis de TW en un gel SDS NuPAGE al 4-12 % que muestra los niveles de expresión de parkina y A β ₁₋₄₂, analizado con un péptido sintético como control de peso molecular y de anticuerpo. B) muestra histogramas que representan la cuantificación de parkina humana por ELISA. C) muestra un ELISA de A β ₁₋₄₂ humana 2 semanas después de la inyección de lentivirus. D) muestra la medición por ELISA de p-Tau de rata 2 y 4 semanas posinyección. También se muestra la tinción de tioflavina-S de cortes corticales de 20 μ m en cerebros a los que se les inyectó E) LacZ, F) A β ₁₋₄₂ y G). parkina+A β ₁₋₄₂ lentivíricas. Los asteriscos indican una diferencia significativa. Los histogramas son la media \pm DT expresada como % respecto al control. Todas las bandas se cuantificaron con respecto a los niveles de actina. ANOVA, Neumann Keuls con comparación múltiple, P<0,05. N=8 animales por tratamiento para TW y ELISA, 8 para IHQ.

La Figura 54 muestra que la parkina elimina la acumulación de vacuolas autofágicas inducida por A β ₁₋₄₂. Se muestran micrografías electrónicas de cortes corticales en cerebros de rata a los que se les inyectó A) LacZ lentivírica (Lv-LacZ) como control, B) parkina lentivírica (Lv-Par), C) A A β ₁₋₄₂ lentivírica (Lv-A A β ₁₋₄₂) (las flechas indican vacuolas) y D) parkina lentivírica + A A β ₁₋₄₂ lentivírica (Lv-A A β ₁₋₄₂ +Lv-Par) (la vacuola contiene desechos). N=8. Los gráficos representan el fraccionamiento subcelular y la medición por ELISA de E) A β ₁₋₄₂ y F) p-Tau en modelos animales de transferencia génica. Todas las bandas se cuantificaron con respecto a los niveles de actina. ANOVA, Neumann Keuls con comparación múltiple, P<0,05. N=5 animales por tratamiento para fraccionamiento subcelular.

La Figura 55 muestra que A β ₁₋₄₂ intracelular altera la autofagia normal y la parkina facilita la eliminación autofágica. A) es un análisis de TW en un gel SDS NuPAGE al 4-12 % de lisados corticales de rata que muestra la expresión de beclina (primer panel), Atg7 (segundo panel) y Atg12 (tercer panel), y el control de carga de actina (panel inferior) en animales a los que se les inyectó Lv-LacZ, Lv-Par, Lv-A β ₁₋₄₂ y Lv-Par+Lv-A β ₁₋₄₂. B) es un análisis de TW de lisados cerebrales corticales de rata que muestra la expresión de LC3-B (primer panel) y HDAC6 (segundo panel) y el control de carga de actina (panel inferior) en animales a los que se les inyectó Lv-LacZ, Lv-Par, Lv-A β ₁₋₄₂ y Lv-Par+Lv-A β ₁₋₄₂. Se muestra la tinción de cortes cerebrales corticales de 20 μ m de grosor a los que se les inyectó C) LacZ lentivírica (Lv-LacZ), D) parkina lentivírica (Lv-Par) E) A β ₁₋₄₂ lentivírica (Lv-A β ₁₋₄₂) y F) parkina lentivírica + A β ₁₋₄₂ lentivírica (Lv-Par+Lv-A β ₁₋₄₂). G) muestra histogramas que representan el recuento estereológico de células positivas para LC3-B en la corteza. H) es un análisis de TW de un gel SDS NuPAGE al 4-12 % que muestra los niveles de P62. Los asteriscos indican una diferencia significativa. Los histogramas son la media \pm DT expresada como % del control. Todas las bandas se cuantificaron con respecto a los niveles de actina. ANOVA, Neumann Keuls con comparación múltiple, P<0,05. N=8 animales por tratamiento para TW y ELISA, 8 para IHQ.

La Figura 56 muestra que la activación de c-Abl está asociada con la acumulación de sinucleína α . Una TW en un gel SDS-NuPAGE al 10 % muestra A) la expresión de sinucleína α lentivírica (1ª transferencia), c-Abl total (2ª transferencia) y c-Abl fosforilada en la tirosina 412 (T412) (3ª transferencia), y actina (N=9). B) muestra c-Abl total (1ª transferencia) c-Abl T412 (2ª transferencia) y actina en extractos de cuerpo estriado cadavérico humano, EP N= 9 y 7 controles, p<0,02, prueba de la t bilateral. C) muestra la densitometría de las TW de ser humano. D) es una TW en un gel de SDS-NuPAGE al 4-12 % que muestra c-Abl total (1ª transferencia) y c-Abl fosforilada en la tirosina 412 (T412) (2ª transferencia), y la expresión de sinucleína α de ratón (3ª transferencia) y actina (N=9). E) es un gráfico que representa la cuantificación del análisis por espectrometría de masas de Nilotinib cerebral (N=5/punto de tiempo). Los gráficos representan la actividad de la caspasa 3 en F) ratones a los que se les inyectó sinucleína α y LacZ lentivíricas (N= 14) con y sin Nilotinib, y G) ratones transgénicos A53T de 6-8 meses de edad (N=15) y controles de la misma edad de tipo silvestre (N=64) con y sin Nilotinib. 'Significativamente distinto, ANOVA, comparación múltiple de Neumann Keuls, p<0,05.

La Figura 57 muestra que el Nilotinib elimina la sinucleína α y protege a las neuronas de tirosina hidroxilasa (TH) de la SN. La tinción inmunohistoquímica de cortes cerebrales de 20 μ m de grosor muestra la sinucleína α humana en A) ratones a los que se les inyectó LacZ lentivírica+Nilotinib, B) ratones a los que se les inyectó sinucleína α lentivírica en la SN y tratados con DMSO y C) ratones a los que se les inyectó sinucleína α lentivírica y tratados con Nilotinib. La tinción inmunohistoquímica de cortes cerebrales de 20 μ m de grosor muestra la tirosina hidroxilasa en ratones D) a los que se les inyectó LacZ lentivírica+Nilotinib, G es mayor aumento de un animal distinto y E) ratones a los que se les inyectó sinucleína α lentivírica y tratados con DMSO. H) es mayor aumento de un animal distinto. F) muestra ratones a los que se les inyectó sinucleína α lentivírica y tratados con Nilotinib. I) es mayor aumento de un animal distinto. J) muestra células contrateñidas con Nissl en LacZ+Nilotinib, K). sinucleína α +DMSO y L). sinucleína α +Nilotinib.

La Figura 58 muestra que el Nilotinib elimina la acumulación de vacuolas autofágicas en la SN de ratones con sinucleína α lentivírica. La microscopía electrónica de transmisión de las neuronas de la SN muestra la acumulación de desechos citosólicos y vacuolas autofágicas (las AV) en ratones que expresan sinucleína α lentivírica con tratamiento con DMSO (véanse las Figuras 58 A, C y E). Las Figuras 58 B, D y F) muestran el aspecto de las AV

más grandes en los ratones tratados con Nilotinib.

La Figura 59 muestra que el Nilotinib atenúa los niveles de sinucleína α en ratones A53T. La tinción inmunohistoquímica de cortes cerebrales de 20 μ m de grosor muestra una expresión abundante de sinucleína α humana en ratones transgénicos A53T de 6 a 8 meses de edad tratados con DMSO en A) el cuerpo estriado, B) el tronco encefálico, C) la corteza y D) el hipocampo de distintos animales. La inyección i.p. diaria de Nilotinib durante 3 semanas muestra una disminución de la sinucleína α humana en E) el cuerpo estriado, F) el tronco encefálico, G) la corteza y H) el hipocampo.

La Figura 60 muestra que el Nilotinib activa a la parkina e induce la eliminación autofágica. A) es un gráfico que representa la viabilidad celular basada en MTT en células de neuroblastoma M17 humanas (N=12) transfectadas con ADNc de $A\beta_{1-42}$ (o LacZ) durante 24 h, y luego se tratadas con Nilotinib 10 μ M durante 24 h adicionales. B) es un gráfico que representa la actividad del proteasoma a través de ensayos de tipo quimotripsina que utilizan lactacistina inhibidora del proteasoma 20S 20 μ M como control de especificidad en células de neuroblastoma humano (N=12) con y sin Nilotinib. C) es un ELISA de $A\beta_{1-42}$ humana antes y después del tratamiento con Nilotinib en células de neuroblastoma de rata B35 (N=12) en medios, lisados solubles (tampón STEN) e insolubles (ácido fórmico al 30 %) en presencia y ausencia de ARNhc de beclina 1. D) es una TW de lisados de células solubles (de C) que muestra los niveles de beclina 1, parkina y LC3 con y sin Nilotinib (N=12). E) es un gráfico que representa la función de la ubiquitina ligasa E3 parkina en células de neuroblastoma B35 tratadas con DMSO o Nilotinib durante 24 horas. Se usaron E1-E2-E3 recombinantes (positivo) o K0 (negativo) como controles de especificidad. F) es un gráfico que representa la actividad de caspasa 3 en ratones C57BL/6 (N=64) (tipo silvestre) o -/- para parkina (N=16-19) de 1 año de edad a los que se les inyectó $A\beta_{1-42}$ lentivírica y tratados (i.p.) con 10 mg/kg durante 3 semanas. * Significativamente distinto, ANOVA con comparación múltiple de Neumann Keuls, $p < 0,05$.

La Figura 61 muestra que la eliminación por Nilotinib de amiloide cerebral está asociada con la activación de la parkina. Un gráfico representa los niveles por ELISA de A) $A\beta_{1-42}$ humana soluble e insoluble y B) los niveles por ELISA de $A\beta_{1-40}$ humana soluble e insoluble en el cerebro de ratones Tg-APP de 8-12 meses (N=9) a los que se les inyectó (i.p.) a 10 mg/kg una vez al día durante 3 semanas. C) es un gráfico que representa los niveles por ELISA de p-Tau de ratón en el cerebro de ratones Tg-APP de 8-12 meses de edad (N=9). D) es un gráfico que representa los niveles por ELISA de parkina de ratón soluble e insoluble en el cerebro de ratones Tg-APP de 8-12 meses (N=9) a los que se les inyectó (i.p.) 10 mg/kg (diariamente durante 3 semanas) y extractos cerebrales -/- para parkina como control de especificidad. E) es un análisis de TW en geles SDS Nu-PAGE al 4-12 % de extractos cerebrales de Tg-APP tratados con Nilotinib o DMSO que muestran APP, c-Abl, p-c-Abl y CTF, y MAP-2 como control (N=11). F) es una TW de extractos corticales cadavéricos de pacientes con EA (EA N=12 y 7 de control) en SDS Nu-PAGE al 10 % y G) es un gráfico que representa la densitometría y la relación de c-Abl y p-c-Abl, y parkina. * Significativamente distinto, prueba de la t no paramétrica, $P < 0,05$. También se muestra un gráfico que representa los niveles por ELISA de H) $A\beta_{1-42}$ humana soluble e insoluble, e I) niveles por ELISA de p-Tau de ratón en el cerebro de ratones (N=9) a los que se les inyectó (i.p.) 10 mg/kg (3 semanas). * Significativamente distinto, ANOVA con comparación múltiple de Neumann Keuls, $p < 0,05$.

La Figura 62 muestra que nilotinib estimula la eliminación autofágica de la amiloide. La TW de extractos cerebrales en geles Nu-Page SDS al 4-12 % se muestran para A) en $A\beta_{1-42}$ lentivírica en ratones de tipo silvestre \pm Nilotinib que muestran, c-Abl, p-c-Abl, LC3-B y LC3 con respecto a MAP-2 y B) parkina, beclina 1, Atg-5 y 12 con respecto a tubulina (N=9). También se proporciona el análisis de transferencia de Western de extractos cerebrales en geles Nu-Page SDS al 10 % para C) Tg-APP \pm Nilotinib que muestra, parkina, LC3B, LC3, Atg-5 y beclina 1 con respecto a tubulina y D) Tau total, AT8, AT180, Ser 396 y Ser 262 con respecto a actina (N=12). E) es un análisis de transferencia de Western de extractos cerebrales en geles Nu-Page SDS al 4-12 % en $A\beta_{1-42}$ lentivírica en ratones -/- para parkina \pm Nilotinib que muestra, parkina, beclina 1, LC3 y LC3A con respecto a tubulina y F) es un análisis de transferencia de Western de Atg-5 y Atg12 con respecto a MAP-2 (N=7). * Significativamente distinto, ANOVA con comparación múltiple de Neumann Keuls, $p < 0,05$.

La Figura 63 muestra que Nilotinib aumenta el nivel de parkina y disminuye la carga de placas. La tinción de cortes cerebrales de 20 μ m muestra la formación de placas dentro de diversas regiones del cerebro en el grupo A-D) Tg-APP+DMSO y E-H) de Nilotinib después de un tratamiento de 3 semanas. La tinción de cortes cerebrales de 20 μ m de grosor muestra I) parkina y J) $A\beta_{1-42}$. K) es una figura combinada en el hipocampo de ratones Tg-APP después de 3 semanas de tratamiento con DMSO. L) muestra la parkina, M) muestra $A\beta_{1-42}$ y N) es una figura combinada en el hipocampo de ratones Tg-APP después de 3 semanas de tratamiento con Nilotinib. O) muestra la parkina, P) muestra $A\beta_{1-42}$ y Q) es una figura combinada en la corteza de ratones Tg-APP después de 3 semanas de tratamiento con DMSO. R) muestra la parkina, S) muestra $A\beta_{1-42}$ y T) es una figura combinada en la corteza de ratones Tg-APP después de 3 semanas de tratamiento con Nilotinib. La tinción de cortes cerebrales de 20 μ m muestra a $A\beta_{1-42}$ intracelular dentro del U) hipocampo de ratones a los que se les inyectó $A\beta_{1-42}$ lentivírica, el recuadro de detalle es un mayor aumento, y V) eliminación por Nilotinib de $A\beta_{1-42}$ intracelular (el recuadro de detalle es mayor aumento). La tinción de cortes cerebrales de 20 μ m muestra a $A\beta_{1-42}$ intracelular dentro de W) la corteza de ratones a los que se les inyectó $A\beta_{1-42}$ lentivírica, el recuadro de detalle es un mayor aumento, y X) eliminación por Nilotinib de $A\beta_{1-42}$ intracelular (el recuadro de detalle es mayor aumento).

La Figura 64 muestra que Nilotinib elimina placas en ratones de tipo silvestre a los que se les inyectó $A\beta_{1-42}$ lentivírica pero no en los -/- para parkina. La tinción de cortes cerebrales de 20 μ m muestra la formación de placas dentro de diversas regiones cerebrales en distintos grupos A-C) ratones de tipo silvestre con $A\beta_{1-42}$ lentivírica +DMSO y D-F) de Nilotinib después de un tratamiento de 3 semanas. G-I) muestran $A\beta_{1-42}$ lentivírica +DMSO en ratones -/- para parkina y J-L) muestran el grupo Nilotinib después de 3 semanas de tratamiento. La microscopía

electrónica de transmisión muestra defectos autofágicos en distintos cerebros de tipo silvestre con $A\beta_{1-42}$ lentivírica + DMSO dentro de M) el hipocampo, que muestra neuronas distróficas, N) la corteza, que muestra acumulación de vacuolas autofágicas, O) el hipocampo, que muestra lisosomas agrandados. Cerebros de tipo silvestre con $A\beta_{1-42}$ lentivírica + Nilotinib dentro de P) el hipocampo, Q) la corteza, que muestra la eliminación de vacuolas autofágicas, R) el hipocampo. También se muestra $A\beta_{1-42}$ lentivírica \pm Nilotinib en cerebros de -/- para parkina dentro de S y V) el hipocampo mostrando neuronas distróficas, T y W) la corteza mostrando la acumulación de vacuolas autofágicas y U y X), el hipocampo mostrando la acumulación de vacuolas autofágicas.

La Figura 65 muestra que Nilotinib mejora la capacidad intelectual de una manera dependiente de parkina. A) representa los resultados de una prueba del laberinto acuático de Morris después de 4 días de entrenamiento (intentos) en ratones de tipo silvestre (N=14) y -/- para parkina (N=7) a los que se les inyectó $A\beta_{1-42}$ lentivírica \pm Nilotinib. B) muestra gráficos que representan el número total de entradas al área de la plataforma y la distancia recorrida. C) representa los resultados de una prueba del laberinto acuático de Morris después de 4 días de entrenamiento (intentos) en ratones Tg-APP \pm Nilotinib (N=12), que incluye mapas de calor para cada grupo mostrando el rendimiento global. D) muestra gráficos que representan el número total de entradas al área de la plataforma y la distancia recorrida. E) representa los resultados de una prueba de reconocimiento de objetos en inyectados con Tg-APP \pm Nilotinib (N=12) y $A\beta_{1-42}$ lentivírica \pm Nilotinib en -/- para parkina (N=7). El índice de reconocimiento se calculó como (tiempo de exploración de uno de los objetos/tiempo de exploración de ambos objetos) x100 para la sesión de adquisición, y (tiempo de exploración de un objeto nuevo/tiempo de exploración de objetos familiares y novedosos) x100 para la sesión de reconocimiento administrada 1,5 horas después. * Significativamente distinto, ANOVA con comparación múltiple de Neumann Keuls, $P < 0,05$, Efecto significativo de Nilotinib sobre el reconocimiento en el grupo Tg-APP, prueba de la T por pares $p < 0,001$.

La Figura 66 muestra que Nilotinib aumenta el nivel de parkina y cruza la barrera hematoencefálica. Se muestran los niveles de parkina por ELISA en ratones de tipo silvestre y $A\beta_{1-42}$ lentivírica \pm Nilotinib utilizando extractos cerebrales de -/- para parkina como control de especificidad (N=12).

La Figura 67 muestra que Nilotinib elimina la tinción de tioflavina-S. La tinción para tioflavina de cortes cerebrales de 2 μ m muestra la formación de placas dentro de diversas regiones del cerebro en distintos grupos, A-D) Tg-APP+DMSO y E-H) de Nilotinib después del tratamiento de 3 semanas.

La Figura 68 muestra que la parkina ubiquitina $A\beta_{1-42}$ para participar en su degradación. La tinción de cortes de 20 μ m de grosor muestra la formación de placas positivas para 6E10 en el grupo de expresión de $A\beta_{1-42}$ 6 semanas posinyección en A) ratones de tipo silvestre con $A\beta_{1-42}$ +DMSO, B) ratones de tipo silvestre con $A\beta_{1-42}$ +Nilotinib, C) ratones -/- para parkina con $A\beta_{1-42}$ +DMSO y D) ratones -/- para parkina con $A\beta_{1-42}$ +Nilotinib. Se proporcionan aumentos mayores que muestran células positivas para 6E10 en E) ratones de tipo silvestre con $A\beta_{1-42}$ +DMSO, F) ratones de tipo silvestre con $A\beta_{1-42}$ +Nilotinib, G) ratones -/- para parkina con $A\beta_{1-42}$ +DMSO, H) ratones -/- para parkina con $A\beta_{1-42}$ +Nilotinib. I) muestra un gráfico que representa la cuantificación del tamaño de placas usando la imagen J para delinear los límites alrededor de las placas individuales usando 15-25 placas (2 placas por animal) y J) muestra el recuento estereológico de células positivas para $A\beta_{1-42}$ (N=12 animales). K) es un gráfico que representa la actividad de la parkina (N=6). * Significativamente distinto, ANOVA con comparación múltiple de Neumann Keuls, $p < 0,05$.

La Figura 69 muestra que TDP-43 inhibe la actividad del proteasoma y altera los niveles de parkina. Se proporcionan análisis de transferencia de Western de lisados cerebrales corticales solubles de distintas camadas de ratones transgénicos para TDP-43 machos y hembras mixtos y compañeros de camada de control no transgénicos en un gel SDS NuPAGE al 4-12 % que muestra A) los niveles de TDP-43 humana explorados con el anticuerpo 2E2-D3 (1ª transferencia), niveles de parkina total (2ª transferencia), ubiquitina (3ª transferencia) y actina (4ª transferencia). B) muestra que el sedimento se resuspendió en urea 4 M para extraer la fracción de proteínas insolubles y se realizó una transferencia de Western que muestra la parkina insoluble (1ª transferencia) y TDP-43 insoluble (2ª transferencia) en comparación con el control de carga de actina (3ª transferencia). C) muestra un análisis de densitometría de las transferencias de A y B que muestra los niveles de proteína parkina soluble e insoluble normalizados con respecto a la actina y la relación de parkina soluble con respecto a la insoluble. D) muestra una medición por ELISA del nivel de parkina en extractos cerebrales solubles (extractos con STEN) e insolubles (urea 4 M) en comparación con extractos cerebrales de -/- para parkina como control de especificidad. E) es un análisis de transferencia de Western de lisados cerebrales corticales en un gel SDS NuPAGE al 4-12 % que muestra los niveles de proteína soluble de la ubiquitina ligasa E3 SIAH2 (1ª transferencia) y su proteína diana HIF-1 α (2ª transferencia) en comparación con el control de carga de actina. F) muestra el análisis de densitometría de las transferencias en D normalizadas con respecto al control de actina, N=4, ANOVA con Neumann Keuls, $P < 0,05$. G) muestra el análisis de transferencia de Western de lisados de células M17 en un gel SDS NuPAGE al 4-12 % que muestra los niveles de TDP-43 humana (1ª transferencia), los niveles de parkina total (2ª transferencia), ubiquitina (3ª transferencia) SIAH2 (4ª transferencia) y actina (5ª transferencia) en células que expresan TDP-43 y parkina de tipo silvestre. H) es un análisis de transferencia de Western de lisados de células M17 en un gel SDS NuPAGE al 4-12 % que muestra los niveles de TDP-43 humana (1ª transferencia), los niveles de parkina total (2ª transferencia), ubiquitina (3ª transferencia) SIAH2 (4ª transferencia) y actina (5ª transferencia) en células que expresan lacZ y parkina de tipo silvestre. I) muestra histogramas que representan la actividad de quimotripsina del proteasoma en células de neuroblastoma M17. * Significativamente distinto, ANOVA, Neumann Keuls, $P < 0,05$, N=6 para células.

La Figura 70 muestra que la expresión lentivírica de TDP-43 en la corteza motora de rata da como resultado la detección de TDP-43 en interneuronas preganglionares de la médula espinal cervical. Se muestra la tinción de

cortes de 20 µm de grosor de cerebro de rata al que se le inyectó TDP-43 lentivírica en el hemisferio derecho y LacZ lentivírica en el hemisferio izquierdo, que muestra A) neuronas en la corteza motora de rata teñidas con anticuerpo anti-TDP-43 que detecta TDP-43 humana y de rata, y núcleos teñidos con DAPI en el hemisferio al que se le inyectó LacZ lentivírica y B) al que se le inyectó TDP-43. C) muestra que las neuronas en la corteza motora de rata teñidas con anticuerpo anti-TDP-43 que detecta TDP-43 humana y núcleos teñidos con DAPI en el hemisferio al que se inyectó LacZ lentivírica y D) al que se inyectó TDP-43. E) es una representación esquemática de la corteza motora inyectada con respecto a la región contralateral de la médula espinal y a la vía medular dorsocortical (DCST, de inglés *dorso-cortical spinal tract*). Se muestra la tinción de cortes de 20 µm de grosor que muestran interneuronas preganglionares de la médula espinal cervical teñidas con F). anticuerpo monoclonal de ratón para hTDP-43 (Abnova) que reconoce TDP-43 humana y G). anticuerpo policlonal de rata anti-TDP-43 (ProteinTech) que reconoce tanto la humana como de rata, y núcleos teñidos con DAPI contralaterales a la corteza a la que se le inyectó TDP-43 lentivírica y H (TDP-43) e I (hTDP-43) contralaterales al hemisferio al que se le inyectó LacZ. También se muestra la tinción de cortes de 20 µm de grosor que muestran fibras en la DCST teñidas con J) anticuerpo monoclonal de ratón para hTDP-43 y DAPI y K) anticuerpo policlonal de conejo anti-TDP-43, DAPI contralateral a la corteza a la que se le inyectó TDP-43 lentivírica. L muestra TDP-43 y M muestra hTDP-43. También se realizó una tinción con TDP-43 y DAPI en la DCST contralateral al hemisferio al que se le inyectó LacZ. N) muestra la DCST teñida con azul de toluidina contralateral a la corteza a la que se le inyectó TDP-43 lentivírica en comparación con O) hemisferio al que se le inyectó LacZ. Lv: lentivirus.

La Figura 71 muestra que la parkina lentivírica aumenta la colocalización citosólica de ubiquitina y TDP-43. La tinción de cortes de 20 µm de grosor de cerebro de rata al que se le inyectó TDP-43 lentivírica en el hemisferio derecho y LacZ lentivírica en el hemisferio izquierdo muestra A) neuronas en la corteza motora de rata teñidas con monoclonal de ratón anti-parkina (Millipore), B) anticuerpos policlonales de conejo anti-TDP-43, C) parkina, TDP-43 y DAPI en el hemisferio al que se le inyectó LacZ lentivírica. D) muestra neuronas en la corteza motora de rata teñidas con monoclonal de ratón anti-ubiquitina y E) anticuerpos anti-TDP-43 policlonales de conejo. F) muestra la ubiquitina, TDP-43 y DAPI en el hemisferio al que se le inyectó TDP-43 lentivírica. G) muestra neuronas en la corteza motora de rata teñidas con monoclonal de ratón anti-parkina y H) anticuerpos anti-TDP-43 policlonales de conejo. I) muestra la parkina, TDP-43 y DAPI en animales a los que se les ha coinyectado TDP-43 y parkina lentivíricas. J) muestra neuronas en la corteza motora de rata teñidas con monoclonal de ratón anti-ubiquitina y K) anticuerpos anti-TDP-43 policlonales de conejo. L) muestra núcleos teñidos para ubiquitina, TDP-43 y con DAPI en animales a los que se les ha coinyectado TDP-43 y parkina lentivíricas. Se muestran neuronas en la corteza motora de rata teñidas con M) anticuerpos monoclonales de ratón anti-parkina, N) anticuerpos policlonales de conejo anti-TDP-43 y O) parkina, TDP-43 y núcleos teñidos con DAPI en animales a los que se inyectó parkina lentivírica sola. Lv: lentivírico.

La Figura 72 muestra que la parkina participa en la ubiquitinación enlazada en K48 y K63 de TDP-43. La transferencia de Western de muestras de entrada de lisados cerebrales corticales analizadas en un gel SDS NuPAGE al 4-12 % muestra A) los niveles de expresión de parkina (1ª transferencia), niveles de proteína unida a ubiquitina (2ª transferencia) y niveles de TDP-43 (3ª transferencia), en comparación con el control de carga de actina en la corteza de rata a la que se le inyectó LacZ, TDP-43, parkina, TDP-43+parkina y mutante T240R+TDP-43 lentivíricas. Se inmunoprecipitaron un total de 100 mg de muestras cerebrales corticales utilizando un policlonal de conejo anti-TDP-43 y se exploraron con anticuerpo anti-ubiquitina (1:1000) (4ª transferencia) en comparación con el control de carga de actina (5ª transferencia) de las muestras de entrada. B) muestra una transferencia de Western de muestras de entrada y de parkina inmunoprecipitada (transferencia de la parte superior) y TDP-43 (transferencia de la parte inferior) de ratones transgénicos utilizados para medir la actividad de ubiquitina ligasa E3 parkina. C) muestra histogramas que representan la actividad de ubiquitina ligasa E3 parkina en presencia y ausencia de TDP-43 humana inmunoprecipitada de ratones transgénicos para TDP-43, en comparación con la actividad de ubiquitina ligasa E3 usando parkina recombinante (sPar), cadena de poliubiquitina como control y una combinación de control de E1-E2-E3 sintéticas. N=8, P<0,05, ANOVA con Neumann Keuls. D) es un análisis de TW que muestra TDP-43 ubiquitinada en presencia de K48 y K63 y E) es un análisis de TW que muestra parkina ubiquitinada en K48 y K63. F) muestra histogramas que representan la actividad de quimotripsina del proteasoma en lisados cerebrales corticales recientes de ratas a las que se les ha inyectado LacZ, parkina, TDP-43 y TDP-43+parkina lentivíricas. * indica una diferencia significativa, ANOVA, Neumann Keuls, P<0,05, N=8. G). Se proporcionan análisis de transferencia de Western de lisados cerebrales corticales en un gel SDS NuPAGE al 4-12 % que muestra los niveles de HDAC6 (1ª transferencia) y P62 (2ª transferencia), y un control de actina (3ª transferencia). H) es un análisis de densitometría de las transferencias de E de modelos animales de transferencia génica. * Indica significativamente distinto, ANOVA, Neumann Keuls, P<0,05, N=8.

La Figura 73 muestra que TDP-43 forma un complejo multiproteico con parkina y HDAC6. Transferencia de Western de muestras de entrada de lisados cerebrales corticales en ratones transgénicos para A315T y los compañeros de camada de control analizados en gel SDS NuPAGE al 4-12 % que muestra, A) muestra los niveles de expresión de TDP-43 humana (1ª transferencia) e inmunoprecipitación de TDP-43 que muestra a TDP-43 (2ª transferencia), a la parkina (3ª transferencia) y a HDAC6 (4ª transferencia) formando un complejo proteico. B) representa el experimento de inmunoprecipitación inversa, donde la transferencia de Western de muestras de entrada de lisados cerebrales corticales en ratones transgénicos para A315T y los compañeros de camada de control analizados en SDS NuPAGE al 4-12 % muestra los niveles de expresión de parkina (1ª transferencia) y la inmunoprecipitación de parkina que muestra a TDP-43 (2ª transferencia), la parkina (3ª transferencia) y a HDAC6 (4ª transferencia). La fluorescencia de GFP y la tinción con DAPI nuclear en células de neuroblastoma M17

humanas vivas muestran C) células transfectadas con GFP-TDP-43 solo que muestran la fluorescencia de GFP dentro del núcleo. D y E) muestran células transfectadas con GFP-TDP-43 y parkina que muestran fluorescencia de GFP en el citosol y en prolongaciones celulares. El recuadro de detalle D muestra un aumento mayor. F) muestra células transfectadas con GFP-TDP-43 y parkina tratadas con el inhibidor de HDAC6 tubacina 5 μ M, durante 24 horas, mostrando fluorescencia de GFP dentro de los núcleos teñidos con DAPI. G). muestra células transfectadas con GFP-TDP-43 durante 24 horas y tratadas con tubacina durante 24 horas adicionales. H) muestra células transfectadas con GFP-TDP-43 y T240R, que muestran la falta de fluorescencia de GFP con parkina mutante. I) muestra una qRT-PCR que muestra ARNm de Park2 en células M17 transfectadas con LacZ TDP-43, parkina y TDP-43+parkina. J) muestra la cuantificación de qRT-PCR que muestra los niveles relativos de ARNm de Park2 normalizados con respecto a GADPH y expresados como % del control. N=4, P<0,05, ANOVA, Neumann Keuls. K) muestra una qRT-PCR que muestra ARNm de Park2 en corteza de rata a la que se le coinyectó LacZ (control no inyectado), TDP-43, parkina y TDP-43+parkina. L) muestra la cuantificación de qRT-PCR que muestra los niveles relativos de ARNm de Park2 normalizados con respecto a GADPH y expresados como % del control. N=4, P<0,05, ANOVA, Neumann Keuls. M) muestra qRT-PCR que muestra ARNm de Park2 en TDP43-Tg y corteza de control. N) muestra la cuantificación de qRT-PCR que muestra los niveles relativos de ARNm de Park2 normalizados con respecto a GADPH y expresados como % del control. N=3, P<0,05, ANOVA, Neumann Keuls. La Figura 74 es un esquema que muestra los posibles efectos de la parkina sobre la localización de TDP-43. La Figura 75 muestra la distribución de TDP-43 etiquetada con GFP en células M17 transfectadas con 3 mg de ADNc durante 24 horas y luego tratadas con Nilotinib (10 mM) o Bosutinib (5 mM), y el inhibidor de HDAC6 Tubacina (5 mM) durante 24 horas adicionales. Los recuadros de detalle (B y D) representan imágenes de mayor aumento que muestran la translocación de TDP-43 marcada con GFP desde el núcleo (A) hacia el citosol (B y D y recuadro de detalle), mientras que la tubacina altera la translocación.

Descripción detallada

En el presente documento se proporcionan compuestos para su uso en métodos de tratamiento o prevención de la enfermedad neurodegenerativa esclerosis lateral amiotrófica, en un sujeto. Los métodos utilizan inhibidor de las tirosina cinasas como se define en las reivindicaciones en donde el inhibidor de las tirosina cinasas no es Gleevec y en donde el inhibidor de las tirosina cinasas cruza la barrera hematoencefálica. El inhibidor de las tirosina cinasas es nilotinib, bosutinib, o una combinación de los mismos.

En el presente documento se proporciona un compuesto para su uso en un método de tratamiento o prevención de la esclerosis lateral amiotrófica en un sujeto, que comprende seleccionar un sujeto con esclerosis lateral amiotrófica con riesgo de esclerosis lateral amiotrófica y administrar al sujeto una cantidad efectiva de un inhibidor de las tirosina cinasas, como se describe a lo largo del presente documento. El inhibidor de las tirosina cinasas no es Gleevec y el inhibidor de las tirosina cinasas cruza la barrera hematoencefálica. El inhibidor de las tirosina cinasas se selecciona del grupo que consiste en nilotinib, bosutinib y una combinación de los mismos.

Los ejemplos de inhibidores de las tirosina cinasas son nilotinib, bosutinib, o una combinación de los mismos. Nilotinib (o AMN-107), que se comercializa como TASIGNA® (Novartis, Basilea, Suiza) y Bosutinib (o SKI-606) (Pfizer, Nueva York, NY) son inhibidores de la tirosina cinasa Bcr-Abl desarrollados como alternativas al inhibidor de la tirosina cinasa Bcr-Abl y tratamiento de la LMC, Imatinib. Nilotinib es un inhibidor de la cinasa Abelson (cinasa c-Abl), mientras que Bosutinib es un inhibidor doble de las cinasas Src y c-Abl. Estos agentes son agentes terapéuticos contra el cáncer que bloquean la proliferación celular de las células cancerosas y actualmente se usan principalmente en el tratamiento de la leucemia mielógena crónica (LMC).

En los trastornos neurodegenerativos, el flujo autofágico normal está alterado, dando como resultado la acumulación de vacuolas autofágicas o autofagosomas. Esto se muestra en los Ejemplos en los que se observa la acumulación de vacuolas en pacientes humanos con actividad de solubilidad de parkina disminuida. La autofagia normal es un proceso dinámico de múltiples etapas que impide la acumulación de proteínas mediante el secuestro en vacuolas autofágicas (autofagosomas). La fusión posterior de los autofagosomas con los lisosomas da como resultado la degradación de proteínas. La interrupción de este proceso da como resultado la acumulación de agregados proteicos y la neurodegeneración. La parkina es una ligasa E3 implicada en la degradación proteasómica y autofágica a través de la ubiquitinación de proteínas y la maduración del autofagosoma.

La inhibición de la tirosina cinasa activa la eliminación de proteínas agregadas y/o activa la ubiquitinación mediadas por la parkina. La activación de la parkina por los inhibidores de las tirosina cinasas regula al alza los niveles de proteína beclina, facilitando así la eliminación autofágica. Por ejemplo, nilotinib, bosutinib o una combinación de los mismos, activa la eliminación de proteínas agregadas y/o activa la ubiquitinación mediadas por parkina. De manera significativa, tanto nilotinib como bosutinib cruzan la barrera hematoencefálica y estimulan la actividad de la parkina en el sistema nervioso central. La actividad de la parkina estimula la eliminación autofágica del amiloide beta y la sinucleína alfa y provoca mecanismos protectores para la ubiquitinación de la parkina, por ejemplo, el secuestro de TDP-43 asociado con esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y demencia frontotemporal. Adicionalmente, los inhibidores de las tirosina cinasas rescatan a las células cerebrales de la muerte apoptótica en las enfermedades neurodegenerativas. En el caso de la ELA, los inhibidores aumentan la ubiquitinación de TDP-43 y la translocan desde

el núcleo, donde interactúa de manera perjudicial con ARNm y miles de genes, al citosol, donde es secuestrada.

El método incluye seleccionar un sujeto con una enfermedad neurodegenerativa o con riesgo de desarrollar una enfermedad neurodegenerativa. Un experto en la materia sabe cómo diagnosticar a un sujeto con o en riesgo de desarrollar una enfermedad neurodegenerativa. Por ejemplo, una o más de las siguientes pruebas pueden ser pruebas genéticas (por ejemplo, identificación de una mutación en el gen de TDP-43) o análisis familiar (por ejemplo, antecedentes familiares), obtención de imágenes del sistema nervioso central (por ejemplo, obtención de imágenes por resonancia magnética y tomografía de emisión de positrones), pruebas clínicas o conductuales (por ejemplo, evaluaciones de la debilidad muscular, del temblor o de la memoria), pruebas de laboratorio.

Opcionalmente, el método incluye además la administración de un segundo agente terapéutico al sujeto. El segundo agente terapéutico se selecciona del grupo que consiste en levodopa, un agonista de la dopamina, un agente anticolinérgico, un inhibidor de la monoaminooxidasa, un inhibidor de la COMT, amantadina, rivastigmina, un antagonista del NMDA, un inhibidor de colinesterasa, riluzol, un agente antipsicótico, un antidepresivo y tetrabenacina.

Como ejemplo, en el presente documento se proporciona un método de tratamiento de la esclerosis lateral amiotrófica en un sujeto. El método incluye seleccionar un sujeto con esclerosis lateral amiotrófica, en donde el sujeto tiene una patología por TDP-43, y administrar al sujeto una cantidad efectiva del inhibidor de las tirosina cinasas. La patología por TDP-43 puede ser, por ejemplo, una mutación de TDP-43.

El inhibidor de las tirosina cinasas es un inhibidor de las tirosina cinasas que no es Gleevec y cruza la barrera hematoencefálica. El inhibidor de las tirosina cinasas se selecciona del grupo que consiste en nilotinib, bosutinib y una combinación de los mismos. La patología por TDP-43 se produce en la ELA y se ha observado un nivel elevado de TDP-43 en el citoplasma en algunos casos de ELA. Se han descubierto mutaciones en el gen que codifica la proteína TDP-43 (conocida como TARDBP) en algunas personas con ELA. Por tanto, TDP-43 mutada o las mutaciones en TARDBP pueden servir como biomarcadores para un sujeto con riesgo de ELA.

También se proporciona en el presente documento un método para estimular la actividad de la parkina en un sujeto. El método incluye seleccionar un sujeto con un trastorno asociado con una actividad disminuida de la parkina y administrar al sujeto una cantidad efectiva del inhibidor de las tirosina cinasas. Por ejemplo, el inhibidor de las tirosina cinasas es un inhibidor de las tirosina cinasas que no es Gleevec y cruza la barrera hematoencefálica. El inhibidor de las tirosina cinasas se selecciona del grupo que consiste en nilotinib, bosutinib y una combinación de los mismos.

Se conocen en la técnica métodos para medir la actividad de la parkina. Véase, por ejemplo, Schlossmacher y Shimura ("Parkinson's disease: assays for the ubiquitin ligase activity of neural Parkin", *Methods Mol. Biol.* 301: 351-69 (2005)); Morrison *et al.* ("A simple cell based assay to measure Parkin activity", *J. Neurochem.* 116(3): 342-9 (2011)) y Burns *et al.* (*Hum. Mol. Genet.* 18 3206-3216 (2009)).

La expresión cantidad efectiva, como se usa a lo largo del presente documento, se define como cualquier cantidad necesaria para producir una respuesta fisiológica deseada. La cantidad efectiva es generalmente menor que la cantidad utilizada en los métodos quimioterapéuticos para tratar el cáncer o la leucemia, pero es una cantidad suficiente para activar la parkina. Por tanto, la dosificación del inhibidor de las tirosina cinasas en los presentes métodos es opcionalmente más baja que una dosificación quimioterapéutica del inhibidor. Por ejemplo, la dosificación es opcionalmente inferior a aproximadamente 10 mg/kg y puede ser de 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 mg/kg. Un experto en la materia ajustaría la dosificación como se describe a continuación basándose en las características específicas del inhibidor y del sujeto que lo recibe.

Adicionalmente, la duración del tratamiento puede ser mayor en los presentes métodos que la duración del tratamiento quimioterapéutico, por ejemplo, el tratamiento del cáncer. Por ejemplo, la administración a un sujeto con o en riesgo de desarrollar una enfermedad neurodegenerativa podría ser al menos diaria (por ejemplo, una vez, dos veces, tres veces al día) durante semanas, meses o años, siempre que el efecto sea sostenido y los efectos secundarios sean tratables.

Hay varias formas de activar a la parkina. La inmunoprecipitación de parkina y la incubación con una serie de enzimas activadoras y enlazadoras (E y E2) y ATP dan como resultado la autoubiquitinación de la parkina y confieren actividad para ubiquitinar dianas como Abeta y TDP-43. Así, para aumentar la actividad de la parkina, se debe aumentar la expresión de parkina. Esto se puede lograr mediante la introducción vírica de parkina, lo que conduce a la sobreexpresión de la proteína y a una actividad aumentada. Como se muestra en los Ejemplos, este método aumenta repetidamente la degradación de proteínas a través del proteasoma y/o de autofagia. La parkina también puede activarse mediante la administración de una tirosina cinasa, tal como, por ejemplo, nilotinib o bosutinib, lo que conduce a niveles aumentados de parkina y una actividad aumentada.

Las cantidades eficaces y las pautas para administrar el inhibidor de las tirosina cinasas pueden determinarse empíricamente, y realizar dichas determinaciones está dentro de la experiencia en la técnica. Los intervalos de dosificación para la administración son los que sean lo suficientemente amplios como para producir el efecto deseado

en el que uno o más síntomas de la enfermedad o trastorno quedan afectados (por ejemplo, se reducen o retardan). La dosificación no debería ser tan grande como para provocar efectos secundarios adversos sustanciales, tales como reacciones cruzadas no deseadas, muerte celular. En general, la dosificación variará con el tipo de inhibidor, la especie, la edad, el peso corporal, el estado de salud general, el sexo y la alimentación del sujeto, el modo y el momento de administración, la tasa de excreción, la combinación de fármacos y la gravedad de la afección particular, y puede determinarla un experto en la materia. Cada médico puede ajustar la dosificación en el caso de cualquier contraindicación. Las dosificaciones pueden variar y se pueden administrar diariamente en una o más administraciones de dosis.

10 El inhibidor de las tirosina cinasas se administra por vía sistémica y preferentemente por vía oral.

La puesta en contacto se realiza *in vivo* o *in vitro*. El método *in vivo* es útil en el tratamiento de un sujeto con o en riesgo de desarrollar agregados proteicos tóxicos y comprende administrar el inhibidor de las tirosina cinasas como se describe anteriormente. El método *in vitro* es útil, por ejemplo, en el tratamiento de células neurales antes de un trasplante. El inhibidor de las tirosina cinasas generalmente se añade a un medio de cultivo. Opcionalmente, las neuronas diana se ponen en contacto con un segundo agente terapéutico como se ha descrito anteriormente.

La divulgación también proporciona un envase o kit farmacéutico que comprende un acondicionamiento y/o uno o más recipientes llenos con uno o más de los ingredientes de las composiciones farmacéuticas. También se pueden incluir instrucciones para el uso de la composición.

En el presente documento se proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad efectiva del inhibidor de las tirosina cinasas en un portador farmacéuticamente aceptable. La expresión portador significa un compuesto, composición, sustancia o estructura que, cuando se combina con un compuesto o composición, ayuda o facilita la preparación, almacenamiento, administración, suministro, eficacia, selectividad o cualquier otra característica del compuesto o composición para su uso o fin previsto. Por ejemplo, el portador puede seleccionarse para minimizar cualquier degradación del principio activo y para minimizar cualquier efecto secundario adverso en el sujeto. Dichos portadores farmacéuticamente aceptables incluyen portadores farmacéuticos biocompatibles estériles, incluyendo, pero sin limitación, solución salina, solución salina tamponada, líquido cefalorraquídeo artificial, dextrosa y agua.

Dependiendo del modo de administración previsto, la composición farmacéutica puede estar en forma de formas farmacéuticas sólidas, semisólidas o líquidas, tal como, por ejemplo, comprimidos, supositorios, pastillas, cápsulas, polvos, líquidos, aerosoles o suspensiones, preferentemente en una forma farmacéutica unitaria adecuada para la administración individual de una dosificación precisa. Las composiciones incluirán una cantidad terapéuticamente efectiva del compuesto descrito en el presente documento o derivados del mismo en combinación con un portador farmacéuticamente aceptable y, además, puede incluir otros agentes medicinales, agentes farmacéuticos, portadores o diluyentes. Por farmacéuticamente aceptable se entiende un material que no es biológicamente o de otro modo indeseable, que puede administrarse a un individuo junto con el compuesto seleccionado sin provocar efectos biológicos inaceptables o interactuar de manera perjudicial con los demás componentes de la composición farmacéutica en la que está contenido.

Como se usa en el presente documento, el término portador abarca cualquier excipiente, diluyente, carga, sal, tampón, estabilizante, solubilizante, lípido u otro material bien conocido en la técnica para su uso en formulaciones farmacéuticas. La elección de un portador para su uso en una composición dependerá de la vía de administración prevista para la composición. La preparación de portadores y formulaciones farmacéuticamente aceptables que contienen estos materiales se describe en, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 21ª Edición, ed. University of the Sciences in Philadelphia, Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia Pa., 2005. Como ejemplos de portadores fisiológicamente aceptables se incluyen tampones tales como tampones de fosfato, tampón de citrato y tampones con otros ácidos orgánicos; antioxidantes, incluyendo ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular (de menos de aproximadamente 10 restos); proteínas, tales como seroalbúmina, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; alcoholes de azúcar, tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sal tales como sodio; y/o tensoactivos no iónicos como TWEEN® (ICI, Inc.; Bridgewater, Nueva Jersey), polietilenglicol (PEG) y PLURONICSTM (BASF; Florham Park, NJ).

Las composiciones que contienen el compuesto descrito en el presente documento o sales o profármacos farmacéuticamente aceptables del mismo adecuados para inyección parenteral pueden comprender soluciones acuosas o no acuosas, dispersiones, suspensiones o emulsiones estériles fisiológicamente aceptables, y polvos estériles para reconstitución en soluciones o dispersiones inyectables estériles. Los ejemplos de portadores, diluyentes, disolventes o vehículos acuosos y no acuosos adecuados incluyen agua, etanol, polioles (propilenglicol, polietilenglicol, glicerol), mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales (tales como aceite de oliva) y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. La fluidez apropiada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partículas necesario en el caso de dispersiones y mediante el uso de tensoactivos.

Estas composiciones también pueden contener adyuvantes tales como agentes conservantes, hidratación, emulsionantes y dispensadores. Se puede propiciar la prevención de la acción de microorganismos mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico. También pueden incluirse agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, cloruro de sodio. La absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable puede conseguirse mediante el uso de agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Las formas farmacéuticas sólidas para la administración oral de los compuestos descritos en el presente documento o sales o profármacos farmacéuticamente aceptables de los mismos incluyen cápsulas, comprimidos, pastillas, polvos y gránulos. En tales formas farmacéuticas sólidas, los compuestos descritos en el presente documento o derivados del mismo se mezclan con al menos un excipiente (o portador) inerte habitual, tal como citrato de sodio o fosfato dicálcico, o (a) cargas o expansores, como por ejemplo, almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y ácido silícico, (b) aglutinantes, como por ejemplo, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa y goma arábiga, (c) humectantes, como por ejemplo, glicerol, (d) agentes disgregantes, como por ejemplo, agar-agar, carbonato de calcio, almidón de patata o tapioca, ácido algínico, determinados silicatos complejos y carbonato de sodio, (e) retardadores de soluciones, como por ejemplo, parafina, (f) acelerantes de la absorción, como por ejemplo, compuestos de amonio cuaternario, (g) agentes humectantes, como por ejemplo, alcohol cetílico y monoestearato de glicerol, (h) adsorbentes, como por ejemplo, caolín y bentonita, y (i) lubricantes, como por ejemplo, talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, lauril sulfato de sodio y/o mezclas de los mismos. En el caso de las cápsulas, comprimidos y píldoras, las formas farmacéuticas también pueden comprender agentes tamponantes.

También pueden emplearse composiciones sólidas de tipo similar como rellenos en cápsulas de gelatina blanda y dura utilizando excipientes como la lactosa o el azúcar de la leche, así como polietilenglicoles de alto peso molecular.

Las formas farmacéuticas sólidas, tales como comprimidos, grageas, cápsulas, píldoras y granulados, pueden prepararse con recubrimientos y cubiertas, tales como recubrimientos entéricos y otros materiales conocidos en la técnica. Pueden contener agentes opacificantes y también pueden tener una composición tal que liberen el compuesto o compuestos activos en una determinada parte del tracto intestinal de manera retardada. Como ejemplos de composiciones de inclusión que pueden usarse se incluyen sustancias poliméricas y ceras. Los compuestos activos también pueden estar en forma microencapsulada, si se considera apropiado, con uno o más de los excipientes mencionados anteriormente.

Las formas farmacéuticas líquidas para administración oral de los compuestos descritos en el presente documento o sales o profármacos farmacéuticamente aceptables de los mismos incluyen emulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables. Además de los compuestos activos, las formas farmacéuticas líquidas pueden contener un diluyente inerte comúnmente usado en la técnica, tal como agua u otros disolventes, agentes solubilizantes y emulsionantes, como por ejemplo, alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, dimetilformamida, aceites, en particular, aceite de semilla de algodón, aceite de cacahuate, aceite de germen de maíz, aceite de oliva, aceite de ricino, aceite de sésamo, glicerol, alcohol tetrahidrofurfurílico, polietilenglicoles y ésteres de ácidos grasos de sorbitán, o mezclas de estas sustancias.

Además de dichos diluyentes inertes, la composición también puede incluir agentes adicionales, tales como agentes humectantes, emulsionantes, agentes de suspensión, edulcorantes, aromatizantes o perfumantes.

Las suspensiones, además de los compuestos activos, puede contener agentes adicionales, como por ejemplo, alcoholes isoestearílicos etoxilados, polioxietilensorbitol y ésteres de sorbitán, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar-agar y tragacanto, o mezclas de estas sustancias.

Las composiciones de los compuestos descritos en el presente documento o sales o profármacos farmacéuticamente aceptables de los mismos para administración rectal son opcionalmente supositorios, que pueden prepararse mezclando los compuestos con excipientes o portadores no irritantes adecuados, tales como manteca de cacao, polietilenglicol o una cera de supositorio, que son sólidos a temperatura ordinaria pero líquidos a temperatura corporal y, por lo tanto, se fundirán en el recto o en la cavidad vaginal y liberarán el componente activo.

A lo largo del presente documento, tratar, que trata y tratamiento se refieren a un método para reducir o retrasar uno o más efectos o síntomas de una enfermedad o trastorno neurodegenerativo. El sujeto se le puede diagnosticar enfermedad o trastorno. Tratamiento también puede referirse a un método para reducir la patología subyacente en lugar de solo los síntomas. El efecto de la administración al sujeto puede tener el efecto de, pero sin limitación, reducir uno o más síntomas de la enfermedad o trastorno neurodegenerativo, una reducción de la gravedad de la enfermedad o lesión neurológica, la eliminación completa de la enfermedad o la lesión neurológica, o un retraso en el inicio o empeoramiento de uno o más síntomas. Por ejemplo, un método divulgado se considera un tratamiento si hay una reducción de aproximadamente el 10 % de uno o más síntomas de la enfermedad en un sujeto en comparación con el sujeto antes del tratamiento o en comparación con un sujeto de control o un valor de control. Por tanto, la reducción

puede ser de aproximadamente el 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 % o cualquier cantidad de reducción intermedia.

Como se utiliza en el presente documento, por prevenir, que previene o prevención se entiende un método para impedir, retrasar, evitar, obviar, impedir, detener o dificultar el inicio, incidencia, gravedad o recurrencia de la enfermedad o trastorno neurodegenerativo. Por ejemplo, el método divulgado se considera una prevención si hay una reducción o retraso en el inicio, incidencia, gravedad o recurrencia de la neurodegeneración o de uno o más síntomas de neurodegeneración (por ejemplo, temblor, debilidad, pérdida de memoria, rigidez, espasticidad, atrofia) en un sujeto susceptible a la neurodegeneración en comparación con sujetos de control susceptibles a la neurodegeneración que no recibieron un agente que activa la parkina. El método divulgado también se considera una prevención si hay una reducción o retraso en el inicio, incidencia, gravedad o recurrencia de la neurodegeneración o uno o más síntomas de neurodegeneración en un sujeto susceptible a la neurodegeneración después de recibir un agente que estimula la actividad de la parkina en comparación con la progresión del sujeto antes de recibir el tratamiento. Por tanto, la reducción o el retraso en el inicio, incidencia, gravedad o recurrencia de la neurodegeneración puede ser de aproximadamente el 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 % o cualquier cantidad de reducción intermedia.

Como se usa a lo largo del presente documento, por sujeto se entiende un individuo. Preferentemente, el sujeto es un mamífero tal como un primate y, más preferentemente, un ser humano. Los primates no humanos también son sujetos. El término sujeto incluye animales domesticados, tales como gatos, perros, etc., ganado (por ejemplo, ganado bovino, caballos, cerdos, ovejas, cabras, etc.) y animales de laboratorio (por ejemplo, hurón, chinchillas, ratón, conejo, rata, jerbo, cobayas, etc.). Por tanto, en el presente documento se contemplan usos veterinarios y formulaciones médicas.

Se divulgan materiales, composiciones y componentes que se pueden usar para, se pueden usar junto con, se pueden usar en la preparación de, o son productos de los métodos y composiciones divulgados. En el presente documento se divulgan estos y otros materiales y se entiende que cuando las combinaciones, subconjuntos, interacciones, grupos, etc. de estos materiales se divulgan, aunque la referencia específica a cada una de diversas combinaciones colectivas e individuales y permutaciones de estos compuestos puede no divulgarse explícitamente, cada uno se contempla específicamente y se describe en el presente documento.

30 Ejemplos

Los ejemplos que no se relacionan con la materia objeto abarcada por las reivindicaciones son para referencia.

Ejemplo 1

Los métodos para los experimentos con animales descritos en el presente documento se detallan en los Ejemplos 2-5. Los experimentos con cultivos celulares se mencionan a continuación y se explican en Burns *et al.* (Human Molecular Genetics. 2009) y Rebeck *et al.* (J. Biol. Chem. 2010, 285:7440-7446). Se proporcionan detalles adicionales en la breve descripción de las figuras. Usando estos métodos, se estudiaron los mecanismos celulares (Fig. 1) asociados con la actividad de la parkina en afecciones neurodegenerativas y tras la intervención con inhibidores de las tirosina cinasas. Estos estudios revelaron que la inhibición de la tirosina cinasa activa la parkina y aumenta su interacción con beclina 1, lo que da como resultado la maduración de los fagóforos en fagosomas y la eliminación (Fig. 2). También se ha demostrado que la parkina interactúa con la beclina 1 en ratones de tipo silvestre, pero no en ratones *-/-* para parkina (Fig. 3). Como se muestra en las Figuras 4-5, los ratones 3X APP tratados con Nilotinib o Bosutinib dieron como resultado una reducción de A β ₁₋₄₂ en los lisados cerebrales de estos ratones en comparación con el tratamiento con DMSO. Además, como se muestra en las Figuras 6-8, el tratamiento de ratones A53T (A53T-Tg) con Bosutinib en distintas dosificaciones y pautas posológicas dio como resultado una disminución de la sinucleína α humana en los lisados cerebrales de estos ratones, en comparación con el tratamiento con DMSO. Además, como se muestra en las Figuras 9-10, el tratamiento de ratones A53T (A53T-Tg) con Nilotinib en distintas dosificaciones y pautas posológicas dio como resultado una disminución de la sinucleína α humana en los lisados cerebrales de estos ratones, en comparación con el tratamiento con DMSO. Disminuciones de la A β ₁₋₄₂ soluble humana y la A β ₁₋₄₀ soluble humana en los lisados cerebrales de ratones APP-AD triple mutantes también se observaron después del tratamiento con Bosutinib (Figs. 11A y B). El tratamiento con Bosutinib también dio como resultado niveles aumentados de parkina y niveles disminuidos de Tau fosforilada (Fig. 11C y D).

En otros experimentos, se trataron células M17 transfectadas con ADNc de Tau con Nilotinib y Tubacina (un inhibidor de HDAC6). El tratamiento con Nilotinib dio como resultado una disminución de Tau humana, una disminución de A β ₁₋₄₂ humana y una disminución de sinucleína α en comparación con las células transfectadas.

El tratamiento con bosutinib de ratones a los que se les inyectó A β ₁₋₄₂ lentivírica también dio como resultado niveles disminuidos de A β ₁₋₄₂ en lisados cerebrales (Fig. 12).

En otro experimento, se inyectó a ratones de forma estereotáctica (bilateralmente) sinucleína α lentivírica en la sustancia negra durante 3 semanas. A continuación, a la mitad de los animales se les inyectó nilotinib 10 mg/kg y a la otra mitad DMSO. Se compararon los efectos de la expresión de sinucleína α y la inhibición de las tirosina cinasas

sobre los niveles de sinucleína α en el cerebro (Fig. 13A) y en sangre (Fig. 13B). Como se muestra en la Fig. 13, la expresión de sinucleína α en el cerebro aumenta su nivel en sangre y la inhibición de las tirosina cinasas invierte estos efectos de una manera dependiente de parkina.

5 En otro experimento, se inyectó a ratones de forma estereotáctica (bilateralmente) sinucleína α lentivírica en la sustancia negra durante 3 semanas. A continuación, a la mitad de los animales se les inyectó Bosutinib 5 mg/kg y a la otra mitad DMSO. Se compararon los efectos de la expresión de sinucleína α y la inhibición de las tirosina cinasas sobre los niveles de sinucleína α en el cerebro (Fig. 14A) y en sangre (Fig. 14B). Como se muestra en la Fig. 14, la expresión de sinucleína α en el cerebro aumenta su nivel en sangre y la inhibición de las tirosina cinasas invierte estos
10 efectos de una manera dependiente de parkina.

En otro estudio, se inyectó a ratones de forma estereotáctica (bilateralmente) sinucleína α lentivírica en la sustancia negra durante 3 semanas. Luego, a la mitad de los animales se les inyectó Nilotinib 10 mg/kg o Bosutinib 5 mg/kg y a la otra mitad DMSO. Como se muestra en la Figura 185, se compararon los efectos de la expresión de sinucleína α y la inhibición de las tirosina cinasas sobre los niveles de dopamina y de ácido homovanílico (HVA) (ELISA). Los efectos
15 del tratamiento sobre el rendimiento motor se evaluaron usando rotarod (Fig. 15B). Este estudio muestra que la sinucleína α indujo la pérdida de los niveles de dopamina y de ácido homovanílico (HVA). La inhibición de las tirosina cinasas invirtió estos efectos y mejoró el rendimiento motor.

20 En otro estudio, se les inyectó a ratones transgénicos A53T que expresan sinucleína α humana en todo el cerebro (excluyendo la sustancia negra) nilotinib 10 mg/kg o bosutinib 5 mg/kg o DMSO una vez al día durante 3 semanas. Se compararon los efectos de la expresión de sinucleína α y la inhibición de las tirosina cinasas sobre los niveles de dopamina y de ácido homovanílico (HVA) (ELISA). Los efectos del tratamiento sobre el rendimiento motor se probaron utilizando rotarod. La sinucleína α no indujo la pérdida de dopamina y de HVA (debido a la ausencia de expresión de
25 sinucleína α en las neuronas productoras de dopamina en estos ratones. La inhibición de las tirosina cinasas aumentó la dopamina y el HVA. El rendimiento del motor también aumentó.

Además, se realizaron estudios para demostrar que $A\beta_{1-42}$ y $A\beta_{1-40}$ se acumulan en las AV-10 en animales Tg-APP, pero el tratamiento farmacológico potencia la eliminación autofágica mediante el depósito de $A\beta_{1-42}$ o $A\beta_{1-40}$,
30 respectivamente, en las AV-20 y los lisosomas (véanse las Figuras 16 y 17, respectivamente). Estudios adicionales muestran que p-Tau y la parkina también se acumulan en las AV-10 en animales Tg-APP, pero el tratamiento farmacológico potencia la eliminación autofágica mediante el depósito de p-Tau o parkina en las AV-20 y los lisosomas (véanse las Figuras 18 y 19, respectivamente).

35 En otro estudio, se demostró que $A\beta_{1-42}$ y p-Tau en la serina 396 se acumulan en los cerebros de ratones a los que se les inyectó $A\beta_{1-42}$ lentivírica, pero el tratamiento farmacológico potencia la eliminación autofágica mediante el depósito de $A\beta_{1-42}$ o p-Tau en las AV-20 y los lisosomas (véanse las Figuras 20 y 21, respectivamente). También se demuestra que p-Tau y la sinucleína α se acumulan en los cerebros de ratones a los que se les inyectó sinucleína α lentivírica, pero el tratamiento farmacológico potencia la eliminación autofágica mediante el depósito de p-Tau o sinucleína α en
40 las AV-20 y los lisosomas (véanse las Figuras 22 y 23, respectivamente). Además, se demuestra que la sinucleína α y la p-Tau se acumulan en las AV-10 de los cerebros de los A53T, pero el tratamiento farmacológico potencia la eliminación autofágica mediante el depósito de p-Tau o sinucleína α en las AV-20 y los lisosomas (véanse las Figuras 24 y 25, respectivamente). La parkina también se acumula en los cerebros de ratones A53T, pero, como se muestra en la Figura 26, el tratamiento farmacológico potencia la eliminación autofágica mediante el depósito de parkina en las
45 AV-20 y los lisosomas. Como se muestra en la Figura 27, la inhibición de las tirosina cinasas aumenta la actividad de la parkina y facilita la eliminación autofágica de p-Tau. Este proceso precisa la estabilización de Tau de los microtúbulos intactos. La activación de las tirosina cinasas, la acumulación de p-Tau y la autofagia alterada tienen un papel reconocido en la neurodegeneración. Se produce una disminución de la solubilidad de la parkina y su acumulación con $A\beta$ intracelular y p-Tau en vacuolas autofágicas en cerebros con EA, al tiempo que la parkina exógena
50 facilita la eliminación autofágica en modelos animales.

En otro estudio, se les inyectó a ratones de tipo silvestre o -/- para parkina Taut $A\beta_{1-42}$ lentivírica durante 3 semanas y se trataron i.p. con nilotinib 10 mg/kg o DMSO una vez al día durante 3 semanas (adicionales) consecutivas. Los tejidos cerebrales se fraccionaron para aislar las AV y se realizó ELISA específico para ser humano para determinar
55 el contenido de $A\beta_{1-42}$. $A\beta_{1-42}$ se acumula en las AV-10 en cerebros a los que se les inyectó lentivirus, pero el tratamiento farmacológico potencia la eliminación autofágica mediante el depósito de $A\beta_{1-42}$ en las AV-20 y el lisosoma. También se observó que la eliminación autofágica es dependiente de parkina. Además, este estudio muestra que la expresión de Tau conduce a la acumulación de $A\beta_{1-42}$ en las AV10 y las AV20, pero no en los lisosomas, lo que indica una fusión disminuida entre autofagosomas y lisosomas.

60 En otro estudio, se les inyectó a ratones de tipo silvestre o -/- para Tau $A\beta_{1-42}$ lentivírica durante 3 semanas y se trataron i.p. con Nilotinib 10 mg/kg o Bosutinib 5 mg/kg o DMSO una vez al día durante 3 semanas (adicionales) consecutivas. Los tejidos cerebrales se fraccionaron para aislar las AV y se realizó ELISA específico para ser humano para determinar el contenido en proteínas. Los resultados muestran que $A\beta_{1-42}$ se acumula en las AV-10 en cerebros
65 a los que se les inyectó lentivirus, pero el tratamiento farmacológico potencia la eliminación autofágica mediante el

depósito de $A\beta_{1-42}$ en las AV-20 y los lisosomas. La eliminación autofágica es menos efectiva en animales nulos para Tau con acumulación de $A\beta_{1-42}$ en las AV-10 y las AV-20.

5 En otro estudio, se les inyectó a ratones de tipo silvestre o $-/-$ para parkina Taut $A\beta_{1-42}$ humana lentivírica durante 3 semanas, y se trataron i.p. con Nilotinib 10 mg/kg o 30 μ l de DMSO una vez al día durante 3 semanas (adicionales) consecutivas. Los tejidos cerebrales se fraccionaron para aislar las AV y se realizó un ELISA específico para ratón para determinar el contenido de proteínas. Los resultados muestran que P-Tau en la serina 396 se acumula en las AV-10 en cerebros a los que se les inyectó lentivirus, pero el tratamiento farmacológico potencia la eliminación autofágica mediante el depósito de p-Tau en las AV-20 y los lisosomas, donde se degrada.

10 En otro estudio, se les inyectó a ratones de tipo silvestre o $-/-$ para parkina Tau \pm $A\beta_{1-42}$ lentivíricas durante 3 semanas y se trataron i.p. con Nilotinib 10 mg/kg o Bosutinib 5 mg/kg o DMSO una vez al día durante 3 semanas (adicionales) consecutivas. Los tejidos cerebrales se fraccionaron para aislar las AV y se realizó ELISA específico para ser humano para determinar el contenido en proteínas. Los resultados mostraron que P-Tau en la serina 396 se acumula en las
15 AV-10 en cerebros a los que se les inyectó lentivirus, pero el tratamiento farmacológico potencia la eliminación autofágica mediante el depósito de p-Tau en las AV-20 y los lisosomas, donde se degrada.

La Figura 28 muestra A) c-Abl fosforilada en la tirosina 412 (T412) y B) la expresión endógena de parkina combinadas en C) el hipocampo de ratones C57BL/6 de 6 meses de edad tratados i.p. con DMSO diariamente durante 3 semanas.
20 La Figura 28 también muestra D) la disminución de c-Abl fosforilada en la tirosina 412 (T412) y E) el aumento de la expresión endógena de parkina combinadas en F) el hipocampo de ratones C57BL/6 de 6 meses de edad tratados i.p. con Bosutinib 5 mg/kg diariamente durante 3 semanas.

La Figura 29 muestra la expresión de A) parkina y B) $A\beta$ combinadas en C) la corteza de ratones Tg-APP de 6 meses de edad tratados con DMSO o Bosutinib 5 mg/kg (D-F) una vez al día durante 3 semanas. Usando una combinación distinta de anticuerpos (véase la Figura G-I, que muestra la expresión de parkina (G) y $A\beta$ (H) en el hipocampo de ratones Tg-APP tratados con DMSO. J-H muestran el aumento del nivel de parkina en animales tratados durante 3
25 semanas una vez al día con Bosutinib (J) junto con niveles de placa disminuidos (K y L) en el hipocampo.

30 La Figura 30 muestra $A\beta$ de placas teñida con anticuerpo 6E10 y contrateñida con DAB en el cerebro de animales Tg-APP tratados i.p. con DMSO una vez al día durante 3 semanas.

La Figura 31 muestra $A\beta$ de placas teñida con anticuerpo 6E10 y contrateñida con DAB en el cerebro de animales Tg-APP tratados i.p. con Bosutinib 5 mg/kg una vez al día durante 3 semanas. Se observó una disminución en la formación
35 de placas en los animales tratados con Bosutinib en comparación con los animales tratados con DMSO.

La Figura 32 muestra que Bosutinib reduce los niveles de sinucleína α en ratones transgénicos que expresan A53T en todo el cerebro. Las Figuras 40A-D muestran la expresión de sinucleína α humana en sustancia negra a la que se le inyectó LacZ lentivírica (durante 3 semanas) con A) DMSO y B) Bosutinib 5 mg/kg una vez al día durante 3 semanas.
40 C y D muestran la expresión de sinucleína α humana en sustancia negra a la que se inyectó sinucleína α lentivírica (durante 3 semanas) con C) DMSO y D) o Bosutinib una vez al día durante 3 semanas. Las Figuras 40E-H muestran la expresión de tirosina hidroxilasa (TH) en sustancia negra a la que se le inyectó LacZ lentivírica (durante 3 semanas) con E) DMSO y F) Bosutinib 5 mg/kg una vez al día durante 3 semanas. G y H muestran la expresión de TH en sustancia negra a la que se le inyectó sinucleína α lentivírica (durante 3 semanas) con G) DMSO y H) o Bosutinib una
45 vez al día durante 3 semanas. La sinucleína disminuye las neuronas con TH y el Bosutinib rescata estas células. Las Figuras 40I-J muestran la expresión de sinucleína α humana en ratones A53T en I) la corteza, J) el cuerpo estriado, G) el tronco encefálico y L) el hipocampo, tratados con DMSO durante 3 semanas. Las Figuras 40M-P muestran la expresión de sinucleína α humana en ratones A53T en M) la corteza, N) el cuerpo estriado, O) el tronco encefálico y P) el hipocampo, tratados con Bosutinib 5 mg/kg durante 3 semanas.

50 También se realizaron pruebas de rendimiento. Como se muestra en las Figuras 33A y B, el tratamiento i.p. con Bosutinib 5 mg/kg diariamente durante 3 semanas mejoró el comportamiento cognitivo en ratones a los que se les inyectó bilateralmente $A\beta_{1-42}$ lentivírica durante 3 semanas antes del tratamiento farmacológico. Los ratones tratados con Bosutinib encontraron la plataforma (A) pero los ratones tratados con DMSO emplearon más tiempo en el área
55 NO, donde se colocaron inicialmente o en la zona NE o SO, sin encontrar de forma efectiva el área de la plataforma. Bosutinib mejoró el rendimiento cognitivo de una manera dependiente de parkina ya que los ratones $-/-$ para parkina no parecían aprender mucho. La Figura 41B muestra que los ratones tratados con Bosutinib recorrieron menos distancia con menos velocidad pero entraron más en el área de la plataforma que los ratones tratados con DMSO.

60 Los estudios también mostraron que la actividad de la parkina aumentó en células de neuroblastoma M17 humanas después del tratamiento con Nilotinib o Bosutinib (Fig. 34A). El tratamiento con Nilotinib también dio como resultado niveles aumentados de parkina en los lisados cerebrales de ratones de tipo silvestre a los que se les inyectó sinucleína α lentivírica antes del tratamiento (Fig. 34B).

65 El análisis de transferencia de Western de los lisados cerebrales de ratones de tipo silvestre tratados con Bosutinib

- reveló que Bosutinib refuerza la autofagia y degrada las proteínas ubiquitinadas. El análisis de transferencia de Western de lisados cerebrales de ratones Tg-APP tratados con Bosutinib 5 mg/kg durante 3 semanas adicionales mostró niveles reducidos de c-Abl, aumento de parkina y alteración de distintos marcadores moleculares de autofagia, lo que indica que A β altera la autofagia normal y Bosutinib refuerza la autofagia para eliminar A β ₁₋₄₂ (Figura 35).
- 5 El análisis de transferencia de Western de lisados cerebrales de ratones Tg-APP tratados con Bosutinib mostró alteraciones en los niveles de marcadores moleculares de autofagia (Fig. 36). El análisis de transferencia de Western de lisados cerebrales de ratones Tg-APP tratados con Bosutinib también mostró niveles disminuidos de fragmentos carboxiterminales (los CTF) y de fosfortirosina (Fig. 37).
- 10 El análisis de transferencia de Western de lisados cerebrales de ratones Tg-APP tratados con Bosutinib 5 mg/kg una vez al día durante semanas adicionales mostró niveles reducidos de distintos isótopos de Tau (Fig. 38). El análisis de transferencia de Western de lisados cerebrales de ratones de tipo silvestre que expresaban A β ₁₋₄₂ lentivírica (3 semanas) con y sin tratamiento con Bosutinib (5 mg/kg) durante 3 semanas adicionales, mostró una disminución de c-Abl y niveles aumentados de parkina con el tratamiento con Bosutinib, lo que indica que A β ₁₋₄₂ activa a c-Abl y
- 15 Bosutinib activa a la parkina.
- El análisis de transferencia de Western de lisados cerebrales de ratones de tipo silvestre que expresaban A β ₁₋₄₂ lentivírica (3 semanas) con y sin tratamiento con Bosutinib (5 mg/kg) durante 3 semanas adicionales mostraron niveles de distintos marcadores moleculares de autofagia, lo que indica que A β ₁₋₄₂ altera la autofagia normal y Bosutinib
- 20 refuerza la autofagia para eliminar A β ₁₋₄₂ (Figura 39). El análisis de transferencia de Western de lisados cerebrales de ratones de tipo silvestre que expresaban A β ₁₋₄₂ lentivírica (3 semanas) con y sin tratamiento con Bosutinib durante 3 semanas adicionales, mostró niveles disminuidos de ubiquitina (transferencia de la parte superior) y pan fosfo-tirosina (segunda transferencia) y SIAH2, lo que indica que Bosutinib es un amplio inhibidor de las tirosina cinasas (Fig. 40).
- 25 El análisis de transferencia de Western de lisados cerebrales de ratones de tipo silvestre que expresaban A β ₁₋₄₂ lentivírica (3 semanas) con y sin tratamiento con Bosutinib durante 3 semanas adicionales mostraron niveles disminuidos de distintos isótopos de Tau (Fig. 41). También se realizó un análisis de transferencia de Western de lisados cerebrales de ratones de tipo silvestre que expresaban sinucleína α lentivírica (3 semanas) con y sin
- 30 tratamiento con Bosutinib durante 3 semanas adicionales. Estas transferencias muestran un aumento de sinucleína α en animales a los que se les inyectó sinucleína lentivírica, junto con niveles disminuidos de c-Abl y fosforilación, niveles aumentados de parkina y marcadores de autofagia, incluyendo P62, HDAC6, LC3 y ATG12 en comparación con los controles de carga de tubulina y MAP2 (Fig. 42).

Ejemplo 2: Inactivación de parkina en la enfermedad de Parkinson

- 35 Para determinar el papel de la parkina y su asociación con la autofagia basal en la EP esporádica, se analizaron tejidos nigroestriatales humanos cadavéricos mediante fraccionamiento para determinar la solubilidad de las proteínas y se investigaron los efectos de la parkina sobre la eliminación autofágica en modelos animales de transferencia génica lentivírica. Se investigó si la expresión lentivírica de la sinucleína α afecta la autofagia y si la actividad de la parkina
- 40 invierte los efectos de la sinucleína α . Se estudiaron modelos animales que expresan sinucleína α lentivírica y se descubrió que la expresión de parkina disminuye los niveles de sinucleína α en ausencia de ubiquitinación. Se estudió si la expresión de parkina regula la eliminación de sinucleína α mediante degradación autofágica.

- Tejidos cerebrales humanos cadavéricos.* Se obtuvieron regiones del cerebro medio y del caudado cadavéricas de 22
- 45 pacientes con EP y 15 sujetos de control de la misma edad del banco de cerebros de la John's Hopkins University. La edad, el sexo, el estadio de la enfermedad y la disección cadavérica (DC) se resumen para cada paciente en las Tablas 1 y 2. Se desconoce la causa de la muerte. Para extraer la fracción soluble de las proteínas, se homogeneizaron 0,5 g de tejidos cerebrales congelados en tampón STEN 1x (Tris 50 mM (pH 7,6), NaCl 150 mM, EDTA 2 mM, NP-40 al 0,2 %, BSA al 0,2 %, PMSF 20 mM y cóctel inhibidor de proteasas y fosfatasa), se centrifugó a 10.000 g durante
- 50 20 min a 4 °C y se recolectaron los sobrenadantes. A continuación, todas las muestras se analizaron mediante ELISA (véase a continuación) o transferencia de Western utilizando 30 μ g de proteína. Para extraer la fracción insoluble, el sedimento se resuspendió en solución de urea 4 M y se centrifugó a 10.000 g durante 15 min, y se recolectó el sobrenadante y se analizaron 30 μ g de proteína mediante transferencia de Western. Las transferencias de Western se cuantificaron por densitometría usando el programa informático Quantity One 4.6.3 (Bio-Rad, Hercules, CA). La
- 55 densitometría se obtuvo como números arbitrarios que miden la intensidad de la banda. Los datos se analizaron como media \pm desviación típica, usando la prueba de la t bilateral ($P < 0,02$) y ANOVA, Neumann Keuls con comparaciones múltiples ($P < 0,05$), para comparar los grupos de EP y de control.

- Se realizó *inmunohistoquímica* sobre portaobjetos de pacientes humanos en cortes cerebrales incluidos en parafina
- 60 de 30 μ m de espesor, desparafinados en xilenos 2x5 minutos y concentración secuencial de etanol, bloqueados durante 1 hora en suero de caballo al 10 % e incubados durante una noche con anticuerpos primarios a 4 °C. Después de 3 lavados de 10 minutos en PBS 1 x, las muestras se incubaron con los anticuerpos secundarios durante 1 h a TA, se lavaron 3x10 minutos en PBS 1x. Se inmunoeploró la parkina con anticuerpo anti-parkina de ratón (PRK8) (1:200) que reconoce los a.a. 399-465 (Laboratorios Signet, Dedham, MA) o anticuerpo policlonal de conejo (1:200) antiparkina
- 65 (AB5112) que reconoce los a.a. 305-323 (Millipore) y se contratiñó con DAPI. Se exploró Map 2 con anticuerpo

monoclonal de ratón (1:300) (Pierce). La proteína ácida fibrilar glial (GFAP) se exploró con AcM de ratón (GA5) n.º 3670 (Cell Signaling) (1:200) o anticuerpo policlonal de conejo (ab4674) (Abeam) (1:200). La tirosina hidroxilasa (TH) se exploró con anticuerpo policlonal de conejo (AB152) (Millipore) (1:100) y se contratiñó con DAB.

- 5 *Inyección estereotáctica.* Se usaron construcciones lentivíricas para generar los modelos animales como se explica en Burns *et al.* (Hum. Mol. Genetics 18: 3206-3216 (2009); Khandelwal *et al.* (Mol. Neurodegener. 5: 47 (2010) y Herman and Moussa (Autophagy 7:919-921 (2011)). Se realizó cirugía estereotáctica para inyectar las construcciones lentivíricas en el cuerpo estriado de ratas macho Sprague-Dawley de 2 meses de edad. Se utilizaron N=8 animales en cada tratamiento. En estos estudios se utilizaron un total de 116 animales. Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité de Uso y Cuidado de Animales de la Universidad de Georgetown (GUACUC).

- Análisis de transferencia de Western.* Para extraer la fracción de proteínas solubles, los tejidos cerebrales se homogeneizaron en tampón STEN 1x, se centrifugó a 10.000 x g durante 20 min a 4 °C y se recolectaron los sobrenadantes que contenían la fracción soluble de proteínas. Para extraer la fracción insoluble, el sedimento se resuspendió en urea 4 M o ácido fórmico al 30 % y se ajustó a pH 7 con NaOH IN y se centrifugó a 10.000 x g durante 20 min a 4 °C, y se recolectó el sobrenadante que contenía la fracción insoluble y se analizó por transferencia de Western. La parkina total se inmunoexploró con anticuerpo PRK8 (1:1000) como se indica (Burns *et al.*, 2009) y la fosfo-parkina se exploró con anticuerpos anti-Ser 378 (Pierce) (1:1000). La sinucleína α se exploró con anticuerpo monoclonal de conejo (1:1000) (Santa Cruz). Se usaron anticuerpos de autofagia, incluyendo beclina 1 (1:1000), gen de tipo autofagia (Atg)-7 (1:1000), Atg12 (1:1000) y LC3-B (1:1000), para explorar de acuerdo con el kit de muestreo de anticuerpos de autofagia 4445 (Cell Signaling, Inc). La histona desacetilasa 6 (HDAC6) se exploró usando anti-HDAC6 policlonal de conejo (Abeam) (1:500). Se utilizó un policlonal de conejo anti-SQSTM1/p62 (Cell Signaling Technology) (1:500). Se utilizaron policlonal anti-LC3 de conejo (Pierce) (1:1000) y policlonal anti-actina de conejo (Thermo Scientific) (1:1000). LAMP-3 se exploró con anticuerpo policlonal de conejo (Aviva Systems) (1:500). Se utilizó anticuerpo anti-ubiquitina de conejo (Santa Cruz Biotechnology) (1:1000). La proteína mitocondrial COX-IV se exploró con anticuerpo policlonal de conejo (ab16056) (Abeam) (1:1000) y la poli ADP-ribosa polimerasa humana (PARP-1) se exploró con anticuerpo monoclonal (MA3-950) (Pierce) (1:1500).

- Inmunohistoquímica* - Estos métodos se realizaron en cortes de cuerpo estriado de cerebro de rata fijados con paraformaldehído (PFA) al 4 % de 20 micras de grosor y se compararon entre tratamientos. La parkina se exploró con anticuerpo policlonal de conejo (Chemicon) (1:200). Se usó el policlonal de conejo LC3-B (1:100) para explorar LC3-B (Cell Signaling, Inc). La tinción con tioflavina-S y DAPI nuclear se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Sigma). *Métodos estereológicos*- los aplicó un investigador que no estaba familiarizado con el estudio mediante un análisis estereológico no sesgado (Stereologer, Systems Planning and Analysis, Chester, MD) para determinar el recuento total de células positivas en 20 campos corticales en al menos 10 cortes cerebrales (~400 células positivas por animal) como se indica en (Burns *et al.*, 2009, Khandelwal *et al.*, 2010, Herman y Moussa, 2011). Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) de sinucleína α , parkina y p-Tau - Se realizaron ELISA específicos (Invitrogen) utilizando 50 μ l (1 μ g/ μ l) de lisados cerebrales detectados con 50 μ l de anticuerpo primario (3 h) y 100 μ l de anticuerpo secundario anti-conejo (30 min) a temperatura ambiente. Se midieron los niveles de parkina mediante ELISA específico para ser humano (MYBioSource) y los niveles de p-Tau y de α -sinucleína mediante ELISA específico para ser humano (Invitrogen) de acuerdo con los protocolos de los fabricantes.

- Fraccionamiento subcelular para aislar vacuolas autofágicas*- Se homogeneizaron 0,5 g de cerebros humanos o animales congelados a baja velocidad (homogeneizador Cole-Palmer, LabGen 7, 115 Vac) en tampón STEN 1 x y se centrifugó a 1000 g durante 10 minutos para aislar el sobrenadante del sedimento. El sedimento se resuspendió en tampón STEN 1 x y se centrifugó una vez para aumentar la recuperación de lisosomas. A continuación, los sobrenadantes agrupados se centrifugaron a 100.000 rpm durante 1 hora a 4 °C para extraer el sedimento que contenía vacuolas autofágicas (las AV) y lisosomas. A continuación, el sedimento resuspendió en 10 ml (0,33 g/ml) de Metrizamida al 50 % y 10 ml en tubos de nitrato de celulosa. Se construyó un gradiente discontinuo de Metrizamida en capas de abajo hacia arriba de la siguiente manera: 6 ml de suspensión de sedimento, 10 ml al 26 %; 5 ml al 24 %; 5 ml al 20 % y 5 ml al 10 % de Metrizamida (Marzella *et al.*, 1982). Después de centrifugar a 10.000 rpm durante 1 hora a 4 °C, la fracción que flotaba en la capa de Metrizamida al 10 % (lisosoma) y las fracciones que formaban bandas en las interfases al 24 %/20 % (AV 20) y al 20 %/10 % (AV10) se recolectaron con una jeringuilla y se examinaron.

- 55 *Microscopía electrónica de transmisión*-El tejido cerebral se fijó (1:4, v:v) en solución de paraformaldehído-ácido pícrico al 4 % y glutaraldehído al 25 % durante una noche, y luego se lavó 3x en tampón de cacodilato 0,1 M y se impregnó con osmio en tetróxido de osmio al 1 %/ferrocianuro de potasio al 1,5 % durante 3 h, seguido de otro lavado 3x en agua destilada. Las muestras se trataron con acetato de uranilo al 1 % en tampón de maleato durante 1 h, se lavaron 3 x en tampón de maleato (pH 5,2), luego se expusieron a una serie graduada de etanol frío hasta el 100 % y se finalizó con un tratamiento con óxido de propileno. Las muestras se incluyen en plástico puro y se incuban a 60 °C durante 1 o 2 días. Los bloques se cortan en un micrótopo Leica ultracut a 95 nm, se recogen en rejillas de cobre recubiertas de formvar de 100 nm, y se analizan utilizando un ME de transmisión Philips Technai Spirit. Un investigador que no estaba familiarizado con el estudio adquirió y analizó todos los cortes.

Resultados

Solubilidad disminuida de la parkina en el cuerpo estriado cadavérico de pacientes con EP esporádica. Para determinar el papel de la parkina en el cerebro de los pacientes con EP esporádica, se analizaron tejidos estriales (caudados) humanos cadavéricos de 12 pacientes con EP y 7 controles de la misma edad, como se describe en la 5 Tabla 1. La medición por ELISA de la parkina humana soluble reveló una disminución significativa ($P < 0,05$) (36 %) de los niveles de parkina en el caudado/cuerpo estriado de EP en comparación con el control (Fig. 43A). El análisis de transferencia de Western de los extractos de cuerpo estriado solubles confirmó la disminución de los niveles de parkina en los pacientes con EP en comparación con el control (Fig. 43B y C, 54 %). No se detectaron diferencias en los niveles de parkina en la corteza de EP. La exploración con anticuerpo anti-ubiquitina mostró una mancha mayor de 10 proteínas ubiquitinadas en el cuerpo estriado de EP en comparación con el control (Fig. 43B). Sin embargo, todas las muestras con DC superior a 16 h mostraron significativamente ($P < 0,02$, prueba de la t bilateral) mayores niveles de ubiquitina (48 %) en ambos grupos y mayores niveles de parkina (25 %) con DC superior a 13 h en el grupo de EP. Para investigar más a fondo si la disminución de la degradación de las proteínas da como resultado una alteración de la solubilidad, las proteínas insolubles se extrajeron en urea 4 M. Se detectó un aumento del nivel de parkina en la 15 fracción insoluble (Fig. 43D y E, 82 %) en contraste con el extracto soluble, que apenas se detectó. En el extracto insoluble se observó la fosforilación de la parkina en la serina 378, lo que no se detectó en la fracción soluble (Fig. 43D y E, 114 %). Adicionalmente, también se detectaron más proteínas ubiquitinadas (Fig. 43D, 3ª transferencia) en la fracción insoluble. Las variaciones entre las muestras se representan para mostrar la variación entre muestras individuales, que incluyen parkina soluble, insoluble y fosfo-parkina (Fig. 43F). En conjunto, estos datos muestran una 20 solubilidad disminuida de la parkina y una fosforilación aumentada en la EP.

Expresión de parkina alterada y pérdida de neuronas de tirosina hidroxilasa en el cuerpo estriado de pacientes con EP esporádica. Para determinar si la expresión de parkina está alterada en la EP esporádica, se examinaron 25 cortes cerebrales del mesencéfalo humano cadavérico de 10 pacientes con EP y de 8 sujetos de control, como se identifica en la Tabla 2. Para determinar la diferencia en la tinción de parkina entre los cerebros con EP y de control, los cortes cerebrales en serie recolectados de cada caso se exploraron con anticuerpo antiparkina humana (PRK8) que reconoce los a.a. 399-495 y se contratiñó con GFAP o DAPI. Se usó microscopía confocal y se observó tinción citosólica de parkina difusa en el caudado (Fig. 44A) y dentro de astrocitos teñidos con GFAP de cortes cerebrales de control (Fig. 44B), y también se observó tinción de TH (Fig. 54C) en el caudado de un sujeto de control (caso 1683). 30 Sin embargo, se observó una intensa tinción citosólica en el caudado (Fig. 44D, flecha) y dentro de los astrocitos (Fig. 44E), con una tinción disminuida de TH (Fig. 44F) en un paciente con EP/EA (caso 2215). Para determinar que la tinción de parkina o GFAP no se debía a la autofluorescencia en portaobjetos humanos, los portaobjetos se incubaron con y sin anticuerpos primarios o secundarios y se determinó la ausencia de unión no específica de los anticuerpos mediante microscopía confocal. La expresión de parkina se examinó adicionalmente en las regiones cerebrales del 35 mesencéfalo/SN. Se observó tinción citosólica difusa de parkina (Fig. 44G) y dentro de astrocitos teñidos con GFAP (Fig. 44H) con tinción de TH (Fig. 44I) en cortes en serie del mesencéfalo/SN del cerebro de control (caso 1855). Se observó una intensa tinción citosólica de parkina (Fig. 54J, flecha) y dentro de los astrocitos (Fig. 44K), con tinción de TH significativamente disminuida (Fig. 44L) en un paciente con EP (caso 2315). Se utilizó otra combinación de anticuerpos que usa el clon AB5112 que detecta parkina en los a.a. 305-323 y anticuerpos para GFAP para verificar 40 otros resultados. Se observó una intensa tinción citosólica de parkina (Fig. 44M, flecha) y dentro de los astrocitos (Fig. 44N), con tinción de TH significativamente disminuida (Fig. 44O) en un paciente con EP/demencia (caso 2243). Se usó MAP-2 como marcador neuronal y se cotiñó para parkina (contratinción de DAPI) y TH. La tinción para parkina (Fig. 45A) fue difusa dentro del citosol y se localizó en gran medida en neuronas marcadas con MAP-2 (Fig. 45B y C) en el mesencéfalo/SN de un sujeto de control (caso 1277). La tinción de TH también se detectó en cortes cerebrales 45 en serie (Fig. 45D). Sin embargo, se detectó una tinción de parkina más intensa y menos difusa en el citosol de las células teñidas con DAPI (Fig. 45E) y la tinción de parkina se localizó en las neuronas teñidas con MAP-2 (Fig. 45F y G), con tinción de TH significativamente disminuida (Fig. 45H) en el mesencéfalo/SN de un paciente con EP/demencia (caso 2267).

50 **Alteración de la autofagia basal en el cuerpo estriado cadavérico de pacientes con EP.** Para determinar si el cambio en la solubilidad de la parkina está asociado con cambios en la autofagia basal, se examinó el nivel de algunos marcadores autofágicos en extractos de cuerpo estriado humanos en EP. Se examinaron los marcadores de la cascada autofágica, incluyendo la proteína de cadena ligera asociada a microtúbulos 3 (LC3). La exploración con anticuerpo anti-LC3 sugirió un aumento de los niveles de LC3-II en comparación con LC3-I (Fig. 45I y J, 1ª 55 transferencia, 78 %, EP N=12 y 7 de control), indicando una posible conversión y lipidación de LC3. LC3-I es abundante y estable en el cerebro, la relación de LC3-II con respecto a LC3-I o la cantidad de LC3-II se puede usar para controlar la cantidad de autofagosoma. LC3 se expresa como tres isoformas en células de mamíferos, LC3-A, LC3-B y LC3-C. Debido a que la propia LC3-II se degrada por autofagia, la cantidad de LC3 se midió usando un anticuerpo específico para la isoforma LC3-B. Se detectó un aumento del nivel de LC3-B en extractos de cuerpo estriado humanos de 60 pacientes con EP (N=12) en comparación con los sujetos de control (N=7) (Fig. 45I y J, 2ª transferencia, 48 %, $P < 0,05$, ANOVA, Neumann Keuls). Se realizó un fraccionamiento subcelular para aislar vacuolas autofágicas y lisosomas y se midieron los niveles de sinucleína α , parkina y p-Tau mediante ELISA cuantitativo. En primer lugar, se determinó si el ensayo de fraccionamiento subcelular extrajo satisfactoriamente los autofagosomas de los lisosomas en tejidos humanos congelados. El análisis de transferencia de Western en lisados cerebrales de pacientes con EP mostró la 65 glicoproteína de membrana asociada a lisosomas 3 (LAMP-3) en la fracción flotante conteniendo lisosomas (Fig. 45K,

1ª transferencia), mientras que las fracciones de AV-10 y AV-20 contenían LC3-B (Fig. 45K, 2ª transferencia), lo que sugiere que los cerebros humanos congelados contienen vacuolas autofágicas y el fraccionamiento de los inventores aisló los autofagosomas a partir de los lisosomas. También se realizó una exploración para el marcador mitocondrial citocromo c oxidasa-IV (COX-IV, Fig. 45K, 3ª transferencia) y el marcador nuclear poli ADP-ribosa polimerasa (PARP-1, Fig. 45K, 4ª transferencia), y los marcadores se detectaron en todas las fracciones, lo que sugiere que las muestras cerebrales contenían orgánulos intactos. Se debe realizar un ensayo exhaustivo que muestre claramente las mitocondrias en autofagosomas o lisosomas con marcaje conjunto de IHQ con LC3-COX-IV (autofagosoma) o catepsina-D-COX-IV (lisosoma) acoplado con inmuno-ME para determinar la acumulación mitocondrial en vacuolas autofágicas separadas. Se usó un ELISA para medir los niveles de proteína en extractos subcelulares. El nivel de sinucleína α aumentó significativamente ($P < 0,05$, EP N=12 y 7 de control) en las AV-10 (31 %) y AV-20 (64 %) en comparación con el control (Fig. 45L, ANOVA, Neumann Keuls), pero no se detectó sinucleína α en la fracción lisosómica. De manera interesante, la medición por ELISA de los niveles de parkina también mostró un aumento significativo de las AV-10 (Fig. 45M, 24 %) y las AV-20 (Fig. 45M, 23 %) y un ligero aumento no significativo (9 %) en el lisosoma en la EP (N=12) en comparación con los sujetos de control (N=7). Los niveles de p-Tau se midieron como otro marcador proteico que ocasionalmente se asocia con la patología de la EP. De manera similar, no se detectó p-Tau en el lisosoma, pero los niveles de p-Tau aumentaron significativamente en las AV-10 (54 %) y las AV-20 (64 %) en comparación con el control (Fig. 45N, EP N=12 y 7 de control). Estos datos muestran la acumulación de proteínas no degradadas en los autofagosomas en la EP.

20 **La parkina atenúa la acumulación de proteínas inducida por la sinucleína α en el cuerpo estriado.** Debido a que se observó una insolubilidad aumentada de la parkina y niveles disminuidos de parkina soluble en asociación con la alteración de la autofagia en el cuerpo estriado de la EP, se buscó sobreexpresar la parkina y determinar si la parkina funcional puede invertir los efectos de la sinucleína α en la eliminación autofágica. Se utilizó un modelo animal de transferencia génica dirigido a la expresión de sinucleína α en el cuerpo estriado de ratas de 2 meses de edad. La parkina lentivírica condujo a aumentos significativos (Fig. 46A, 53% por densitometría, N=8, $P < 0,05$) de los niveles de parkina y la sinucleína α lentivírica condujo a aumentos significativos (41 %) de los niveles de sinucleína α . La coexpresión de parkina con sinucleína α atenuó los niveles de sinucleína α monomérica (Fig. 46A) y redujo el nivel de proteínas de mayor peso molecular de vuelta al control (LacZ) 4 semanas posinyección (Khandelwal *et al.*, 2010). No se observaron cambios en los niveles totales de parkina en los cerebros a los que se les inyectó sinucleína α lentivírica (Fig. 46A, 1ª transferencia) y se detectó parkina no fosforilada en cerebros de rata. Se realizaron estudios independientes para confirmar los cambios en los niveles de sinucleína α usando ELISA cuantitativo específico para sinucleína α humana. Los niveles de sinucleína α humana aumentaron significativamente (Fig. 46B, 54 %, N=8) en el cuerpo estriado de los animales a los que se les inyectó sinucleína α lentivírica en comparación con LacZ o parkina. La coinyección de sinucleína α lentivírica y parkina invirtió los niveles de sinucleína α humana de vuelta al control. El suministro lentivírico de parkina en el cuerpo estriado dio como resultado un aumento significativo de parkina cuando se expresó sola (Fig. 46C, 44 %, N=8) o en presencia de sinucleína α (53 %, N=8).

Se determinaron los cambios en p-Tau de rata usando ELISA. La expresión de sinucleína α humana conduce a un aumento significativo (Fig. 46D, 34 %, N=8) de p-Tau en el cuerpo estriado de rata, pero la coexpresión de parkina invierte p-Tau de nuevo al control. La expresión lentivírica de sinucleína α en el cuerpo estriado conduce a la detección de la tinción positiva de la tioflavina-S (Fig. 46F), en comparación con la parkina lentivírica sola (Fig. 46F). Sin embargo, la coexpresión de parkina con sinucleína α previene la aparición de la tinción positiva de tioflavina-S (Fig. 46G); lo que sugiere que la atenuación de la parkina de los niveles de sinucleína α puede eliminar las especies positivas para tioflavinaS en este modelo animal. Para comprobar que la tinción de tioflavina-S está asociada a la expresión de sinucleína α , se tiñeron cortes del cuerpo estriado con un anticuerpo para sinucleína α humana y no se observó tinción de sinucleína α en cortes en serie con los cortes de tioflavina-S de ratas a las que se les había inyectado parkina lentivírica (Fig. 46K), en comparación con un nivel abundante de sinucleína α en ratas a las que se les había inyectado sinucleína α lentivírica, concordante con la tinción de tioflavina-S (Fig. 46L), mientras que la coexpresión de parkina condujo a la desaparición de sinucleína α humana en el cuerpo estriado de rata (Fig. 46M).

50 **La parkina funcional de tipo silvestre, y no la mutante T240R, participa en la eliminación de vacuolas autofágicas inducida por sinucleína α .** Se buscó determinar si la expresión de sinucleína α puede cambiar la autofagia normal, conduciendo a la formación de vacuolas autofágicas *in vivo*. Las imágenes de ME de los cortes de cuerpo estriado no mostraron vacuolas en los animales a los que se les inyectó LacZ lentivírica (Fig. 47A) 4 semanas después de la inyección. La expresión lentivírica de sinucleína α condujo a la acumulación citosólica de vacuolas (Fig. 47B, asteriscos), lo que sugiere que la expresión de sinucleína α altera la autofagia en el cuerpo estriado de rata. La coexpresión de parkina con sinucleína α condujo a la formación de vacuolas autofágicas que contenían desechos (Fig. 47C). Para determinar si la función de parkina participa en la eliminación de las vacuolas autofágicas, se utilizó parkina T240R no funcional, que es una forma mutante que pierde su actividad de ubiquitina ligasa E3, conduciendo a ARJPD (del inglés *autosomal recessive young-onset PD*, EP autosómica recesiva de aparición temprana. La coexpresión de parkina T240R mutante con sinucleína α no impidió la acumulación de vacuolas citosólicas (Fig. 47D, asteriscos), lo que sugiere que la parkina participa en la eliminación autofágica a través de su función de ubiquitina ligasa E3.

Los niveles de sinucleína α humana y p-Tau se midieron usando ELISA cuantitativo en fracciones subcelulares. Se detectó un aumento significativo (62 %, $P < 0,05$, N=5) del nivel de sinucleína α en las AV-10 (Fig. 47E) y las AV-20

(19 %) en comparación con los animales a los que se les había inyectado LacZ. Sin embargo, la coexpresión de parkina eliminó la sinucleína α de las AV-10 y aumentó significativamente sus niveles en las AV-20 (45 %) y los lisosomas (24 %) en comparación con LacZ (Fig. 47E). La coexpresión de sinucleína α con T240R dio como resultado niveles significativamente elevados (51 %) de sinucleína α en las AV-10 y, a diferencia de la parkina de tipo silvestre, no mostró ningún depósito en las AV-20, que están enriquecidas en autofagosomas o lisosomas. Se detectaron niveles significativamente aumentados ($P < 0,05$, $N=5$) de p-Tau en AV-10 en animales a los que se les inyectó sinucleína α (34 %) o sinucleína α +T240R (39 %) en comparación con LacZ. Sin embargo, la expresión de parkina de tipo silvestre condujo a un aumento significativo de p-Tau en las AV-10 (19 %) y el lisosoma (21 %) en comparación con LacZ, sinucleína α y sinucleína α +T240R (Fig. 47F). En estos modelos animales no se detectó parkina medida por ELISA en fracciones subcelulares, lo que sugiere que la acumulación de parkina en las vesículas autofágicas puede tener lugar durante un período de tiempo prolongado en la EP.

La parkina funcional, y no la mutante T240R, regula la eliminación autofágica en el cuerpo estriado de animales que expresan sinucleína α . Para determinar los mecanismos por los cuales la parkina puede participar en la eliminación de vacuolas autofágicas en el cuerpo estriado de ratas, se examinaron marcadores moleculares de la ruta autofágica. El análisis de TW mostró diferencias en los niveles de beclina 1 en animales a los que se les inyectó LacZ, parkina o sinucleína α lentivíricas solo (Fig. 48A). Se observó un aumento significativo de los niveles de beclina 1 (54 % por densitometría, $N=8$, $P < 0,05$) cuando se coexpresó parkina con sinucleína α , lo que sugiere que la parkina responde al estrés inducido por sinucleína α . Los niveles de Atg7 y Atg12 también aumentaron significativamente en un 41 % y un 33 %, respectivamente, en animales a los que se les inyectó parkina+sinucleína α (Fig. 48A) en comparación con animales a los que se les inyectó LacZ, parkina o sinucleína α sola. No se observaron cambios en los niveles de LC3-B entre los animales a los que se les inyectó LacZ o parkina lentivíricas solas (Fig. 48B), pero la expresión de sinucleína α aumentó significativamente (51 %) los niveles de LC3 (Fig. 48B), lo que sugiere una cantidad aumentada de autofagosomas. La coexpresión de parkina y sinucleína α disminuyó los niveles de LC3-B (29 % por densitometría, $N=8$, $P < 0,05$), lo que sugiere la degradación de las vacuolas autofágicas que contienen LC3-B. Tampoco se observaron cambios en los niveles de HDAC6 (Fig. 48B) entre animales a los que se les inyectó LacZ, parkina o sinucleína α sola, pero el nivel de HDAC6 aumentó significativamente (37 %) (Fig. 48B) cuando a los animales se les coinyectó parkina y sinucleína α juntas, lo que sugiere que la expresión de parkina facilita la fusión entre los autofagosomas y los lisosomas. No se observaron diferencias en los niveles de marcadores moleculares de autofagia cuando se inyectó parkina mutante T240R sola o con sinucleína α . Estos datos muestran que la actividad de ubiquitina ligasa parkina E3 puede regular al alza los niveles de proteína de la cascada autofágica dependiente de beclina 1, facilitando la eliminación autofágica.

Los datos de ME y TW se complementaron con inmunohistoquímica para determinar la presencia de LC3-B. La tinción con anticuerpo anti-LC3-B no mostró reactividad en el cuerpo estriado de animales a los que se les inyectó parkina lentivírica (Fig. 48C). La expresión lentivírica de sinucleína α condujo a un aumento de la inmunoreactividad frente a LC3-B (Fig. 48D). El recuento estereológico de células positivas para LC3-B reveló un aumento significativo (Fig. 48G. 43 %, $P < 0,05$, $N=8$) en el cuerpo estriado al que se le inyectó sinucleína α . La coinyección de parkina lentivírica con sinucleína α (Fig. 48E) dio como resultado la desaparición de LC3-B del cuerpo estriado. Para comprobar más a fondo que la ubiquitina ligasa E3 parkina funcional participa en los cambios autofágicos, se coinyectaron anticuerpos para LC3-B con sinucleína α y parkina T240R mutante (Fig. 48F) en cortes del cuerpo estriado y no se observó eliminación de la tinción de LC3-B en estos animales. El recuento estereológico de células teñidas con LC3-B en el cuerpo estriado al que se le coinyectó sinucleína α y T240R mostró un aumento significativo (37 %) de la reactividad de LC3-B en comparación con LacZ (Fig. 48F y G). Para determinar con más detalle si la parkina de tipo silvestre conduce a la eliminación de proteínas ubiquitinadas a través de autofagia, los inventores tiñeron con el anticuerpo anti-P62. Los niveles de P62 aumentaron significativamente ($P < 0,05$, $N=8$) cuando se expresó sinucleína α (41 % por densitometría con respecto a la actina) en comparación con LacZ (Fig. 48F). Sin embargo, la coexpresión de parkina condujo a la desaparición completa de la tinción de P62, lo que sugiere la degradación autofágica de las proteínas ubiquitinadas.

Estos estudios muestran una solubilidad disminuida de la parkina en el cuerpo estriado de pacientes con EP esporádica, independientemente de las mutaciones que provocan la enfermedad de inicio temprano. En conclusión, la disminución de la solubilidad de la parkina puede reflejar una función disminuida de la parkina, lo que puede conducir a la alteración de la autofagia basal, incluyendo la eliminación de la parkina, la sinucleína α y la p-Tau. La expresión lentivírica de sinucleína α conduce a p-Tau y a la acumulación de vacuolas autofágicas. Estos datos demuestran una asociación entre la sinucleína α y la disfunción autofágica en la EP e indican un papel beneficioso de la parkina en la eliminación autofágica. Por tanto, el papel de la parkina en la eliminación autofágica puede explotarse como una estrategia terapéutica en la EP.

Tabla 1- Descripción y diagnóstico clínico de tejidos humanos de pacientes con EP y sujetos de control analizados por transferencia de Western y ELISA.

n.º	BRC	DDF	Edad	Sexo	Raza	DC	Área FR
399		Control	79	F	B	24	Caudado
417		Control	80	F	B	6	Caudado
487		Control	73	M	B	22	Caudado

(continuación)

n.º BRC	DDF	Edad	Sexo	Raza	DC	Área FR
515	Control	62	M	B	19	Caudado
705	Control	73	M	B	9	Caudado
1277	Control	80	F	B	8	Caudado
2052	Control	79	M	B	16	Caudado
1690	EP	76	M	B	18	Caudado
1731	EP	77	M	B	16	Caudado
2140	EP con demencia	84	F	B	11	Caudado
2067	EP con demencia, enfer. cerebrovasc. (NC)	76	M	B	19	Caudado
2019	EP con demencia, enferm. cerebrovasc.	83	M	B	16,5	Caudado
1989	EP con demencia, ECL neocortical	84	M	B	5	Caudado
2074	EP, enfermedad cerebrovascular	85	F	B	9	Caudado
1758	EP, DCL	81	M	B	11	Caudado
1948	EP, DCL	77	M	B	5	Caudado
1796	EP, Cuerpo de Lewy CHG Quiste porencefálico límbico	81	M	B	8,75	Caudado
1877	EP, Cuerpo de Lewy CHG neocortical	80	M	B	19	Caudado
1955	EP, Cuerpo de Lewy CHG neocortical	84	M	N	13	Caudado

Tabla 2- Descripción y diagnóstico clínico de pacientes humanos con EP y sujetos de control teñidos con inmunohistoquímica.

n.º BRC	DDF	CERAD	BRAAK	Edad	Sexo	Raza	DC	DF
1062	Control			58	M	N	14	Hipocampo CM
1252	Control			70	M	B		Hipocampo CM
1277	Control		0	80	F	B	8	Caudado, hipocampo, CM
1352	Control			78	F		14	Caudado, hipocampo, CM
1615	Control			72	M	B	20	Caudado
1683	Control		1	91	F	B	8	Caudado
1855	Control			77	M	B		Caudado, hipocampo, CM
2201	Control	0	2	85	F	B	27	Caudado, hipocampo, CM
2215	EP con demencia, probable EA	N	4	88	M	B	9	Caudado, CM
2235	EP, tauopatía no EA, enferm. cerebrovasc. (NC)			86	F	B	26	Caudado, CM
2243	EP con demencia	0	0	68	M	B	50	Caudado, CM
n.º BRC	DDF	CERAD	BRAAK	Edad	Sexo	Raza	DC	DF
2253	EP, contusión	0	1	64	F	B	15	Caudado, CM
2267	EP con demencia, neocorteza	0	1	75	M	B	22	Caudado, CM
2290	EP	A	2	82	M	B	53	Caudado, CM
2292	EP con demencia, probable EA	N	4	77	M	B	8	Caudado, CM
2312	EP	0	0	56	M	B	21	CM
2315	EP	0	2	84	M	B	8,5	Caudado, CM
2352	EP con demencia, enfer. cerebrovasc. (NC)	0	2	83	F	B	163	Caudado, CM

5

Ejemplo 3- Inactivación de la parkina en la enfermedad de Alzheimer

Se investigó el papel de la parkina en los tejidos cerebrales cadavéricos de 21 pacientes con enfermedad de Alzheimer y 15 sujetos de control. Para determinar el papel de la parkina en la eliminación de la A β , se generaron animales de

transferencia génica que expresaban A β ₁₋₄₂ lentivírica con y sin parkina y se examinaron los mecanismos autofágicos.

Materiales y métodos

- 5 *Tejidos cerebrales humanos cadavéricos.* Se obtuvieron regiones del hipocampo y corticales cadavéricas de 21 pacientes con EA y 15 sujetos de control de la misma edad del banco de cerebros de la John's Hopkins University. La edad, el sexo, el estadio de la enfermedad y la disección cadavérica (DC) se resumen para cada paciente en las Tablas 3 y 4. Se desconoce la causa de la muerte. Para extraer la fracción soluble de las proteínas, se homogeneizaron 0,5 g de tejidos cerebrales congelados en tampón STEN 1x (Tris 50 mM (pH 7,6), NaCl 150 mM, EDTA 2 mM, NP-40
- 10 al 0,2 %, BSA al 0,2 %, PMSF 20 mM y cóctel inhibidor de proteasas), se centrifugó a 10.000 g durante 20 min a 40C, y se recolectaron los sobrenadantes. A continuación, todas las muestras se analizaron mediante ELISA (véase a continuación) o transferencia de Western utilizando 30 μ g de proteína. Para extraer la fracción insoluble, el sedimento se resuspendió en solución de urea 4 M y se centrifugó a 10.000 g durante 15 min, y se recolectó el sobrenadante y se analizaron 30 μ g de proteína mediante transferencia de Western. Las transferencias de Western se cuantificaron
- 15 por densitometría usando el programa informático Quantity One 4.6.3 (Bio Rad). La densitometría se obtuvo como números arbitrarios que miden la intensidad de la banda. Los datos se analizaron como media \pm desviación típica, usando la prueba de la t bilateral (P<0,02) y ANOVA, Neumann Keuls con comparaciones múltiples (P<0,05), para comparar los grupos de EA y de control. La parkina insoluble colocaliza con A β intracelular.
- 20 Se realizó inmunohistoquímica sobre portaobjetos de pacientes humanos en cortes cerebrales incluidos en parafina de 30 μ m de espesor, desparafinados en xilenos 2x5 minutos y concentración secuencial de etanol, bloqueados durante 1 hora en suero de caballo al 10 % e incubados durante una noche con anticuerpos primarios a 4 °C. Después de 3 lavados x 10 minutos en PBS 1 x, las muestras se incubaron con los anticuerpos secundarios durante 1 h a TA se lavaron 3x10 minutos en PBS 1x. A β ₁₋₄₂ se exploró con anticuerpo policlonal específico anti-A β ₁₋₄₂ de conejo
- 25 (Zymed) (1:200) que reconoce los a.a. 1-42, y anticuerpo monoclonal de ratón (4G8) (1:200) que reconoce los a.a. 17-24 (Covance) y se contratiño con DAPI. Se inmunoexploró la parkina con anticuerpo anti-parkina de ratón (PRK8) (1:200) que reconoce los a.a. 399-465 (Laboratorios Signet, Dedham, MA) y anticuerpo policlonal de conejo (1:200) anti-parkina (AB5112) que reconoce los a.a. 305-622 (Millipore) y se contratiño con DAPI. Debido a que los tejidos humanos pueden presentar un alto nivel de autofluorescencia, se realizaron otros experimentos con la ausencia del
- 30 anticuerpo primario o del secundario para determinar la especificidad de la inmunotinción.

- Inyección estereotáctica.* Se usaron construcciones lentivíricas para generar los modelos animales como se explica en Rebeck *et al.* (J. Biol. Chem. 285, 7440-7446 (2010)) y la identidad de las especies de A β ₁₋₄₂ generadas se confirmó mediante espectroscopía de masas. Se realizó cirugía estereotáctica para inyectar las construcciones lentivíricas que
- 35 codificaban LacZ, parkina o A β ₁₋₄₂ en la corteza motora primaria M1 de ratas macho Sprague-Dawley de 2 meses de edad. Todos los animales se anestesiaron (50 mg/kg de peso corporal) con un cóctel de ketamina y xilacina (50:8). Las coordenadas estereotácticas estaban de acuerdo con el atlas de cerebro de rata de Paxinos y Watson. Los concentrados de lentivirus se inyectaron a través de un controlador de bomba de microjeringa (Micro4) utilizando un suministro total por bomba (World Precision Instruments, Inc.) de 6 μ l a una velocidad de 0,2 μ l/min. En un lado del
- 40 cerebro, a los animales se les inyectó 1) un vector de LacZ lentivírico a una multiplicidad de infección (m.i.) de 2x10¹⁰; 2) una m.i. de 1 x10¹⁰ de parkina lentivírica y una m.i. de 1 x10¹⁰ de LacZ lentivírica; 3) una m.i. de 1x10¹⁰ de A β _{1-parkina} insoluble lentivíricas que colocaliza con A β ₁₋₄₂ intracelular y una m.i. de 1x10¹⁰ de LacZ lentivírica; o 4) y una m.i. de 1x10¹⁰ de A β ₁₋₄₂ lentivírica y una m.i. de 1x10¹⁰ de parkina lentivírica. Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité de Uso y Cuidado de Animales de la Universidad de Georgetown (GUACUC). En estos
- 45 estudios se utilizaron un total de 84 ratas.

- Análisis de transferencia de Western.* Para extraer la fracción de proteínas solubles, los tejidos cerebrales se homogeneizaron en tampón STEN 1x (Tris 50 mM (pH 7,6), NaCl 150 mM, EDTA 2 mM, NP-40 al 0,2 %, BSA al 0,2 %, PMSF 20 mM y cóctel inhibidor de proteasas), se centrifugó a 10.000 x g durante 20 min a 40 °C y se recolectaron los
- 50 sobrenadantes que contenían la fracción soluble de proteínas. Para extraer la fracción insoluble, el sedimento se resuspendió en urea 4 M o ácido fórmico al 30 % y se ajustó a pH 7 con NaOH 1N y se centrifugó a 10.000 x g durante 20 min a 40C, y se recolectó el sobrenadante que contenía la fracción insoluble y se analizó por transferencia de Western. Los sobrenadantes se analizaron por TW en un gel SDS NuPAGE al 4-12 % Bis-Tris (Invitrogen, Inc.). La estimación de proteínas se realizó utilizando el ensayo de proteínas Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules,
- 55 CA). La parkina total se inmunoexploró con anticuerpo PRK8 (1:1000) como se indica [43] y la fosfo-parkina se exploró con anticuerpos anti-Ser 378 (Pierce) (1:1000). A β ₁₋₄₂ se inmunoexploró con anticuerpo 6E10 de ratón (Signet Labs, MA) (1:600), analizada junto con un péptido sintético (AnaSpec, CA, EE. UU.). Se usaron anticuerpos policlonales de conejo anti-beclina (1:1000), gen de tipo autofagia (Atg)-7 (1:1000), Atg12 (1:1000) y LC3-B (1:1000) para explorar las proteínas de autofagia utilizando el kit de muestreo de anticuerpos 4445 (Cell Signaling, Inc). La histona desacetilasa
- 60 6 (HDAC6) se exploró usando anti-HDAC6 policlonal de conejo (Abeam) (1:500). Se utilizó un policlonal de conejo anti-SQSTM1/p62 (Cell Signaling Technology) (1:500). La proteína de membrana asociada a lisosomas 3 (LAMP-3) se exploró con anticuerpo policlonal de conejo (ProteinTech) (1:500). Se utilizaron policlonal anti-LC3 de conejo (Pierce) (1:1000) y policlonal anti-actina de conejo (Thermo Scientific) (1:1000)). Se utilizaron policlonales de conejo para Ciclina E (Thermo Scientific) (1:1000), policlonales de conejo para tubulina (Thermo Scientific) (1:1000) y monoclonales de ratón para ubiquitina (Santa Cruz Biotechnology) (1:500). Map 2 se exploró con anticuerpo

monoclonal de ratón (1:1000) (Pierce).

Las transferencias de Western se cuantificaron por densitometría usando el programa informático Quantity One 4.6.3 (Bio Rad). La densitometría se obtuvo como números arbitrarios que miden la intensidad de la banda. Los datos se analizaron como media \pm desviación típica, usando ANOVA, con comparación múltiple de Neumann Keuls entre grupos de tratamiento. En cada tratamiento se utilizó un número total de N=8.

La inmunohistoquímica se realizó en cortes cerebrales corticales fijados con paraformaldehído (PFA) al 4 % de 20 micrómetros de grosor y se comparó entre tratamientos. A β ₁₋₄₂ se exploró con anticuerpo policlonal específico anti-A β ₁₋₄₂ de conejo (Zymed) (1:200). Se usó el policlonal de conejo LC3-B (1:100) para explorar LC3-B (Cell Signaling, Inc). La tinción con tioflavina-S y DAPI nuclear se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Sigma).

Los métodos estereológicos los aplicó un investigador que no estaba familiarizado con el estudio mediante un análisis estereológico no sesgado (Stereologer, Systems Planning and Analysis, Chester, MD), para determinar los recuentos de células positivas totales en 20 campos corticales en al menos 10 cortes cerebrales (~400 células positivas por animal) de cada animal. Estas áreas se seleccionaron en distintas regiones a ambos lados del punto de inyección, y todos los valores se promediaron para tener en cuenta el gradiente de tinción en un radio de 2,5 mm desde el punto de inyección. Se utilizó un método de muestreo de fraccionador óptico para estimar el número total de células positivas con un diseño de muestreo de niveles múltiples. Las células se contaron dentro del marco de muestreo determinado ópticamente por el fraccionador y las células que caían dentro del marco de conteo se contaron a medida que los núcleos aparecían mientras se enfocaba a través del eje z.

Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) de A β , parkina y p-Tau- Se realizaron ELISA específicos para p-Tau, A β ₁₋₄₀ y A β ₁₋₄₂ (Invitrogen) usando 50 μ l (1 μ g/ μ l) de lisados cerebrales detectados con 50 μ l de anticuerpo primario (3 h) para p-Tau humana (AT8) o A β y 100 μ l de anticuerpo (30 min) anti-parkina insoluble de conejo colocaliza con el de A β intracelular a TA. Los extractos se incubaron con cromógeno estabilizado durante 30 minutos a TA y la solución se detuvo y se leyó a 450 nm, de acuerdo con el protocolo del fabricante. Los niveles de parkina se midieron usando ELISA humano específico (MYBioSource) usando ELISA específico humano (Invitrogen). Todos los ELISA se realizaron de acuerdo con los protocolos de los fabricantes.

Fraccionamiento subcelular para aislar vacuolas autofágicas- Los cerebros de los animales se homogeneizaron a baja velocidad (homogeneizador Cole-Palmer, LabGen 7, 115 Vac) en tampón STEN 1 \times y se centrifugó a 1000 g durante 10 minutos para aislar el sobrenadante del sedimento. El sedimento se resuspendió en tampón STEN 1 \times y se centrifugó una vez para aumentar la recuperación de lisosomas. A continuación, los sobrenadantes agrupados se centrifugaron a 100.000 rpm durante 1 hora a 40 °C para extraer el sedimento que contenía las vacuolas autofágicas (las AV) y los lisosomas. A continuación, el sedimento resuspendido en 10 ml (0,33 g/ml) de Metrizamida al 50 % y 10 ml en tubos de nitrato de celulosa. Se construyó un gradiente discontinuo de Metrizamida en capas de abajo hacia arriba de la siguiente manera: 6 ml de suspensión de sedimento, 10 ml al 26 %; 5 ml al 24 %; 5 ml al 20 % y 5 ml al 10 % de Metrizamida. Después de centrifugar a 100.000 rpm durante 1 hora a 40C, la fracción que flotaba en la capa de Metrizamida al 10 % (lisosoma) y las fracciones que formaban bandas en las interfases al 24 %/20 % (AV 20) y al 20 %/10 % (AV10) se recolectaron con una jeringuilla y se examinaron.

*Microscopía electrónica de transmisión-*El tejido cerebral se fijó en una solución de paraformaldehído-ácido pícrico al 4 % (1:4, v:v) y glutaraldehído al 25 % durante una noche, luego se lavó 3x en tampón de cacodilato 0,1 M y se impregnó con osmio en tetróxido de osmio al 1 %/ferrocianuro de potasio al 1,5 % durante 3 h, seguido de otro lavado 3x en agua destilada. Las muestras se trataron con acetato de uranilo al 1 % en tampón de maleato durante 1 h, se lavaron 3 x en tampón de maleato (pH 5,2), luego se expusieron a una serie graduada de etanol frío hasta el 100 % y se finalizó con un tratamiento con óxido de propileno. Las muestras se incluyen en plástico puro y se incuban a 60 °C durante 1 o 2 días. Los bloques se cortan en un micrótopo Leica ultracut a 95 nm, se recogen en rejillas de cobre recubiertas de formvar de 100 nm, y se analizan utilizando un ME de transmisión Philips Technai Spirit. Un investigador no familiarizado con el estudio recolectó todas las imágenes.

La parkina soluble está disminuida en los tejidos cerebrales de EA cadavéricos. Para determinar si los niveles de parkina cambian en otras regiones del cerebro con EA, se examinaron tejidos corticales congelados cadavéricos de 12 pacientes con EA y 7 sujetos de control de la misma edad. El diagnóstico clínico y la disección cadavérica (DC) se resumen en la Tabla 3. No se proporcionó información sobre la causa de la muerte. El análisis de transferencia de Western (TW) con anticuerpo anti-parkina (PRK8) reveló una disminución significativa (52 %, P<0,05) del nivel de parkina soluble en la corteza del cerebro con EA (Fig. 49A y D). Para comprobar que la disminución del nivel de parkina no se debe a la pérdida neuronal, se usó un anticuerpo anti-MAP-2 como marcador neuronal y control de carga (Fig. 49A). El ELISA de parkina cuantitativo mostró una disminución significativa (46 %) de los niveles de parkina soluble (Fig. 49B, P<0,05), lo que sugiere que los niveles de parkina pueden estar reducidos en la EA. Un análisis posterior utilizando la prueba de la t bilateral (P<0,02) no mostró diferencias dentro de las muestras de EA o de control con la edad, pero los niveles de parkina se redujeron significativamente (P<0,05) (21 %) en todas las muestras con DC de más de 15 horas.

65

La posible función de la parkina se investigó mediante el examen del nivel de proteínas ubiquitinadas y las posibles dianas de la actividad de ubiquitina ligasa E3 parkina, incluyendo la tubulina y la ciclina E. Los niveles de proteínas ubiquitinadas (Fig. 49C, 1ª transferencia) aumentaron en las TW de extractos corticales de EA solubles en comparación con los sujetos de control, lo que sugiere la falta de degradación de las proteínas ubiquitinadas. Sin diferencias significativas (prueba de la t, $P < 0,02$) dentro del grupo de EA, pero la variación fue apreciable entre los sujetos de control, mostrando los sujetos de mayor edad manchas de proteínas ubiquitinadas similares a EA (Fig. 49C, carril 1 (caso n.º 399) y carril 3 (caso n.º 1277) de la 1ª transferencia. También se observó un aumento significativo de los niveles de tubulina (2ª transferencia, 63 %, Fig. 49D, $P < 0,05$) y ciclina E (3ª transferencia, 34 %, Fig. 49D) en la EA en comparación con los sujetos de control. A continuación, se extrajo la fracción de proteínas insolubles de los tejidos corticales cadavéricos humanos en urea 4 M y se realizó una transferencia de Western. Se detectó poca parkina en la fracción insoluble de los cerebros de control, pero la parkina total aumentó significativamente (130 %, $P < 0,05$) en los cerebros con EA, lo que sugiere la insolubilidad de la parkina (Fig. 49E y F). Los inventores detectaron también un aumento significativo ($P < 0,05$) de los niveles (143 %) de parkina fosforilada en la serina 378 con respecto a la actina en cerebros con EA pero no en los sujetos de control (Fig. 49E, 2ª transferencia y Fig. 49F), lo que sugiere que la fosforilación de la parkina puede asociarse con una solubilidad disminuida.

La parkina colocaliza con $A\beta_{1-42}$ intraneuronal en el hipocampo y la corteza en la EA. Para investigar si la expresión de parkina está alterada en cerebros humanos con EA, se utilizó un anticuerpo monoclonal de ratón anti-parkina (PRK8) que reconoce los a.a. 399-465 y un anticuerpo policlonal de conejo anti- $A\beta_{1-42}$ humana que reconoce los a.a. 1-42. La tinción del hipocampo mostró $A\beta_{1-42}$ (Fig. 50A) y parkina (Fig. 50B) intraneuronales en neuronas con el núcleo teñido con DAPI en sujetos humanos de control, y tanto la parkina como $A\beta_{1-42}$ se detectaron dentro de las mismas células (Fig. 50C). Los niveles de expresión intraneuronal de $A\beta_{1-42}$ aumentaron en el hipocampo de pacientes con EA (Fig. 50D), sin detección apreciable de placas de amiloide. La cotinción mostró niveles de parkina intracelular aumentados (Fig. 50E) en el hipocampo de EA en comparación con los sujetos de control (Fig. 50B), lo que sugiere una acumulación de parkina en los cerebros con EA. Tanto la parkina como $A\beta_{1-42}$ intracelulares colocalizaron en neuronas del hipocampo (Fig. 50F). Para determinar la especificidad de estos resultados en cortes humanos, se usaron de forma alterna el anticuerpo policlonal de conejo anti-parkina (AB5112) que reconoce los a.a. 305-622 y el anticuerpo monoclonal de ratón anti- $A\beta_{1-42}$ humano (4G8) que reconoce los a.a. 17-42. La tinción del hipocampo mostró $A\beta_{1-42}$ (Fig. 50G) y parkina (Fig. 50H) intraneuronales en neuronas con el núcleo teñido con DAPI en EA, y parkina y $A\beta_{1-42}$ se detectaron dentro de las mismas células (Fig. 50J) sin una detección apreciable de placas de amiloide.

Se examinaron otras regiones del cerebro en las que se detectaron placas de $A\beta$ extracelular para determinar si la parkina colocaliza con $A\beta_{1-42}$ intracelular. La tinción con el anticuerpo anti- $A\beta_{1-42}$ mostró formación de placas en la corteza entorrinal, así como acumulación de $A\beta_{1-42}$ intracelular (Fig. 51A), lo que sugiere la presencia de $A\beta_{1-42}$ tanto intracelular como extracelular en la corteza de EA. La tinción de parkina también se observó dentro de neuronas con el núcleo teñido con DAPI en la corteza entorrinal (Fig. 51B), pero la parkina colocalizó solo con neuronas que contenían $A\beta_{1-42}$ y no con placas de $A\beta_{1-42}$ extracelular (Fig. 51C, flechas). Un análisis adicional de la neocorteza también dio como resultado la detección de acumulación intracelular y $A\beta_{1-42}$ de placas (Fig. 51D) en EA, así como la expresión de parkina intracelular (Fig. 51E). De manera similar, parkina y $A\beta_{1-42}$ se colocalizaron (Fig. 51F, flechas) intracelularmente en la corteza de EA. Se usó una combinación alterna de anticuerpos (como se indicó anteriormente) y se detectó la formación de placas en la corteza, así como acumulación de $A\beta_{1-42}$ intracelular (Fig. 51G), lo que sugiere la presencia de $A\beta_{1-42}$ tanto intracelular como extracelular en la corteza de EA. También se observó tinción de parkina dentro de neuronas con el núcleo teñido con DAPI en la corteza de EA (Fig. 51H), pero la parkina colocalizó solo con neuronas que contenían $A\beta_{1-42}$ y no con placas de $A\beta_{1-42}$ extracelular (Fig. 51I, flechas).

Acumulación de parkina, $A\beta$ y p-Tau en autofagosomas en cerebro de EA. Para determinar si la cotinción de parkina con $A\beta_{1-42}$ intracelular se asocia con actividades autofágicas en la EA, se usaron anticuerpos anti-proteína de cadena ligera asociada a microtúbulos 3 (LC3) como sonda y se realizó un fraccionamiento subcelular para medir los niveles de proteínas amiloides en orgánulos autofágicos usando ELISA cuantitativo. La exploración con el anticuerpo anti-LC3 sugirió un aumento significativo de los niveles de LC3-II en comparación con los niveles de LC3-I (28 %) (Fig. 52A, 1ª transferencia y Fig. 52B), lo que indica una posible lipidación de LC3. La cantidad de LC3 en comparación con la actina se midió usando un anticuerpo específico para la isoforma LC3-B. Se detectó un aumento significativo (33 %, $P < 0,05$) del nivel de LC3-B en extractos corticales humanos de pacientes con EA en comparación con sujetos de control (Fig. 52A, 2ª transferencia y Fig. 52B).

Para determinar que el fraccionamiento subcelular conduce al aislamiento de vacuolas autofágicas, la TW se realizó con un marcador lisosómico utilizando un anticuerpo anti-LAMP-3 que mostró una fracción lisosómica en la capa superior del gradiente de Metrazimida (Fig. 52C, transferencia de la parte superior) y anti-LC3B (2ª transferencia), que detectó autofagosomas en las fracciones del gradiente del 10 % (AV-10) y el 20 % (AV-20). Los niveles de $A\beta$ y p-Tau se midieron usando ELISA cuantitativo en estas fracciones. Se detectó un aumento significativo (89 %, $P < 0,05$) del nivel de $A\beta_{1-42}$ en las AV-10 (Fig. 52D) y las AV-20 (78 %), que están enriquecidas en autofagosomas en la EA en comparación con el control. De manera similar, se detectó un aumento significativo (110 %, $P < 0,05$) del nivel de $A\beta_{1-40}$ en las AV-10 (Fig. 52E) y las AV-20 (89 %) en la EA en comparación con el control. No se detectó $A\beta$ en la fracción lisosómica. Los niveles de p-Tau se midieron como otro marcador proteico asociado con la EA. No se detectó p-Tau en el lisosoma, pero los niveles de p-Tau (AT8) aumentaron significativamente en las AV-10 (81 %) y las AV-20 (140 %)

en comparación con el control (Fig. 52F). Debido a que las AV-20 estaban enriquecidas en autofagosomas, estos datos muestran la acumulación de proteínas no degradadas en los autofagosomas en la EA. Sorprendentemente, el nivel de parkina aumentó significativamente ($P < 0,05$) en las AV-10 (64 %) y las AV-20 (52 %) en comparación con el control (Fig. 52G), pero no en la fracción lisosómica, lo que sugiere que la parkina acumulada colocaliza con $A\beta$ y p-Tau en los compartimentos autofágicos.

$A\beta_{1-42}$ lentivírica induce p-Tau y proteína amiloidogénica y la parkina exógena invierte estos efectos. Debido a que la insolubilidad y la colocalización de la parkina se detectó con $A\beta_{1-42}$ intraneuronal en el cerebro con EA, se usó transferencia génica lentivírica para coexpresar $A\beta_{1-42}$ y parkina en la corteza de rata y se investigaron los efectos de estas proteínas en la autofagia. Se observó que el suministro lentivírico condujo a un aumento (50 % por densitometría, $N=8$) de la expresión de parkina (Fig. 53A, 1ª transferencia) y a la eliminación de $A\beta_{1-42}$ 2 semanas posinyección de parkina lentivírica junto con $A\beta_{1-42}$ (Fig. 53A, 2ª transferencia). No se observaron cambios en los niveles totales de parkina en cerebros a los que se les inyectó $A\beta_{1-42}$ lentivírica (Fig. 53A, 1ª transferencia), y no se detectó fosfo-parkina en las fracciones de urea 4 M insoluble o de ácido fórmico al 30 %. Para determinar los niveles de parkina, se realizó un ELISA cuantitativo para parkina humana en lisados corticales. La parkina humana aumentó significativamente en animales a los que se les inyectó parkina (34 %, $N=8$) o parkina+ $A\beta_{1-42}$ (38 %) (Fig. 53B) en comparación con LacZ o $A\beta_{1-42}$ solo. Luego se realizaron estudios independientes para determinar los efectos de la actividad de parkina sobre los niveles de $A\beta_{1-42}$ en la corteza, usando un ELISA de $A\beta_{1-42}$ específico para ser humano. Se observó un aumento significativo (Fig. 53C, 7,8 veces, $N=8$, $P < 0,05$, ANOVA, Neumann Keuls con comparación múltiple) del nivel de $A\beta_{1-42}$ 2 semanas posinyección con $A\beta_{1-42}$ lentivírica en la corteza. La coexpresión de parkina disminuyó significativamente (6 veces) los niveles de $A\beta_{1-42}$, pero $A\beta_{1-42}$ permaneció significativamente mayor (89 %) en comparación con los animales a los que se les inyectó parkina o LacZ (Fig. 53E).

Luego se determinaron los efectos de la parkina sobre las proteínas amiloidogénicas en animales que expresan $A\beta_{1-42}$. Se realizó un ELISA y se observó un aumento significativo de p-Tau de rata (AT8) en la corteza a las 4 semanas pero no a las 2 semanas posinyección (Fig. 53D). Se realizó una tinción de tioflavina-S para examinar si $A\beta_{1-42}$ lentivírica y la acumulación de p-Tau conducen a la formación de proteínas amiloidogénicas. Los cortes cerebrales corticales mostraron tinción positiva para tioflavina-S en animales que expresan $A\beta_{1-42}$ (Fig. 53H) en comparación con los controles a los que se les inyectó LacZ lentivírica (Fig. 53E). La coexpresión de parkina con $A\beta_{1-42}$ eliminó la tinción positiva de tioflavina-S en la corteza 4 semanas posinyección (Fig. 53G). Estos datos muestran que la parkina contrarresta a las proteínas amiloidogénicas inducidas por $A\beta_{1-42}$.

La parkina participa en la eliminación de vacuolas autofágicas que contienen p-Tau y $A\beta_{1-42}$. Se determinó si la expresión de parkina puede participar en la eliminación de la acumulación de vacuolas autofágicas inducida por $A\beta_{1-42}$. El barrido por microscopía electrónica de cortes corticales no mostró acumulación de parkina insoluble colocalizada con vacuolas de $A\beta$ intracelular en el citosol de animales a los que se les inyectó LacZ lentivírica (Fig. 54A) o parkina lentivírica (Fig. 54B). La expresión lentivírica de $A\beta_{1-42}$ condujo a la acumulación citosólica de vacuolas autofágicas (Fig. 54C, flechas), lo que sugiere la inducción de autofagia 2 semanas posinyección con $A\beta_{1-42}$ lentivírica. La coexpresión de parkina lentivírica con $A\beta_{1-42}$ lentivírica condujo a la formación de vacuolas de doble membrana que contenían desechos (Fig. 54D). Estos datos sugieren que la parkina conduce a la eliminación autofágica de vacuolas inducidas por $A\beta_{1-42}$ lentivírica. Se realizó fraccionamiento subcelular y se midieron los niveles de $A\beta_{1-42}$ y p-Tau usando ELISA cuantitativo en estas fracciones. Se detectó un aumento significativo (61 %, $P < 0,05$, $N=5$) del nivel de $A\beta_{1-42}$ en las AV-10 (Fig. 54E) en comparación con los animales a los que se les inyectó LacZ, parkina o parkina+ $A\beta_{1-42}$, indicando que $A\beta_{1-42}$ altera la autofagia normal, lo que conduce a la acumulación de autofagosomas. Sin embargo, la coexpresión de parkina condujo a la eliminación de $A\beta_{1-42}$ de las AV-10 y a niveles de $A\beta_{1-42}$ significativamente aumentados en las AV-20 (42 %) y los lisosomas (35 %) en comparación con LacZ y parkina solo (Fig. 54E). Debido a que la expresión de $A\beta_{1-42}$ indujo a p-Tau a las 4 semanas posinyección, también se midieron los niveles de p-Tau (AT8). Los animales a los que se les inyectó $A\beta_{1-42}$ tuvieron un aumento significativo (31 %) en los niveles de p-Tau en las AV-10 en comparación con LacZ, parkina y parkina- $A\beta_{1-42}$ (Fig. 54F). Sin embargo, la expresión de parkina+ $A\beta_{1-42}$ condujo a la eliminación a partir de las AV-10 y a niveles significativamente aumentados de p-Tau en las AV-20 (18 %) y los lisosomas (20 %).

La parkina regula la eliminación de autofagosomas en animales que expresan $A\beta_{1-42}$. Determinar los mecanismos por los cuales la parkina puede participar en la eliminación de las vacuolas autofágicas, se examinaron los marcadores moleculares de la vía autofágica que conduce a la eliminación autofagosómica. El análisis de TW no mostró diferencias en los niveles de beclina en animales a los que se les inyectó LacZ, parkina o $A\beta_{1-42}$ lentivíricas (Fig. 55A). Sin embargo, se detectó un aumento significativo de los niveles de beclina (48 % por densitometría, $N=8$, $P < 0,05$) cuando la parkina se coexpresó con $A\beta_{1-42}$, lo que sugiere que la parkina responde a al estrés inducido por $A\beta_{1-42}$. Los niveles de genes relacionados con la autofagia (los Atg), incluidos Atg7 y Atg12, también aumentaron en un 34 % y un 29 %, respectivamente, en animales a los que se les inyectó parkina+ $A\beta_{1-42}$ (Fig. 55A) en comparación con animales a los que se les inyectó LacZ, parkina o $A\beta_{1-42}$ solo. Se examinaron otros marcadores de la cascada autofágica LC3. No se detectaron cambios en los niveles de LC3-B en animales a los que se les inyectó LacZ o parkina lentivíricas solas (Fig. 55B). La expresión de $A\beta_{1-42}$ lentivírica conduce a un aumento significativo (32 %, $N=8$, $P < 0,05$) de los niveles de LC3-B, pero la coexpresión de parkina invirtió el aumento de LC3-B (Fig. 55B). Se observó un aumento significativo de los niveles de la histona desacetilasa 6 (HADC6) (44 %) en animales a los que se les inyectó parkina+ $A\beta_{1-42}$ lentivíricas

(Fig. 55B) en comparación con todas las demás condiciones. Estos datos sugieren que la parkina responde al estrés por $A\beta_{1-42}$ a través de la regulación al alza de los marcadores moleculares de autofagia.

Los datos de ME y TW se complementaron con inmunohistoquímica para evaluar el aspecto de la tinción de LC3-B. La tinción con anticuerpo anti-LC3-B no mostró reactividad en la corteza de los animales a los que se les inyectó LacZ (Fig. 55C) o parkina (Fig. 55D). Sin embargo, la inyección lentivírica de $A\beta_{1-42}$ aumentó la tinción de LC3-B (Fig. 55E), de acuerdo con los datos de la TW. La coinyección de parkina lentivírica con $A\beta_{1-42}$ (Fig. 55F) condujo a la desaparición de la tinción de LC3-B. El recuento estereológico de células positivas para LC3-B reveló un aumento significativo (Fig. 55G. 52 %, $P < 0,05$, $N=8$) en cortezas a las que se les coinyectó $A\beta_{1-42}$ en comparación con otros tratamientos, lo que indica que la actividad de la parkina regula la eliminación de autofagosomas en animales que expresan $A\beta_{1-42}$. Para determinar más a fondo si la parkina conduce a la eliminación de las proteínas ubiquitinadas a través de la autofagia, se utilizó como sonda un anticuerpo anti-P62. Los niveles de P62 aumentaron significativamente ($P < 0,05$, $N=8$) cuando se expresó $A\beta_{1-42}$ (21 % por densitometría con respecto a la actina) en comparación con LacZ (Fig. 55F). Sin embargo, la coexpresión de parkina condujo a la desaparición completa de la tinción de P62, lo que sugiere la degradación autofágica de las proteínas ubiquitinadas.

Estos estudios proporcionan la primera evidencia de la inactividad de la parkina y la solubilidad disminuida en la EA. Los datos actuales muestran que la parkina se inactiva y se acumula con $A\beta_{1-42}$ y p-Tau en autofagosomas en la EA. Este nuevo resultado muestra que la disminución de la actividad de la ubiquitina ligasa E3 parkina puede dar como resultado una falta de eliminación autofágica, lo que conduce a la acumulación de las vacuolas autofágicas observadas en los cerebros con EA. Los estudios de transferencia génica en animales proporcionan pruebas de que $A\beta_{1-42}$ lentivírica podría inhibir la maduración de los autofagosomas de forma similar a la EA. En conclusión, estos datos demuestran una asociación entre la inactivación de la parkina y la colocación con $A\beta_{1-42}$ intraneuronal con la disfunción autofágica, lo que indica un papel beneficioso para la parkina en la eliminación autofágica. La inactivación de la parkina podría conducir a una eliminación autofágica disminuida y a la acumulación de proteínas amiloidogénicas no degradadas en los autofagosomas. La expresión lentivírica de $A\beta_{1-42}$ conduce a p-Tau y a la acumulación de vacuolas autofágicas a través de la inhibición de la maduración de los autofagosomas y/o el deterioro del transporte de orgánulos autofágicos. La actividad de la ubiquitina ligasa E3 parkina potencia el flujo autofágico y la eliminación de amiloide, posiblemente a través de la maduración aumentada de autofagosomas y el reconocimiento con los lisosomas. El papel de la parkina en la eliminación autofágica podría explotarse como una estrategia terapéutica en las enfermedades neurodegenerativas.

Tabla 3. Sumario y diagnósticos clínicos de pacientes con EA y sujetos de control utilizados para estudios bioquímicos.

n.º BRC	DDF	Edad	Sexo	Raza	DC	Área FR
399	Control	79	F	B	24	Motora
417	Control	80	F	B	6	Motora
487	Control	73	M	B		Motora
515	Control	62	M	B	19	Motora
705	Control	73	M	B	9	Motora
1277	Control	80	F	B	8	Motora
2052	Control	79	M	B	16	Motora
1390	EA	75	M		12	Motora
1336	EA	82	M	B	10	Motora
1652	EA	85	M	B	18	Motora
1657	EA	82	M	B	15	Motora
1697	EA/Infartos	86	M		6	Motora
1671	EA	77	M	B		Motora
1801	EA	75	M		15	Motora
1870	EA	85	M	B	3,5	Motora
1997	EA	85	M	B	5,5	Motora
2070	EA	82	M	B	19	Motora
2076	EA	84	F	B	16	Motora
2078	EA, enf. cerebrovasc. (NC)	80	M		16	Motora

35

Tabla 4. Sumario y diagnósticos clínicos de pacientes con EA y sujetos de control utilizados para estudios de inmunohistoquímica.

n.º BRC	DDF	CERAD	BRAAK	Edad	Sexo	Raza	DC	DF
1062	Control			58	M	N	14	Hipocampo, CM
1252	Control			70	M	B		Hipocampo, CM
1277	Control	0		80	F	B	8	Caudado, hipocampo, CM
1352	Control			78	F		14	Caudado, hipocampo, CM
1615	Control			72	M	B	20	Caudado
1683	Control	1		91	F	B	8	Caudado

(continuación)

n.º BRC	DDF	CERAD	BRAAK	Edad	Sexo	Raza	DC	DF
1855	Control			77	M	B		Caudado, hipocampo, CM
2201	Control	0	2	85	F	B	27	Caudado, hipocampo, CM
1774	EA	C	6	87	F	B	17,5	Hipocampo
1778	EA	C	6	80	F	B	6,5	Hipocampo, CM
1782	EA			86	M	B	19,5	Hipocampo, CM
1788	EA	C		62	F	B	36,5	Hipocampo
1833	EA			79	F	B	4,5	Entorrinal/Hipotal.
1851	EA			86	F			Entorrinal/Hipotal.
1854	EA	C	6	89	M	B	9,5	Hipocampo
1861	EA			85	M	B	29	Hipocampo
2291	EA	N	4	77	M	B	8	Neocorteza

Ejemplo 4

La enfermedad de Parkinson es un trastorno del movimiento caracterizado por la muerte de las neuronas dopaminérgicas (DA) de la sustancia negra (SN) y la acumulación cerebral de sinucleína α . La tirosina cinasa c-Abl se activa en la neurodegeneración. La expresión lentivírica de sinucleína α conduce a la activación de c-Abl (fosforilación) y la expresión de c-Abl aumenta los niveles de sinucleína α en la SN de ratón, de acuerdo con la activación de c-Abl en cerebros con EP. La sinucleína α lentivírica induce la acumulación de autofagosomas, y la potenciación de la autofagia con el inhibidor de c-Abl Nilotinib aumenta la eliminación autofágica. El Nilotinib se usa para el tratamiento de la leucemia en adultos y entra al cerebro dentro de las dosis aprobadas por la FDA, lo que conduce a la degradación autofágica de la sinucleína α y la limitación de la muerte celular, incluyendo las neuronas de la SN. Nilotinib potencia el comportamiento motor en modelos lentivíricos de EP, aumenta los niveles de DA e induce hiperactividad en ratones transgénicos A53T. Estos datos muestran que Nilotinib puede ser una estrategia terapéutica para degradar la sinucleína α en la EP y otras sinucleinopatías.

15

Inyección estereotáctica. Se les inyectó de forma estereotáctica a ratones C57BL/6 de seis meses de edad, una m.i. de 1×10^4 de c-Abl, sinucleína α (o control de LacZ) lentivíricas bilateralmente en la SN usando las coordenadas: lateral: 1,5 mm, ventral: 4,1 mm y horizontal: -3,64. Los concentrados víricos se inyectaron a través de un controlador de bomba de microjeringa (Micro4) usando una bomba total (World Precision Instruments, Inc.) de 2 μ l a una velocidad de 0,2 μ l/min como se describió anteriormente (54-56). Todos los experimentos con animales se realizaron en pleno cumplimiento de las recomendaciones del Comité de Uso y Cuidado de Animales de la Universidad de Georgetown (GUAUC).

Tratamiento con nilotinib. Tres semanas posinyección con el lentivirus, la mitad de los animales se trataron i.p. diariamente con Nilotinib 10 mg/kg disuelto en DMSO y la otra mitad recibió tratamientos con DMSO (3 μ l en total) durante 3 semanas adicionales. La mitad de los ratones transgénicos A53T de 6-8 meses de edad se trataron i.p. diariamente con Nilotinib 10 mg/kg y la otra mitad con DMSO.

Análisis de TW. Se aisló la región nigroestriatal de ratones que expresaban sinucleína α o c-Abl y se comparó con extractos de LacZ o cerebrales totales de ratones A53T. Los tejidos se homogeneizaron en tampón STEN 1x (Tris 50 mM (pH 7,6), NaCl 150 mM, EDTA 2 mM, NP-40 al 0,2 %, BSA al 0,2 %, PMSF 20 mM y cóctel inhibidor de proteasas), se centrifugó a 10.000 x g durante 20 min a 40C y se recogió el sobrenadante que contenía la fracción de proteínas solubles. El sobrenadante se analizó por TW en un gel SDS NuPAGE Bis-Tris (Invitrogen). La sinucleína α se exploró con anticuerpo anti-sinucleína α de ratón (1:1000) (BD Transduction Laboratories, EE. UU.) o anticuerpos humanos (1:1500) (ThermoScientific). La c-Abl total se exploró con anticuerpo policlonal de conejo (1:500) (Thermo Fisher) y p-c-Abl (Tyr-214) con anticuerpo policlonal de conejo (1:500) (Millipore). La actina β se exploró con un anticuerpo policlonal (1:1000) (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, EE. UU.). Se utilizaron anticuerpos de autofagia, incluyendo beclina 1 (1:1000), Atg5 (1:1000), Atg12 (1:1000) para explorar de acuerdo con el kit de muestreo de anticuerpos de autofagia 4445 (Cell Signaling, Inc). Se utilizaron policlonal anti-LC3 de conejo (Pierce) (1:1000) y policlonal anti-actina de conejo (Thermo Scientific) (1:1000)). Se utilizó policlonal de conejo para tubulina (1:1000) (Thermo Scientific). Map 2 se exploró con anticuerpo monoclonal de ratón (1:1000) (Pierce). Se utilizó un policlonal de conejo anti-SQSTM1/p62 (Cell Signaling Technology) (1:500). Las TW se cuantificaron por densitometría usando el programa informático Quantity One 4.6.3 (Bio Rad).

IHQ de cortes cerebrales. Los animales se anestesiaron profundamente con una mezcla de xilacina y ketamina (1:8), se lavaron con solución salina 1X durante 1 min y luego se perfundieron con paraformaldehído (PFA) al 4 % durante 15-20 min. Los cerebros se disecaron rápidamente y se almacenaron inmediatamente en PFA al 4 % durante 24 h a 40C, y luego se transfirieron a sacarosa al 30 % a 40C durante 48 h. La tirosina hidroxilasa (TH) se exploró con anticuerpo policlonal de conejo (AB152) (Millipore) (1:100) y la sinucleína α humana se exploró con anticuerpos monoclonales de ratón (Thermo Scientific) (1:100) y se contratiñó con DAB.

Métodos estereológicos. Estos los aplicó un investigador que no estaba familiarizado con el estudio mediante un análisis estereológico no sesgado (Stereologer, Systems Planning and Analysis, Chester, MD), para determinar los

recuentos de células positivas totales en 20 campos corticales en al menos 10 cortes cerebrales (~400 células positivas por animal) de cada animal.

5 **Cultivo y transfección celular.** Se cultivaron células M17 de neuroblastoma humano en placas de 24 pocillos (Falcon) como se describió anteriormente (57, 58). La transfección transitoria se realizó con 3 µg de sinucleína α , o con ADNc de ARNhc de c-Abl o beclina 1 (Open Biosystems), o 3 µg de ADNc de LacZ durante 24 horas. Las células se trataron con Nilotinib 10 µM durante 24 horas. Las células se recogieron 48 horas después de la transfección. Las células se recogieron una vez con tampón STEN y se centrifugaron a 10.000xg durante 20 min a 4 °C y se recolectó el sobrenadante.

10 **Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) de sinucleína α humana** Estos se realizaron utilizando 50 µl (1 µg/µl) de lisados cerebrales (en tampón STEN) detectados con 50 µl de anticuerpo primario (3 h) y 100 µl de anticuerpo secundario anti-conejo (30 min) a TA. Los niveles de sinucleína α se midieron usando ELISA específico para ser humano (Invitrogen) de acuerdo con los protocolos de los fabricantes.

15 **Ensayo de actividad fluorométrica de caspasa 3-** Para medir la actividad de la caspasa 3 en los modelos animales, los inventores utilizaron el kit EnzChek® caspase-3 assay kit #1 (Invitrogen) sobre extractos corticales y sustrato Z-DEVD-AMC, y se leyó la absorbancia de acuerdo con el protocolo del fabricante.

20 **ELISA de dopamina y HVA.** Se recolectó el cerebro o el mesencéfalo total y se detectaron 50 µl (1 µg/µl) de lisados cerebrales recientes (en tampón STEN) con 50 µl de anticuerpo primario (1 h) y 100 µl de anticuerpo secundario anti-conejo (30 min) a TA de acuerdo con los protocolos del fabricante (Abnova, n.º de cat. BOLD01090J00011) para DA y (Eagle Biosciences, n.º de cat. HVA34-K01) para HVA.

25 **ME de transmisión.** Los tejidos cerebrales se fijan en solución de ácido fosfórico-pírico al 4 % (1:4, v:v) y glutaraldehído al 25 % durante toda la noche, luego se lavó 3X en tampón de cacodilato 0,1 M, y se impregnó con osmio en tetróxido de osmio al 1 %/ferrocianuro de potasio al 1,5 % durante 3 h, seguido de otro lavado 3x en agua destilada. Las muestras se tratarán con acetato de uranilo al 1 % en tampón de maleato durante 1 h, se lavan 3x en tampón de maleato (pH 5,2), luego se exponen a una serie graduada de etanol frío hasta el 100 % y se finaliza con un tratamiento con óxido de propileno. Las muestras se incluyen en plástico puro y se incuban a 60 °C durante 1 o 2 días.

30 Los bloques se cortan en un micrótopo Leica ultracut a 95 nm, se recogen en rejillas de cobre recubiertas de formvar de 100 nm y se analizan utilizando un ME de transmisión Philips Technai Spirit. Para estudios de inmuno-ME, las cortes se incubarán durante una noche con los anticuerpos primarios y se impregnarán con oro para el análisis de ME.

35 **Espectrometría de masas MALDI-TOF.** Los extractos cerebrales se liofilizan (en DMSO) y se resuspenden en acetonitrilo. La cuantificación de Nilotinib se llevará a cabo en un analizador 4800 MALDI-TOF-TOF (Applied Biosystems, CA, EE. UU.) en modo positivo para reflector y luego se valida en modo MS/MS como se describió anteriormente (54, 59). Las masas de los fragmentos detectados se identificarán en las bases de datos SWISS-PROT utilizando MASCOT.

40 **Pruebas de rotarod.** Los ratones se colocaron en un rotarod acelerador (Columbus Instruments) equipado con temporizadores individuales para cada ratón. Los ratones se entrenaron para permanecer en la barra a una rotación constante de 5 rpm durante al menos 2 minutos, luego se aumentó gradualmente la velocidad en 0,2 rpm/min y se midió la latencia hasta la caída. Todos los valores se convirtieron a % del control.

45 **La activación de c-Abl está asociada con la acumulación de sinucleína α .** Para examinar la relación entre c-Abl y sinucleína α , a ratones C57BL/6 macho se les inyectó de forma estereotáctica una m.i. de 1×10^4 de c-Abl, o sinucleína α (o LacZ) lentivíricas bilateralmente en la SN. La expresión de sinucleína α lentivírica durante 6 semanas (Fig. 56A, 1ª transferencia, 42 % por encima del nivel de LacZ, N=9) condujo a un aumento de c-Abl total (110 %) y c-Abl con la tirosina 412 (T412) fosforilada (82 %) (Fig. 56A, $p < 0,05$, N=9) en comparación con la actina, indicando la activación

50 de c-Abl. Los extractos estriatales de EP cadavéricos humanos también mostraron un aumento en c-Abl total (220 %) y T412 (150 %) (Fig. 56B y C, N=9) en comparación con los sujetos de control (N=7, $p < 0,02$, prueba de la t bilateral). En cambio, la expresión lentivírica de c-Abl en la SN de ratón durante 6 semanas condujo a un aumento (132 %) de c-Abl total (Fig. 56D, $p < 0,05$, N=9) y la fosforilación de T412 (71 %) en comparación con la actina y dio como resultado

55 niveles aumentados de sinucleína α monomérica (51 %) y de alto peso molecular (30 %), confirmando aún más la relación entre c-Abl y la acumulación de sinucleína α .

El Nilotinib es un inhibidor de segunda generación de la tirosina cinasa (TKI, forma siglada de *tyrosine kinase inhibitor*) c-Abl, anteriormente conocido como AMN107 (35-37). El análisis de espectroscopia de masas reveló que la inyección

60 intraperitoneal (i.p.) de Nilotinib 10 o 20 mg/kg en ratones de tipo silvestre (N=5/punto de tiempo), condujo a la detección de hasta 30 ng de Nilotinib por mg de tejido cerebral 3-4 después de la inyección (Fig. 56E). El nivel de Nilotinib disminuyó a 3,4 ng/mg 7-8 horas posinyección, lo que indica que Nilotinib entra al cerebro y se elimina en unas pocas horas. A continuación, se evaluó la actividad de la caspasa-3 como una medida de la muerte celular 3 semanas posinyección con sinucleína α lentivírica seguida de 3 semanas de tratamiento con DMSO o Nilotinib (6

65 semanas en total). La inyección i.p. de Nilotinib 10 mg/kg o DMSO (30 µl) diariamente durante 6 semanas no dio como

resultado ninguna diferencia en la actividad de caspasa-3 en los ratones a los que se les inyectó LacZ (Fig. 56F, N=32), pero la expresión de sinucleína α lentivírica aumentó la actividad de caspasa 3 (Fig. 56F, 740 %, $p < 0,05$, N=14) y el Nilotinib invirtió este aumento al 140 % de los niveles de LacZ ($p < 0,05$, N=14). De manera similar, la inyección i.p. de Nilotinib 10 mg/kg o DMSO (30 μ l) diariamente durante 3 semanas en un modelo transgénico de 7-8 meses que alberga la mutación A53T de sinucleína α , mostró un aumento de la actividad de caspasa 3 (Fig. 56G, 670 %, $p < 0,05$, N=15) y el Nilotinib invirtió este aumento al 101 % de los controles de tipo silvestre de la misma edad y sin Nilotinib (N=64).

La inhibición de c-Abl a través de Nilotinib estimula la degradación autofágica de sinucleína α . Todos los animales se trataron diariamente con una inyección i.p. de Nilotinib 10 mg/kg o DMSO (ratones A53T) durante 3 semanas y los modelos lentivíricos se trataron con Nilotinib (o DMSO) 3 semanas posinyección con sinucleína α lentivírica o LacZ. La transferencia de Western (TW) mostró una disminución significativa de c-Abl total (78 %) y c-Abl fosforilada en T412 (52 %) en comparación con la tubulina en las neuronas del mesencéfalo en ratones con sinucleína α lentivírica tratados diariamente con Nilotinib 10 mg/kg en comparación con DMSO. Los niveles de sinucleína α humana aumentaron a 202 ng/ml en ratones con sinucleína α lentivírica tratados con DMSO, y el Nilotinib invirtió este aumento a 31 ng/ml en comparación con LacZ con y sin Nilotinib. El tratamiento con Nilotinib dio como resultado niveles disminuidos de sinucleína α monomérica (42 %) y de alto peso molecular en comparación con el nivel de actina. Se observó un aumento de varios marcadores moleculares de autofagia, incluido beclina 1 (62 %), Atg-5 (43 %) y Atg-12 (58 %) en comparación con la actina. Un análisis adicional de los marcadores autofágicos mostró disminuciones significativas de P62 (69 %) y LC3-II en comparación con LC3-I (39 %) y MAP-2 (41 %) con tratamiento con Nilotinib, lo que sugiere una eliminación autofágica de la sinucleína α . De manera similar, la inyección i.p. de Nilotinib diariamente durante 3 semanas en ratones A53T de 7-8 meses, que no expresan sinucleína α en la SN, mostró una disminución significativa de c-Abl total (64 %) y c-Abl fosforilada en T412 (70 %) en comparación con MAP-2 en extractos cerebrales totales, en comparación con los ratones tratados con DMSO. Se observó un aumento del nivel de c-Abl total (109 %) y T412 (76 %) en ratones A53T tratados con DMSO en comparación con los controles de la misma edad. Se observó un aumento significativo del nivel de LC3-II en ratones A53T+DMSO en comparación con el control y LC3-II desapareció por completo en ratones A53T tratados con Nilotinib, sugiriendo eliminación autofágica. Los niveles de sinucleína α humana aumentaron a 785 ng/ml en ratones A53T tratados con DMSO, y el Nilotinib invirtió este aumento a 467 ng/ml en comparación con el control. El tratamiento con Nilotinib dio como resultado niveles disminuidos de sinucleína α humana monomérica (41 %) y de alto peso molecular en comparación con el nivel de actina. No se observaron diferencias en los niveles de beclina 1 y Atg5 entre los ratones A53T+DMSO y el control de tipo silvestre, pero se observó un aumento de Atg12 (24 %) en comparación con la actina. Sin embargo, el Nilotinib aumentó la beclina 1 (69 %) y la Atg-5 (29 %) en comparación con el tratamiento con DMSO en ratones A53T.

Para determinar con más detalle si la autofagia participa en la eliminación de la sinucleína α , se transfectaron células de neuroblastoma M17 humanas con 3 μ g de lacZ, sinucleína α o con ARNhc de beclina 1 durante 24 h y luego se trató con Nilotinib 10 μ M durante 24 horas más. Se observó un aumento de sinucleína α (264 ng/ml) en las células transfectadas con sinucleína α en comparación con LacZ (Fig. 57H, $p < 0,05$, N=12) tratadas con 1 μ l de DMSO. El Nilotinib invirtió la sinucleína α a 35 ng/ml ($p < 0,05$), pero el bloqueo de la expresión de beclina 1 con ARNhc atenuó la eliminación de sinucleína α (150 ng/ml) con Nilotinib en comparación con DMSO (251 ng/ml), lo que sugiere la implicación autofágica en la eliminación de sinucleína α .

El Nilotinib elimina la sinucleína α y protege las neuronas de tirosina hidroxilasa (TH) de la SN. La tinción inmunohistoquímica de cortes cerebrales de 20 μ m de grosor mostró expresión de sinucleína α humana en ratones a los que se les inyectó sinucleína α lentivírica en la SN y tratados con DMSO (Fig. 57B) en comparación con ratones con LacZ+Nilotinib (o DMSO) (Fig. 57A, N=12) y el Nilotinib condujo a una disminución del 84 % (por estereología) de la sinucleína α humana (Fig. 57C, $p < 0,05$, N=12) en neuronas de la SN. Se observó una disminución significativa en las neuronas TH+ (89 % por estereología) en ratones con sinucleína α lentivírica+DMSO (Fig. 57E y H) en comparación con ratones con LacZ+Nilotinib (Fig. 57D y G), y el tratamiento con Nilotinib de ratones que expresan sinucleína α invirtió la pérdida de neuronas TH+ al 82 % (Fig. 57F e I, por estereología) del nivel de LacZ ($p < 0,05$, N=12). El recuento estereológico mostró una disminución similar (72 %) de células TH+ contrateñidas con Nissl en sinucleína α +DMSO (Fig. 57K) en comparación con LacZ (Fig. 57J) y el 64 % de sinucleína α +Nilotinib (Fig. 57L, $p < 0,05$, N=12), lo que sugiere que la sinucleína α provoca la muerte celular y no la regulación a la baja de la TH. La microscopía electrónica de transmisión de las neuronas de la SN mostró acumulación de desechos citosólicos (Fig. 58A) y vacuolas autofágicas (AV) en los ratones que expresan sinucleína α lentivírica con tratamiento con DMSO. En estos animales se observó acumulación de AV citosólicas que contenían desechos (Fig. 58C y E), sugiriendo acumulación de autofagosomas, compatible con el aumento de LC3-II por TW. El tratamiento con Nilotinib condujo a la aparición de AV más grandes que parecían proceder de la fusión de múltiples compartimentos autofágicos (Fig. 58B, D y F).

Nilotinib atenúa los niveles de sinucleína α en ratones A53T. La tinción inmunohistoquímica de 7 cortes cerebrales de 20 μ m de grosor mostró una expresión abundante de sinucleína α humana en el cuerpo estriado de ratones transgénicos A53T de 6 a 8 meses de edad tratados con DMSO (Fig. 59A), el tronco encefálico (Fig. 59B), la corteza (Fig. 59C) y el hipocampo (Fig. 59D). No se detectó tinción de sinucleína α en la SN de los ratones A53T. La inyección i.p. de Nilotinib diariamente durante 3 semanas condujo a una disminución estriatal (72 %) de la sinucleína α humana (Fig. 59E), eliminó completamente la sinucleína α del tronco encefálico (Fig. 59F) y redujo la sinucleína α cortical (Fig. 59G, 71 %) y del hipocampo (Fig. 59H, 81 %) ($p < 0,05$, N=7) en ratones transgénicos A53T.

El Nilotinib aumenta el nivel de DA y mejora el rendimiento motor. Para evaluar los efectos de la sinucleína α y el Nilotinib en el metabolismo de la DA, se midieron mediante ELISA la DA y su metabolito ácido homovanílico (HVA). Se observó una disminución significativa ($p < 0,05$, $N=8$) de DA (62 %) y HVA (36 %) en los extractos de mesencéfalo cerebral de los ratones con α -Sinucleína lentivírica+DMSO en comparación con los ratones con LacZ con y sin Nilotinib. Sin embargo, la inyección de Nilotinib invirtió significativamente ($P < 0,05$, $N=8$) la pérdida de DA y HVA de vuelta a los niveles de lacZ de control. La expresión de sinucleína α lentivírica en la SN disminuyó el rendimiento motor en rotarod al 39 % de los controles de LacZ con y sin Nilotinib, pero el tratamiento con Nilotinib de ratones con sinucleína α invirtió el rendimiento motor al 86 % del nivel de LacZ, lo que sugiere que la inversión de los niveles de DA conduce a un rendimiento motor mejorado. No se observó pérdida de DA o HVA en ratones transgénicos A53T tratados con DMSO en comparación con el control de la misma edad con y sin Nilotinib, pero Nilotinib aumentó drásticamente los niveles de DA (174 %) y HVA (50 %) en los ratones A53T. No se observaron diferencias apreciables en el rendimiento en el rotarod entre los ratones A53T de 6 a 8 meses de edad tratados con DMSO y los controles de tipo silvestre. Sin embargo, el Nilotinib aumentó el rendimiento motor en el rotarod (45 %) por encima de los niveles de control, lo que sugiere hiperactividad en ratones A53T.

Ejemplo 5

La tirosina cinasa c-Abl se activa en trastornos neurodegenerativos, entre los que se incluye la enfermedad de Alzheimer (EA). El Nilotinib es un inhibidor de c-Abl aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) de los Estados Unidos para el tratamiento de la leucemia en adultos. Estos estudios muestran que la activación de parkina mediada por Nilotinib estimuló la ruta de eliminación autofágica, lo que conduce a la degradación de amiloide y a la mejora cognitiva de una manera dependiente de parkina. El Nilotinib no logró eliminar las vacuolas autofágicas y las proteínas amiloides en ratones $-/-$ para parkina, a pesar de un aumento de los niveles de beclina 1, mientras que la atenuación génica de beclina 1 atenuó la eliminación de $A\beta$, subrayando un papel indispensable para la parkina endógena en la autofagia. Estos datos demostraron que la inhibición de c-Abl mediada por Nilotinib es una estrategia terapéutica para rescatar a las células de la toxicidad de la amiloide intraneuronal y prevenir tanto el depósito de placas como la progresión del deterioro cognitivo leve a EA.

Tejidos cerebrales humanos cadavéricos. Las muestras cadavéricas humanas se obtuvieron del banco de cerebros de la Universidad John's Hopkins. La descripción de los pacientes y la preparación de las muestras se resumen en el Ejemplo 1. Los datos se analizaron como media \pm desviación típica, usando la prueba de la t bilateral ($P < 0,05$).

Inyección estereotáctica. Las construcciones lentivíricas que codifican LacZ o $A\beta_{1-42}$ se inyectaron de forma estereotáctica a una multiplicidad de infección (m.i.) de 1×10^6 , bilateralmente en el hipocampo CA1 de C57BL/6 o de $-/-$ para parkina de 1 año de edad. Se suministró un total de 6 μ l de concentrados de lentivirus a una velocidad de 0,2 μ l/min y todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité de Uso y Cuidado de Animales de la Universidad de Georgetown (GUACUC).

Tratamiento con nilotinib. Se disolvió Nilotinib en DMSO y se inyectó por vía intraperitoneal (i.p.) un volumen total de 30 μ l una vez al día durante 3 semanas. La mitad de los animales recibieron DMSO y la otra mitad Nilotinib en DMSO.

Análisis de transferencia de Western. Los tejidos cerebrales se homogeneizaron en tampón STEN 1x, se centrifugó a 10.000 x g durante 20 min a 40C, y se recolectaron los sobrenadantes que contenían la fracción soluble de proteínas. El sedimento se resuspendió en urea 4 M o ácido fórmico al 30 % y se ajustó a pH 7 con NaOH 1 N, y se centrifugó a 10.000 x g durante 20 min a 4 °C, y se recogió el sobrenadante que contenía la fracción insoluble. La parkina total se sometió a inmunoexploración con anticuerpo PRK8 (1:1000). Anticuerpos policlonales de conejo anti-beclina 1 (1:1000), gen similar a la autofagia (Atg)-5 (1:1000), Atg12 (1: 1000) y LC3-B (1: 1000) se usaron para sondear proteínas de autofagia usando el kit de muestreo de anticuerpos 4445 (Cell Signaling, Inc). Se utilizaron policlonal anti-LC3 de conejo (Pierce) (1:1000) y policlonal anti-actina de conejo (Thermo Scientific) (1:1000). Se utilizaron policlonal de conejo para tubulina (1:1000) (Thermo Scientific) y anti-ubiquitina monoclonal de ratón (1:500) (Santa Cruz Biotechnology). Map 2 se exploró con anticuerpo monoclonal de ratón (1:1000) (Pierce).

Inmunohistoquímica. La inmunohistoquímica se realizó en cortes cerebrales corticales fijados con paraformaldehído (PFA) al 4 % de 20 micrómetros de grosor. $A\beta_{1-42}$ se exploró con anticuerpo anti- $A\beta_{1-42}$ específico policlonal de conejo (Zymed) (1:200) que reconoce los a.a. 1-42, y anticuerpo monoclonal de ratón (4G8) (1:200) que reconoce los aminoácidos 17-24 (Covance), y se contratiño con DAPI. La parkina se inmunoexploró con anticuerpo anti-parkina de ratón (PRK8) (1:200), que reconoce los aminoácidos 399-465 (Signet Labs, Dedham, MA) y anticuerpo policlonal de conejo anti-parkina (AB5112) (1:200), que reconoce los aminoácidos 305-622 (Millipore), y se contratiño con DAPI. Se utilizó el anticuerpo monoclonal de ratón (6E10) (1:100) con DAB (Covance) y se llevó a cabo tioflavina-S de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Sigma).

Métodos estereológicos. Los métodos estereológicos los aplicó un investigador que no estaba familiarizado con el estudio mediante un análisis estereológico no sesgado (Stereologer, Systems Planning and Analysis, Chester, MD)

como se describe en (20,36).

ELISA. Se realizaron un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) de A β y p-Tau utilizando ELISA específicos de p-Tau, A β ₁₋₄₀ y A β ₁₋₄₂ y la actividad de caspasa 3 de acuerdo con el protocolo del fabricante.

5

Microscopía electrónica de transmisión. Se fijó tejido cerebral en solución de paraformaldehído-ácido pícrico al 4 % (1:4, v:v) y glutaraldehído al 25 % y se analizó por un investigador no familiarizado con el estudio, como se describe en (20,36).

10 **Cultivo y transfección celular.** Se cultivaron células de neuroblastoma humano M17 o B35 de rata en placas de 24 pocillos (Falcon). Se realizó una transfección transitoria con 3 μ g de ADNc de A β ₁₋₄₂, o 3 μ g de ADNc de LacZ durante 24 horas. Las células se trataron con Nilotinib 10 μ M durante 24 horas. Las células se recogieron 48 horas después de la transfección. Las células se recogieron una vez con tampón STEN y se centrifugaron a 10.000xg durante 20 min a 4 °C y se recolectó el sobrenadante.

15

ELISA de parkina. Se realizó ELISA en lisados cerebrales solubles (en tampón STEN) o lisados cerebrales insolubles (urea 4 M) de cerebro utilizando un kit de parkina específico de ratón (MYBioSource) en 50 μ l (1 μ g/ μ l) de lisados cerebrales detectados con 50 μ l de anticuerpo primario para parkina (3 h) y 100 μ l de anticuerpo anti-conejo (30 min) a TA. Los extractos se incubaron con cromógeno estabilizado durante 30 minutos a TA y la solución se detuvo y se leyó a 450 nm, de acuerdo con el protocolo del fabricante.

20

Actividad de ubiquitina ligasa E3 parkina. Para determinar la actividad de ligasa E3 parkina, se utilizó el kit E3LITE Customizable Ubiquitin Ligase Kit (Life Sensors, UC n.º 101), que mide los mecanismos de actividad de E1-E2-E3 en presencia de distintas cadenas de ubiquitina. Para medir la actividad de la parkina en presencia o ausencia de sustratos, se inmunoprecipitó la parkina (1:100) con anticuerpos PRK8. UbcH7 se usó como una E2 que proporciona la máxima actividad con la ligasa E3 parkina y se añadió E1 y E2 en presencia de ubiquitina recombinante, incluyendo el tipo silvestre o no mutante para lisina (K0), o K48 o K63 para determinar el tipo de ubiquitina enlazada en lisina. E3 se añadió como parkina IP a una microplaca de ELISA que captura las cadenas de poliubiquitina formadas en la reacción dependiente de E3, que se inició con ATP a temperatura ambiente durante 60 minutos. Controles incluidos, E1-E2-E3 y un control de cadena de poliubiquitina además de E1, E2 y A β ₁₋₄₂ sin parkina y tampón de ensayo para lectura de fondo. Las placas se lavaron 3 veces y se incubaron con estreptavidina-HRP durante 5 minutos y se leyeron en un lector de placas de quimioluminiscencia.

25

30

Ensayo de actividad del proteasoma 20S. Se incubaron 100 μ g de extractos cerebrales con 250 μ M del sustrato fluorescente específico de proteasoma 20S Succinil-LLVY-AMC a 37 °C durante 2 h. Se descartó el medio y se midió la actividad del proteasoma en los homogeneizados de tejido.

35

Laberinto acuático de Morris. Todos los animales se preentrenaron (intentos) para nadar durante 90 segundos en un laberinto de agua que contenía una plataforma sumergida en agua (invisible) durante 4 días consecutivos una vez al día. Los intentos de preentrenamiento "enseñan" a los animales nadadores que, para "escapar", deben encontrar la plataforma oculta y permanecer en ella. La "prueba" del laberinto de agua se realizó el día 5, (40), cuando se quitó la plataforma y los ratones tienen que nadar para encontrarla, evaluando así la adquisición y la retención. Todos los parámetros, incluyendo la distancia recorrida para alcanzar la plataforma, la velocidad para llegar a la plataforma, la latencia o el tiempo empleado sobre la plataforma, y la entrada en la plataforma, se registraron digitalmente en un ordenador y un investigador no familiarizado con el estudio los analizó.

40

45

Reconocimiento de objetos novedosos (RON). Los ratones se colocaron individualmente en una cámara de prueba de 22 x 32 x 30 cm durante un intervalo de habituación de 5 min y se devolvieron a sus jaulas de origen. Treinta minutos después, los ratones se colocaron en la cámara de prueba durante 10 minutos con dos objetos idénticos (sesión de adquisición), luego regresaron a sus jaulas de origen y 90 más tarde se colocaron nuevamente en la cámara de prueba en presencia de uno de los objetos originales y un objeto novedoso del mismo tamaño pero de distinto color y forma (sesión de reconocimiento). Las sesiones se grabaron en video. El tiempo empleado en explorar los objetos fue puntuado por un observador no familiarizado con el estudio. El índice de reconocimiento se calculó como (tiempo de exploración de uno de los objetos/tiempo de exploración de ambos objetos) x 100 para la sesión de adquisición, y (tiempo de exploración de un objeto nuevo/tiempo de exploración de objetos familiares y novedosos) x 100 para la sesión de reconocimiento. Los cálculos estadísticos para estimar las diferencias entre sesiones se realizaron con una prueba de la t por pares.

50

55

El Nilotinib activa la parkina e induce la eliminación autofágica de una manera dependiente de beclina 1. Para probar los efectos del Nilotinib sobre los mecanismos autofágicos, se transfectaron células de neuroblastoma M17 humanas o B35 de rata con 3 μ g de ADNc de A β ₁₋₄₂ humana (o LacZ) durante 24 horas, y luego se trataron estas células con varias concentraciones (1 nM, 100 nM, 1 μ M y 10 μ M) de Nilotinib durante 24 horas. No se detectó muerte celular (mediante MTT, bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) en las células con LacZ tratadas con DMSO o Nilotinib (Fig. 60A). Las células que expresaban A β ₁₋₄₂ tenían un nivel significativo de muerte celular (62 %, p<0,05, N=12), que se invirtió al 83 % del nivel del control por Nilotinib (Fig. 60A, N=12), lo que sugiere efectos

60

65

protectores del Nilotinib contra la toxicidad de A β ₁₋₄₂. Los niveles de parkina se midieron mediante ELISA usando extractos cerebrales de -/- para parkina como control de especificidad (Fig. 66A). Se observó un aumento no significativo (17 %) de parkina con Nilotinib 10 μ M, pero se alcanzó un aumento significativo (24 %, Fig. 78A, N=12, p<0,05) en los extractos tratados con A β ₁₋₄₂+Nilotinib, lo que sugiere que al parkina aumenta en respuesta al estrés por A β ₁₋₄₂. Para determinar si el aumento de parkina está asociado con la actividad de proteasoma, se usó el ensayo de tipo quimotripsina con el inhibidor del proteasoma 20S lactacistina como control de especificidad (Fig. 60B). El Nilotinib no afectó a la actividad del proteasoma en células con LacZ (Fig. 60B). La actividad del proteasoma aumentó (43 %, p<0,05, N=12) en las células con A β ₁₋₄₂, un efecto que se invirtió mediante el tratamiento con Nilotinib. Se midieron los niveles de A β ₁₋₄₂ soluble (tampón STEN), insoluble (ácido fórmico al 30 %) y en medio de cultivo celular tras el tratamiento con Nilotinib. El nivel de A β ₁₋₄₂ secretada fue (6 veces) mayor que las células con LacZ; y el Nilotinib disminuyó esto en el 24 % (Fig. 60C, p<0,05, N=12). El Nilotinib invirtió por completo el aumento de 2 veces de A β ₁₋₄₂ soluble y de 3,5 veces de la insoluble.

La parkina lentivírica inyectada en ratones con EA aumenta los niveles de beclina 1 y la eliminación autofágica de A β . El bloqueo de la expresión de beclina 1 usando ARNhc (Fig. 60D, transferencia de la parte superior) dio como resultado un aumento significativo (Fig. 60D, 28 %, N=12) de la parkina inducida por Nilotinib. Los niveles de A β ₁₋₄₂ no se vieron afectados en los medios con el tratamiento con Nilotinib en comparación con las células que expresaban A β ₁₋₄₂, y fueron significativamente más altos que A β ₁₋₄₂ +Nilotinib (Fig. 60C). A β ₁₋₄₂ soluble e insoluble disminuyeron parcialmente (42 % y 21 %, respectivamente) en comparación con las células transfectadas con A β ₁₋₄₂, pero permanecieron 2 veces más altos en comparación con A β ₁₋₄₂ +Nilotinib (Fig. 60C, p<0,05, N=12), lo que indica que se precisa beclina 1 para completar la eliminación de A β ₁₋₄₂. A β ₁₋₄₂ secretada (medio) puede haberse acumulado en las primeras 24 horas después de la transfección, antes del tratamiento con Nilotinib. Para verificar si la autofagia está implicada en la eliminación de A β ₁₋₄₂, se examinaron los niveles de LC3 (proteína de cadena ligera 3) (Fig. 60D) y se detectó LC3-II con expresión de A β ₁₋₄₂ sola, o con ARNhc de beclina 1+Nilotinib (N=12), lo que indica la formación de autofagosomas, pero LC3-II desapareció por completo con Nilotinib, lo que sugiere eliminación autofágica (Fig. 60D). Para determinar los efectos de Nilotinib sobre la función de la parkina, se inmunoprecipitó parkina (E3) y se añadió E1, E2 (UbcH7) y ubiquitina de tipo silvestre que contenía las siete lisinas o la ubiquitina mutante sin lisina (K0). El Nilotinib (24 horas) aumentó significativamente la autopoliubiquitinación de parkina en comparación con DMSO y los controles de especificidad (Fig. 60E, 170 %, N=5, P<0,05), incluyendo E1-E2-E3 recombinante (positivo) o K0 (negativo) (Fig. 60E), lo que sugiere que el Nilotinib aumenta la actividad de la ubiquitina ligasa E3 parkina.

Nilotinib cruza la barrera hematoencefálica. Para determinar si Nilotinib cruza la barrera hematoencefálica, se inyectaron por vía intraperitoneal (i.p.) a ratones C57BL/6 de 2 meses de edad, Nilotinib 10 mg/kg, 20 mg/kg o 50 mg/kg (30 μ l en DMSO) y los animales se sacrificaron 4-6 horas después de la inyección. El análisis de espectroscopia de masas de los lisados cerebrales totales mostró hasta 30 ng/ml de Nilotinib en el cerebro con 10 mg/kg. El tratamiento con Nilotinib (N=35) diariamente durante 9 días consecutivos disminuyó significativamente (44 %) los niveles totales de c-Abl y T412 (50 %), lo que sugiere la inhibición de c-Abl. Este tratamiento con Nilotinib 10 mg/kg disminuyó la fosforilación de pantirosinas, aumentó (29 %, p<0,05, N=35) la parkina y disminuyó la mancha de proteínas ubiquitinadas.

Para determinar los efectos de Nilotinib sobre la muerte neuronal, se inyectó estereotácticamente A β ₁₋₄₂ lentivírica a una m.i. de 1x10⁶ de forma bilateral en el hipocampo de ratones C57BL/6 (tipo silvestre) o -/- para parkina de 1 año de edad y 3 semanas más tarde se inyectaron 10 mg/kg una vez al día durante 3 semanas adicionales. No se observaron diferencias en la activación de caspasa 3 entre los ratones de tipo silvestre tratados con DMSO y con Nilotinib (Fig. 60F, N=64); sin embargo, se observó un aumento significativo (165 %) de la activación de la caspasa 3 en ratones con A β ₁₋₄₂ lentivírica de la misma edad (Fig. 60F, p<0,05, N=35), mientras que el Nilotinib invirtió significativamente (45 % por encima del control) los efectos de A β ₁₋₄₂. De manera similar, no se observaron diferencias en la activación de la caspasa 3 entre los ratones -/- para parkina tratados con Nilotinib y DMSO (Fig. 60F, N=16), pero se observó un aumento significativo en los ratones con A β ₁₋₄₂ lentivírica con (165 %) o sin (180 %) Nilotinib (P<0,05, N=19), lo que sugiere que el Nilotinib depende de la parkina para proteger frente a A β ₁₋₄₂.

La eliminación por Nilotinib del amiloide cerebral se asocia con la activación de la parkina. Para determinar si el Nilotinib afecta el nivel de A β *in vivo*, ratones transgénicos con EA de 8-12 meses de edad que expresan el gen APP humano procedente de neuronas, isoforma 770, que contiene las mutaciones las mutaciones K670N/M671L sueca, E693Q holandesa y D694N de Iowa (Tg-APP) bajo el control del promotor del antígeno de timocitos de ratón 1, theta, Thy1, se trataron (inyección i.p. de 10 mg/kg) durante 3 semanas. Estos ratones expresaron niveles significativamente más altos de A β ₁₋₄₂ soluble (156 ng/ml) e insoluble (173 ng/ml) en comparación con el control de 1 año de edad con y sin Nilotinib (Fig. 61A, p<0,05, N=9) mientras que el Nilotinib redujo en gran medida a A β ₁₋₄₂ soluble (35 ng/ml, lo que permaneció significativamente más alto que el control) e invirtió el aumento de A β ₁₋₄₂ insoluble. También se detectaron aumentos significativos de A β ₁₋₄₀ soluble (281 ng/ml) e insoluble (250 ng/ml) en ratones Tg-APP en comparación con el control de 1 año de edad (Fig. 61B, p<0,05, N=9), y se invirtieron mediante Nilotinib. p-Tau también aumentó en ser 396 (109 ng/ml) y AT8 (288 ng/ml) en comparación con el control de 1 año de edad (Fig. 61C, p<0,05, N=9). Nilotinib redujo significativamente pero no invirtió por completo estos aumentos.

Nilotinib anula la alteración de la solubilidad de la parkina en ratones con EA. Para determinar si el nivel de

parkina se ve afectado en los modelos de EA, se midió el nivel de parkina en ratones Tg-APP tanto en la fracción soluble (STEN) como en la insoluble (urea 4 M). Se usaron lisados cerebrales de ratones *-/-* para parkina como controles de especificidad. No se detectaron cambios en la parkina soluble o insoluble en los ratones de control con y sin Nilotinib (Fig. 61D, N=9). Sin embargo, el Nilotinib aumentó significativamente el nivel de parkina soluble de 64 ng/ml en Tg-APP+DMSO a 119 ng/ml (Fig. 61D, N=11, $p<0,05$), mientras que disminuyó significativamente el nivel de parkina insoluble de 54 ng/ml a 31 ng/ml en los ratones tratados con Nilotinib (Fig. 61D, $p<0,05$, N=11). Estos datos sugieren niveles aumentados de parkina insoluble en los Tg-APP. La transferencia de Western reveló niveles aumentados de c-Abl total (51 %) y T412 (64 %) en los Tg-APP en comparación con el control (Fig. 61E, $p<0,05$, N=11), mientras que el Nilotinib volvió a invertir estos aumentos (Fig. 61E, $p<0,05$, N=11). La inhibición de c-Abl con Nilotinib redujo el nivel de los CTF (44 %, $p<0,05$, N=11) con respecto a MAP-2.

La activación de c-Abl se asocia con un nivel disminuido de parkina en la corteza de EA cadavérica. Se examinó si c-Abl está alterada en la corteza de EA cadavérica humana (EA N=12 y 7 de control). Se detectaron niveles significativamente aumentados (90 %) de c-Abl total (Fig. 61F) y T412 (184 %) en cerebros de EA (Fig. 61F). La relación de p-cAbl respecto al total de c-Abl (Fig. 61G) también aumentó (102 %). Por lo contrario, la parkina se redujo (70 %) en la corteza de EA (Fig. 61F y G) en comparación con la actina. La insolubilidad de la parkina puede estar asociada con la pérdida de la función de la ligasa E3, por lo que se determinó si la parkina endógena puede participar en la eliminación de $A\beta_{1-42}$. Se observaron aumentos significativos ($p<0,05$, N=12) de $A\beta_{1-42}$ soluble (180 ng/ml) e insoluble (209 ng/ml) en ratones con $A\beta_{1-42}$ lentivírica de tipo silvestre (Fig. 61H), pero el Nilotinib invirtió completamente a $A\beta_{1-42}$ de vuelta al nivel de control. $A\beta_{1-42}$ lentivírica en ratones *-/-* para parkina (Fig. 61H) aumentó significativamente a $A\beta_{1-42}$ soluble (241 ng/ml) e insoluble (246 ng/ml) en comparación con $A\beta_{1-42}$ lentivírica en ratones de tipo silvestre (N=12). De manera interesante, el Nilotinib no logró eliminar a $A\beta_{1-42}$ soluble (297 ng/ml) e insoluble (274 mg/ml) en ratones *-/-* para parkina, lo que sugiere que se precisa parkina endógena para la eliminación de $A\beta_{1-42}$. De manera similar, el Nilotinib disminuyó p-Tau ser 396 (Fig. 61I) en ratones de tipo silvestre (68 ng/ml) en comparación con la expresión de $A\beta_{1-42}$ (124 ng/ml) mientras que p-Tau aumentó (264 ng/ml) en ratones *-/-* para parkina y el Nilotinib no redujo el nivel de p-Tau (189 ng/ml) (Fig. 61I, $p<0,05$, N=11).

Nilotinib estimula la eliminación autofágica de amiloide de una manera dependiente de parkina. La transferencia de Western (TW) de lisados cerebrales totales en ratones de tipo silvestre de 1 año de edad a los que se les inyectó $A\beta_{1-42}$ lentivírica mostró una disminución significativa de c-Abl total (55 %) y T412 (45 %) después del tratamiento con Nilotinib 10 mg/kg diariamente durante 3 semanas (Fig. 62A, $p<0,05$, N=9). Se observó una disminución significativa (38 %) de LC3-B y la desaparición de LC3-11 (lo que indica acumulación de autofagosomas) en ratones tratados con Nilotinib en comparación con DMSO (Fig. 62A, $p<0,05$, N=9). No se detectaron cambios en el marcador neuronal MAP-2 (control de carga). Un aumento significativo del nivel de parkina (62 %) se asoció con un aumento similar en beclina 1 (53 %) y otros marcadores moleculares de autofagia, incluyendo Atg5 (34 %) y Atg12 (41 %) con respecto a la tubulina (Fig. 62B, $p<0,05$, N=9), compatible con la hipótesis de que la inhibición de c-Abl puede participar en la eliminación autofágica a través de la actividad aumentada de la parkina. El tratamiento con Nilotinib de ratones con $A\beta_{1-42}$ también aumentó la parkina, disminuyó los marcadores autofágicos LC3-B y LC3-11 (Fig. 62C, $p<0,05$, N=12) y aumentó beclina 1 (53 %) y Atg5 (62 %) en comparación con DMSO ($p<0,05$). La Tau total no se vio afectada en ratones Tg-APP entre los grupos de DMSO y Nilotinib (Fig. 62D, N=12). Se observó una disminución significativa de AT8 (71 %), AT180 (34 %) y Ser 396 (64 %) sin cambios en p-Tau Ser 262 en comparación con actina (Fig. 62D, $P<0,05$) en los ratones $A\beta_{1-42}$ tratados con Nilotinib.

Los efectos del Nilotinib también se examinaron en ratones de tipo silvestre y *-/-* para parkina tratados con $A\beta_{1-42}$ lentivírica (Fig. 62E y F). De manera interesante, los ratones *-/-* para parkina tenían niveles significativamente más altos de marcadores autofágicos, incluyendo beclina 1 (Fig. 62E, 120 %, N=9) en comparación con el control. El Nilotinib no eliminó LC3-11 en ratones *-/-* para parkina y no se observaron diferencias en LC3-A entre los ratones *-/-* para parkina y los de control (Fig. 62E). Se observaron aumentos significativos de Atg12 (Fig. 62F, 64 %) y Atg5 (Fig. 62F, 74 %) en *-/-* para parkina en comparación con el control y los niveles de estos marcadores tampoco cambiaron en respuesta al Nilotinib. Estos datos indican que, a pesar del aumento compensatorio de los marcadores autofágicos, el Nilotinib no puede eliminar autofagosomas en ratones *-/-* para parkina, lo que sugiere además que la parkina es esencial para la maduración de los autofagosomas.

El Nilotinib aumenta el nivel de parkina y disminuye la carga de placas en ratones Tg-APP. La tinción de cortes cerebrales de 20 μ m muestra la formación de placas dentro de diversas regiones cerebrales en ratones Tg-APP tratados con DMSO (Fig. 63A-D, que representa distintos animales), aunque la tinción de las placas desapareció en el grupo de Nilotinib después de 3 semanas de tratamiento (Fig. 63E-H). Estos resultados se confirmaron mediante tinción con tioflavina-S (Fig. 67). A mayor aumento se muestra la parkina endógena asociada con los Tg-APP (Fig. 63I) y el depósito de placas (Fig. 63I y K) en el hipocampo. El Nilotinib aumenta la parkina endógena (Fig. 63L) y da como resultado la desaparición de las placas (Fig. 63M y N). Usando distintos anticuerpos para parkina para mostrar la parkina (Fig. 63O) y la placa (Fig. 63P y Q), el Nilotinib aumentó los niveles de parkina (Fig. 63R) y disolvió las placas (Fig. 63S y T). Para determinar si la parkina se dirige a $A\beta$ intracelular para disminuir la carga de placas extracelulares, se usó inyección lentivírica para mostrar a $A\beta_{1-42}$ intracelular dentro del hipocampo (Fig. 63U, el recuadro de detalle es un mayor aumento) y la eliminación por Nilotinib de $A\beta_{1-42}$ intracelular (Fig. 63V, el recuadro de detalle es mayor aumento). La inyección lentivírica en el hipocampo condujo a la expresión de $A\beta_{1-42}$ intracelular en toda la corteza (Fig.

63W, el recuadro de detalle es un mayor aumento) y, de nuevo, el Nilotinib eliminó la acumulación de $A\beta_{1-42}$ (Fig. 63X, el recuadro de detalle es un mayor aumento). Las imágenes de menor aumento muestran la formación de placas en ratones que expresan $A\beta_{1-42}$ 6 semanas posinyección (Fig. 64A-C). El Nilotinib (diariamente durante 3 semanas) elimina la formación de placas en los ratones de tipo silvestre con $A\beta_{1-42}$ (Fig. 64D-F). La expresión de $A\beta_{1-42}$ en ratones $-/-$ para parkina mostró más formación de placas (Fig. 64G-I) y el Nilotinib no redujo la carga de placas en estos ratones (Fig. 64J-L). La cuantificación del tamaño de placas usando Imagen J para delinear los límites alrededor de las placas individuales (N=15-25 placas, 2 placas por animal) (Fig. 68A-D) mostró un tamaño de placa promedio de alrededor de 48 μm (Fig. 68A e I, N=12) en ratones de tipo silvestre con $A\beta_{1-42}$, mientras que el Nilotinib redujo el tamaño de placas a 5 μm (Fig. 68B e I, $p < 0,05$,). Por lo contrario, el tamaño de placas fue mayor en los ratones $-/-$ para parkina (Fig. 68C e I, 85 μm , N=6) y el Nilotinib no redujo el tamaño de placas (Fig. 68D y I, 79 μm). El recuento estereológico de células positivas para $A\beta_{1-42}$ mostró una tinción significativamente reducida (N=5200 células) en los ratones tratados con Nilotinib (Fig. 68F y J) en comparación con los ratones de tipo silvestre que expresan $A\beta_{1-42}$ tratados con DMSO (Fig. 68E y J, $p < 0,05$). Sin embargo, los ratones $-/-$ para parkina tenían significativamente menos células positivas para $A\beta_{1-42}$ (Fig. 68G y J, N=14566) y el Nilotinib no alteró la tinción intracelular (Fig. 68H y J, N=13250), lo que plantea la posibilidad de que la parkina endógena pueda modificar a $A\beta_{1-42}$ intracelular, conduciendo a la degradación intraneuronal, limitando así su secreción.

La parkina participa en la ubiquitinación enlazada en K63 de $A\beta_{1-42}$. Para determinar si la parkina participa en algún enlace específico a poliubiquitina de $A\beta_{1-42}$ que facilite su degradación, se inmunoprecipitó parkina y se utilizó $A\beta_{1-42}$ sintética como sustrato. Se usó un cóctel de E1-E2-E3 recombinante y cadenas de poliubiquitina como controles positivos (Fig. 68K). No se detectó actividad con ubiquitina nula para lisina (K0), y la actividad de parkina no se alteró significativamente con el mutante de ubiquitina de K48. Sin embargo, las señales de poliubiquitina aumentaron significativamente (89 %) en presencia de $A\beta_{1-42}$ en comparación con parkina sola (Fig. 68K, $p < 0,05$, N=6) con ubiquitina K63, lo que sugiere que la parkina estimula la poliubiquitinación enlazada en K63 de $A\beta_{1-42}$. Las señales de poliubiquitina también fueron significativamente más altas con la ubiquitina de tipo silvestre en presencia de $A\beta_{1-42}$ (43 %).

Deterioro de la eliminación autofágica en ausencia de parkina. La microscopía electrónica de transmisión reveló (N=6 animales por tratamiento) defectos autofágicos en los ratones que expresaban $A\beta_{1-42}$ lentivírica, lo que se manifiesta en la aparición de neuronas distróficas en el hipocampo (Fig. 64M), la acumulación de vacuolas no digeridas en la corteza (Fig. 64N) y el agrandamiento de los lisosomas del hipocampo (Fig. 64O), lo que sugiere deficiencias en la degradación proteolítica. El Nilotinib invirtió estos efectos en el hipocampo (Fig. 64P y R), donde no se detectaron neuronas distróficas ni agrandamiento lisosómico, y contribuyó a la eliminación cortical de las vacuolas (Fig. 64Q). Por lo contrario, el Nilotinib no logró eliminar las neuronas distróficas en el hipocampo de los ratones $-/-$ para parkina (Fig. 64S y V) y no pudo eliminar las vacuolas en la corteza y el hipocampo (Fig. 64T-X).

El Nilotinib mejora el rendimiento cognitivo de forma dependiente de parkina. La prueba del laberinto acuático de Morris se realizó después de 4 días de ensayos de entrenamiento en los que la plataforma se colocó en la esquina SE y los ratones se colocaron inicialmente en la esquina NO del depósito. Los ratones a los que se le inyectó $A\beta_{1-42}$ (+DMSO) emplearon más tiempo (24 %) en el cuadrante NO en comparación con el control (LacZ +Nilo) (Fig. 65A, N=14), mientras que Nilotinib invirtió el tiempo (en segundos) pasado en el NO de nuevo al nivel observado en los ratones de control. Los ratones $A\beta_{1-42}$ $-/-$ para parkina (N=7) con y sin Nilotinib permanecieron significativamente más en el cuadrante NO (Fig. 65A). Los de tipo silvestre y $-/-$ para parkina que expresaban $A\beta_{1-42}$ emplearon significativamente menos tiempo en el SE (Fig. 65A, 47 %, $p < 0,05$) en comparación con el control, pero el Nilotinib mejoró significativamente el tiempo pasado en el SE en el tipo silvestre pero no en los $-/-$ para parkina en comparación con el control (26 %) y DMSO (61 %). Un gráfico cromático para cada grupo mostró que los controles aprendieron rápidamente a encontrar el área de la plataforma (SE), y los animales con $A\beta_{1-42}$ (DMSO) emplearon más tiempo deambulando, mientras que con Nilotinib mejoró la búsqueda de la plataforma. Por lo contrario, los $-/-$ para parkina \pm Nilotinib vagaron sin rumbo fijo en el laberinto. Los animales con $A\beta_{1-42}$ ingresaron el SE (entrada en la plataforma, barras claras) menos (Fig. 77B, 37 %) que el control, pero el Nilotinib invirtió el número de entradas de nuevo al control, mientras que los $-/-$ para parkina entraron significativamente menos (34%, $P < 0,05$, N=7), lo que sugiere que el Nilotinib potenció la memoria de manera dependiente de parkina. Sin embargo, la distancia recorrida (Fig. 77B, barras traseras) por los de $-/-$ para parkina con $A\beta_{1-42}$ \pm Nilotinib disminuyó significativamente (80 % y 75 %, respectivamente) en comparación con el control y el tipo silvestre ($P < 0,05$).

Estos experimentos se repitieron en ratones Tg-APP de 1 año y el control de la misma edad (C57BL/6). Los ratones Tg-APP (+DMSO) permanecieron menos (24 %) en el NO (Fig. 77C, 28 %, N=12) y emplearon significativamente menos tiempo en el SE (Fig. 77C, 28 %, $p < 0,05$). El tratamiento con Nilotinib (10 mg/kg diariamente durante 3 semanas) invirtió significativamente el tiempo empleado en el SE de regreso al nivel de control. Un gráfico cromático para cada grupo muestra que los Tg-APP encontró mejor la plataforma con Nilotinib (Fig. 77C) y que los Tg-APP+Nilotinib entró en el SE (entrada a la plataforma, barras blancas) significativamente más veces que los ratones de control (Fig. 77D, 30 % mayor que el control), mientras que los Tg-APP+DMSO lo hicieron significativamente peor que el control (Fig. 77D, 25 %). La distancia recorrida (Fig. 77D, barras negras) también se redujo significativamente en DMSO (86 %) en comparación con los ratones Tg-APP tratados con Nilotinib, que tenían valores un 30 % por encima de los niveles de control (Fig. 77D, $P < 0,05$, N=12). También se probó el reconocimiento de objetos nuevos y

se demostró que los Tg-APP+Nilotinib se desempeñaron significativamente mejor en la búsqueda de nuevos objetos (Fig. 77E, 31 %, $p < 0,001$, $N=17$) que los ratones con DMSO, mientras que los ratones -/- para parkina con $A\beta_{1-42}$ no aprendieron con ni sin Nilotinib (Fig. 77E, $N=5$).

5 Ejemplo 6

Estos estudios demuestran que la parkina ubiquitina a TDP-43 y facilita su acumulación citosólica a través de un complejo multiproteico con HDAC6.

10 Procedimientos experimentales.

Inyección estereotáctica- Se realizó cirugía estereotáctica para inyectar las construcciones lentivíricas (Lv) que codifican LacZ, parkina y/o TDP-43 en la corteza motora primaria de ratas Sprague-Dawley macho de dos meses de edad que pesaban entre 170-220 g. A los animales se les inyectó en el lado izquierdo de la corteza motora una m.i. de 2×10^9 de Lv-LacZ y en el lado derecho una m.i. de 1×10^9 de Lv-parkina + una m.i. de 1×10^9 de Lv-LacZ; o una m.i. de 1×10^9 Lv-TDP-43 + una m.i. de 1×10^9 de Lv-LacZ; o una m.i. de 1×10^9 de Lv-parkina + una m.i. de 1×10^9 de Lv-TDP-43. Todos los animales se sacrificaron dos semanas posinyección y se comparó la corteza izquierda con la corteza derecha. Se utilizó un total de 8 animales de cada tratamiento (32 animales) para la TW, ELISA e inmunoprecipitación, y 8 animales de cada tratamiento (32 animales) para inmunohistoquímica. Se utilizó un total de 20 $N=64$ animales. Se usaron ratones hemicígoticos transgénicos que portaban la TDP-43 humana con la mutación A315T bajo el control de un promotor priónico y controles de ratones C57BL/6J. La colonia se obtuvo de Jackson Laboratory Repository (JAX N.º de reserva 010700) y presentó una vida útil considerablemente más corta que los informes anteriores, con casi el 90 % de todas las crías, incluyendo machos y hembras, manifestando síntomas motores alrededor de los 21-30 días. Se criaron ratones hemicígoticos a través del apareamiento de hemicígotos con 25 C57BL/6 de tipo silvestre no portador, y después del genotipado, la mitad se identificaron como transgénicos y la otra mitad era un control no transgénico. Todos los ratones utilizados son de la generación F1 del apareamiento directo entre ratones hemicígoticos y C57BL/6. Estos estudios fueron aprobados y realizados de acuerdo con el Comité de Uso y Cuidado de Animales de la Universidad de Georgetown (GUACAC).

30 *Cultivo y transfección celular*. Se cultivaron células M17 de neuroblastoma humanas (densidad de siembra de 2×10^5 células) en placas de 24 pocillos (Falcon) hasta una confluencia del 70 % en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM; Invitrogen) más el 10 % (v/v) de suero fetal bovino inactivado por calor (Invitrogen), penicilina/estreptomicina y L-glutamina 2 mM a 37 °C y CO₂ al 5 %, se lavó dos veces en solución salina tamponada con fosfato (PBS). La transfección transitoria se realizó con 3 µg de ADNc de parkina o 3 µg de ADNc de TDP-43 o 3 µg de ADNc de LacZ. 35 Las células se trataron con tubacina 5 µM durante 24 horas y se tiñeron con DAPI en placas de 12 pocillos. Las células se recogieron 24 horas después de la transfección. La transfección se realizó en DMEM sin suero utilizando Lipofectamine 2000 (Invitrogen) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Las células se recogieron de una vez con tampón de lisis (Tris 20 mM (pH 7,5), NaCl 150 mM, ácido etilendiaminotetraacético 1 mM, ácido etilenglicoltetraacético (EGTA) 1 mM, Triton X-100 al 1 %, pirofosfato de sodio 2,5 mM, β-glicerofosfato 1 mM, ortovanadato de sodio 1 mM, leupeptina 1 µg/ml y PMSF 0,1 mM) y se centrifugó a 10.000xg durante 20 min a 4 °C, y se recogió el sobrenadante. La transferencia de Western se realizó en un gel NuPAGE Bis-Tris al 4-12 % (Invitrogen). La estimación de las proteínas se realizó utilizando el ensayo de proteínas BioRad a microescala (BioRad Laboratories Inc, Hercules, CA, EE. UU.).

45 *Análisis de transferencia de Western*- La corteza se disecó y se homogeneizó en tampón STEN 1x (Tris 50 mM (pH 7,6), NaCl 150 mM, EDTA 2 mM, NP-40 al 0,2 %, BSA al 0,2 %, PMSF 20 mM y cóctel inhibidor de proteasas). A continuación, el sedimento se resuspendió en urea 4 M y se homogeneizó y centrifugó a 5.000 g y se recolectó el sobrenadante que contenía la fracción de proteínas insolubles. La TDP-43 total se analizó con un anticuerpo monoclonal de ratón (2E2-D3) (1:1000) generado contra los 261 aminoácidos aminoterminales de la proteína de longitud completa (Abnova) o con un anticuerpo policlonal de conejo (ELA10) (1:1000) (ProteinTech, n.º de cat. 10782-2-AP). Para la TW se usó anticuerpo policlonal de conejo anti-ubiquitina (Chemicon International) (1:1000) y se usó un anticuerpo de conejo anti-parkina (Millipore) (1:1000). Se utilizó un policlonal de conejo anti-actina (Thermo Scientific) (1:1000). Se utilizó un policlonal de conejo anti-SQSTM1/p62 (Cell Signaling Technology) (1:500). Se utilizó el monoclonal de conejo HDAC6 (Cell Signaling Technology) (1:1000). SIAH2 se exploró con un anticuerpo monoclonal de ratón (Novus Biologicals) (1:400) y HIF-1α con anticuerpo monoclonal de ratón (Novus Biologicals) (1:1000). La inmunoprecipitación se realizó en un total de 100 mg de proteína con anticuerpo policlonal de conejo para TDP-43 55 (ProteinTech) (1:100) o anticuerpo monoclonal de conejo para parkina (Invitrogen) (1:100) y luego se comparó con las muestras de entrada. Las transferencias de Western se cuantificaron por densitometría usando el programa informático Quantity One 4.6.3 (Bio Rad). La densitometría se obtuvo como números arbitrarios que miden la intensidad de la banda. Los datos se analizaron como $media \pm desv. típica$, usando ANOVA, con comparación múltiple de Neumann Keuls entre grupos de tratamiento. 60

Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) para parkina- se realizó en lisados cerebrales solubles (en tampón STEN) o lisados cerebrales insolubles (urea 4 M) de cerebro utilizando un kit de parkina específico de ratón 65 (MYBioSource) en 50 µl (1 µg/µl) de lisados cerebrales detectados con 50 µl de anticuerpo primario (3 h) y 100 µl de

anticuerpo anti-conejo (30 min) a TA. Los extractos se incubaron con cromógeno estabilizado durante 30 minutos a TA y la solución se detuvo y se leyó a 450 nm, de acuerdo con el protocolo del fabricante.

Actividad de ubiquitina ligasa E3 parkina. Para determinar la actividad de la ligasa E3 parkina se usó el kit E3LITE Customizable Ubiquitin Ligase Kit (Life Sensors, UC n.º 101), que mide los mecanismos de la actividad de E1-E2-E3 en presencia de distintas cadenas de ubiquitina. Para medir la actividad de la parkina en presencia o ausencia de sustratos, se inmunoprecipitó la parkina con anticuerpos PRK8 (1:100) y la TDP-43 se inmunoprecipitó con anti TDP-43 humana (Ab-nova) (1:100) a partir de 100 mg de lisados cerebrales de TDP43-Tg. UbcH7 se usó como una E2 que proporciona la máxima actividad con la ligasa E3 parkina y se añadió E1 y E2 en presencia de ubiquitina recombinante, incluyendo el tipo silvestre que contiene las siete lisinas superficiales posibles, la mutante sin lisina (K0), o K48 o K63 para determinar el tipo de ubiquitina unida a lisina. Se añadió E3 como parkina IP o parkina recombinante (Novus Biologicals) a una microplaca de ELISA que captura cadenas de poliubiquitina formadas en la reacción dependiente de E3, que se inició con ATP a temperatura ambiente durante 60 minutos. También se incluyeron un E1-E2-E3 y un control de cadena de poliubiquitina además de E1, E2 y TDP-43 sin parkina y tampón de ensayo para lectura de fondo. Las placas se lavaron 3 veces y se incubaron con reactivo de detección y estreptavidina-HRP durante 5 minutos y se leyeron las cadenas de poliubiquitina generadas por la maquinaria E1-E2-E3 en un lector de placas de quimioluminiscencia.

Ensayo de inmunoprecipitación y ubiquitinación. TDP-43 o parkina se inmunoprecipitaron por separado en 100 µl (100 µg de proteínas) de tampón STEN 1x usando anticuerpo monoclonal anti-TDP-43 específico humano (Abnova) (1:100) o anticuerpo monoclonal de ratón anti-parkina (PRK8; Signet Labs; Dedham, MA) (1:100), respectivamente. Después de la inmunoprecipitación, se mezclaron 300 ng de cada proteína sustrato (parkina y TDP-43) en presencia de 1 µg de ubiquitina humana recombinante (Boston Biochem, MA), ATP 100 mM, 1 µg de UbcH7 recombinante (Boston Biochem), 40 ng de enzima recombinante E1 (Boston Biochem) y se incubó a 37 °C en una incubadora durante 20 min. La reacción se inactivó con calor hirviéndola durante 5 min y los sustratos se analizaron mediante transferencia de Western.

Inmunohistología- La inmunohistoquímica se realizó en cortes de 20 µm de grosor de cerebro o de médula espinal cervical. Se exploró TDP-43 (1:200) con anticuerpo policlonal de conejo (ELA10) (ProteinTech, n.º de cat. 10782-2-AP). Para la inmunohistoquímica se usó anticuerpo policlonal de conejo anti-ubiquitina (Chemicon International) (1:100) y se usó anticuerpo monoclonal de ratón anti-parkina (Millipore) (1:200). La tinción con azul de toluidina y DAPI se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Sigma). Un investigador no familiarizado con el estudio realizó el recuento de la tinción con azul de toluidina de los axones céntricos dentro de 10 campos aleatorios de cada portaobjetos en N=8 animales de cada tratamiento. Un investigador no familiarizado con los tratamientos puntuó los experimentos de tinción.

Ensayo de actividad del proteasoma 20S- Se incubaron 100 µg de extractos cerebrales con 250 µM del sustrato fluorescente específico de proteasoma 20S Succinil-LLVY-AMC a 37 °C durante 2 h. El medio se descartó y los homogeneizados se lisaron en HEPES 50 mM, pH 7,5, EDTA 5 mM, NaCl 150 mM y Triton X-100 al 1 %, conteniendo ATP 2 mM. El fluoróforo 7-amino-4-metilcumarina (AMC), que se libera después de la escisión del sustrato marcado Succinil-LLVY-AMC (Chemicon International, Inc.), se detecta, y se cuantifica la fluorescencia de AMC libre usando un juego de filtros de 380/460 nm en un fluorómetro (absorción a 351 nm y emisión a 430 nm). La reactividad secundaria no proteasómica se midió añadiendo lactacistina como inhibidor específico de proteasoma a la mezcla de reacción y restando estos valores del total para obtener una medida precisa de la actividad de proteasoma específica.

qRT-PCR en tejidos neuronales. Se realizó qRT-PCR en un sistema Real-time PCR system (Applied Biosystems) con mezcla maestra Fast SYBR-Green PCR master Mix (Applied Biosystems) por triplicado a partir de ADNc transcrito de forma inversa a partir del control no inyectado o de tejidos cerebrales de corteza de rata a los que se les inyectó LacZ, parkina, TDP-43 y TDP-43+parkina. Estos experimentos se repitieron en células M17 de neuroblastoma humanas y los A315T-Tg se compararon con los C57BL/6 no transgénicos de control. Se usaron el cebador directo para parkina de tipo silvestre humana CCA TGA TAG TGT TTG TCA GGT TC y un cebador inverso GTT GTA CTT TCT CTT CTG CGT AGT GT. Los valores de expresión génica se normalizaron utilizando los niveles de GADPH.

Resultados

TDP-43 inhibe la actividad del proteasoma y altera los niveles de proteína parkina. Para determinar los efectos de TDP-43 sobre la parkina en animales transgénicos, se utilizaron los ratones transgénicos con TDP-43 mutante A315T (TDP43-Tg), de los que se informó que tienen agregados de proteínas ubiquitinadas en las neuronas piramidales de la capa 5 de la corteza frontal, así como en las neuronas motoras medulares, sin TDP-43 citoplasmática. Este modelo es importante para estos estudios porque muestra una patología impulsada por TDP-43 nuclear, independiente de las inclusiones citoplasmáticas de TDP-43. El análisis de transferencia de Western mostró la acumulación de fragmentos de TDP-43 y de longitud completa (~ 35 kDa), así como especies de peso molecular más alto con el anticuerpo para TDP-43 de ser humano (Fig. 69A, 1ª transferencia) en comparación con los controles no transgénicos, sugiriendo una patología por TDP-43. Un análisis adicional del lisado cerebral soluble (extracto de STEN) mostró niveles aumentados de parkina por transferencia de Western (Fig. 69A, 2ª transferencia, 82 %, P<0,05, N=8)

y aparición de una banda de menor peso molecular, tal vez indicando la escisión de parkina. También se observaron niveles aumentados de manchas de ubiquitina (Fig. 69A, 3ª transferencia) usando anticuerpos anti-ubiquitina, lo que sugiere acumulación de proteínas ubiquitinadas. Se determinó si la solubilidad de la parkina estaba alterada en ratones TDP43-Tg. El sedimento de proteínas se resuspendió después de la extracción con STEN en urea 4 M para detectar la fracción insoluble y los inventores detectaron un aumento significativo (Fig. 69B, 95 % por densitometría, $P < 0,05$, $N=8$) de parkina insoluble en ratones TDP43-Tg de 1 mes de edad en comparación con el control (Fig. 69B y C, $P < 0,05$, $N=8$), lo que sugiere que los agregados de TDP-43 están asociados con una solubilidad de parkina alterada. La relación de parkina soluble respecto a la insoluble no cambió significativamente (Fig. 69C, $P < 0,05$), lo que sugiere que la acumulación de TDP-43 aumenta los niveles de parkina soluble e insoluble. También se realizó una exploración de TDP-43 en extractos de urea 4 M y se detectaron niveles aumentados de TDP-43 insoluble (Fig. 69B, 2ª transferencia) en TDP43-Tg en comparación con el control. Para verificar los cambios en el nivel de parkina observados por TW, se realizó un ELISA cuantitativo de parkina para determinar los niveles de parkina soluble (extracto de STEN) e insoluble (urea 4 M), usando extractos cerebrales de ratones $-/-$ para parkina como control para la especificidad del ELISA (Fig. 69D, $N=8$). Se detectó un aumento significativo de la parkina soluble (46 %, $P < 0,05$) e insoluble (64 %) en los ratones TDP43-Tg en comparación con el nivel de control (Fig. 69D, $P < 0,05$, $N=8$), lo que sugiere además un aumento del nivel de parkina y la insolubilidad en ratones TDP43-Tg.

La proteína siete en ausencia homóloga (SIAH) es otra ligasa E3 implicada en la ubiquitinación y la degradación proteasómica de proteínas específicas. SIAH se degrada rápidamente a través del proteasoma. SIAH2 se usó como un control de ligasa E3 para determinar si TDP-43 disminuye la solubilidad de la parkina, conduciendo a la alteración de su función de ligasa E3 independiente de otras ligasas E3. El análisis de transferencia de Western mostró un aumento significativo (215 %) de los niveles de SIAH2 soluble (Fig. 69E y F, $P < 0,05$, $N=8$) en ratones TDP43-Tg en comparación con el control, indicando la falta de degradación de SIAH2, quizás debido a un deterioro proteasómico. Sin embargo, la SIAH2 no se detectó en la fracción insoluble. En los ratones transgénicos también se observó una banda de peso molecular más bajo a 17 kDa (Fig. 69E), lo que sugiere una posible escisión de la estructura dimerica de SIAH2. Un examen adicional del nivel de la molécula diana de SIAH2 HIF-1 α mostró un aumento significativo (76 %, $P < 0,05$) del nivel de proteína (Fig. 69E y F), lo que sugiere falta de degradación proteasómica.

Para determinar el efecto de TDP-43 sobre el nivel de parkina y la actividad del proteasoma, se expresó TDP-43 de tipo silvestre (Fig. 69G, 1ª transferencia) en presencia o ausencia de parkina (Fig. 69G, 2ª transferencia) en células de neuroblastoma M17 humanas. La expresión de TDP-43 sola condujo a la aparición de la proteína parkina endógena (Fig. 69G, 2ª transferencia), lo que sugiere que TDP-43 regula el ARNm de parkina para inducir la expresión proteica. La coexpresión de parkina exógena y TDP-43 condujo a una ligera disminución de los niveles de TDP-43 (Fig. 69G, 1ª transferencia) y una disminución apreciable de las proteínas ubiquitinadas (Fig. 69G, 3ª transferencia), en comparación con TDP-43 sola. SIAH2 fue difícil de detectar en las células M17 de control (Fig. 69G, 4ª transferencia), pero se acumuló cuando se expresó TDP-43, a pesar del aumento de parkina endógena, sin embargo, la coexpresión de parkina exógena con TDP-43 condujo a la desaparición de SIAH2 (Fig. 69G, 4ª transferencia). Los efectos de la expresión de parkina sola (Fig. 69G, 2ª transferencia) en los niveles de TDP-43 y SIAH2 se compararon además con LacZ. No se observaron diferencias entre el control (Fig. 69F), LacZ, y las células M17 transfectadas con parkina (Fig. 69H) sobre el nivel de expresión de TDP-43 endógena (Fig. 69H, 1ª transferencia). Se observó un nivel más alto de mancha de proteínas ubiquitinadas con la expresión de parkina (Fig. 69H, 3ª mancha), compatible con el papel de parkina como una ubiquitina ligasa E3, pero el nivel de SIAH2 disminuyó significativamente (Fig. 69H, 4ª transferencia, 74 %, $P < 0,05$) en comparación con el control de actina. Para determinar si la acumulación de SIAH2 se debe a una actividad de ligasa E3 disminuida o a la función proteasómica, los inventores midieron la actividad del proteasoma (Fig. 69I) y encontraron que TDP-43 disminuyó significativamente (66 %) la actividad del proteasoma ($P < 0,05$, $N=12$), mientras que la coexpresión de parkina invirtió significativamente la actividad del proteasoma al 74 % de los niveles de control o de parkina, pero se mantuvo significativamente menor (26 %) que el control. Estos datos demuestran que TDP-43 aumenta los niveles de expresión de la parkina, mientras que la inhibición del proteasoma conduce a una degradación disminuida de proteínas, incluyendo la rápidamente degradable SIAH2.

La expresión lentivírica de TDP-43 en la corteza motora de rata da como resultado niveles aumentados de proteína en las interneuronas preganglionares de la médula espinal cervical. La TDP-43 de tipo silvestre se expresó utilizando suministro génico lentivírico en la corteza motora de ratas Sprague Dawley de 2 meses de edad. La inmunohistoquímica con anticuerpo policlonal de conejo que reconoce TDP-43 humana y de rata (ELA10, ProteinTech) mostró niveles de proteína TDP-43 aumentados y acumulación citosólica 2 semanas posinyección (Fig. 70B) en comparación con el hemisferio contralateral al que se le inyectó LacZ (Fig. 70A). Para determinar la especificidad de la expresión génica, se usó un anticuerpo monoclonal de ratón específico para ser humano (hTDP-43) que reconoce los a.a. 1-261 (Abcam) y se observó una tinción positiva de TDP-43 humana dentro de un radio de 4 mm en el 38 % (por estereología, $N=8$) de las neuronas corticales (Fig. 70D) en comparación con el hemisferio al que se le inyectó LacZ (Fig. 82C). Un examen adicional de la médula espinal cervical reveló un aumento del 13 % en la inmunorreactividad para hTDP-43 (Fig. 70F) y una reactividad aumentada para el anticuerpo de TDP-43 (Fig. 70G) en las interneuronas preganglionares, que se identificaron morfológicamente en el lado contralateral de la corteza motora a la que se le inyectó TDP-43 (Fig. 70E) en comparación con la médula espinal contralateral a la que se le inyectó LacZ (Fig. 70H e I), lo que sugiere que la expresión de hTDP-43 en la corteza motora conduce a niveles proteicos aumentados en la médula espinal contralateral. Adicionalmente, el recuento estereológico reveló un aumento

del 46 % (por estereología, N=8) de los niveles de hTDP-43 (Fig. 70J) y una inmunorreactividad aumentada para anticuerpo de TDP-43 (Fig. 70K) en la vía medular dorsocortical (DCST) de la médula espinal cervical contralateral para la expresión cortical de TDP-43 en comparación con el lado al que se le inyectó LacZ (Fig. 70L y M). La tinción con azul de toluidina y la cuantificación por parte de un investigador no familiarizado con el estudio de los axones 5 céntricos dentro de 10 campos aleatorios de cada portaobjetos mostraron un número aumentado (18 %, N=8) de axones (Fig. 70N, flechas) en círculos agrandados, lo que sugiere degeneración axonal en comparación con la DCST contralateral (Fig. 70O). Se detectaron algunos axones céntricos en todos los tratamientos.

La expresión de parkina lentivírica aumenta la colocalización citosólica de TDP-43 con ubiquitina. Debido a 10 que en enfermedades humanas TDP-43 se detecta en formas ubiquitinadas dentro del citosol, se buscó determinar si la ubiquitinación es beneficiosa o perjudicial para TDP-43 usando parkina como una E3 ubiquitina ligasa ubicua en el cerebro humano. TDP-43 se coexpresó con parkina y los animales se sacrificaron 2 semanas posinyección. La tinción de cortes cerebrales de 20 μ m de grosor mostró la expresión de parkina endógena (Fig. 71A) y de TDP-43 (Fig. 71B), que se localizó predominantemente en núcleos teñidos con DAPI (Fig. 71C) en la corteza motora de rata a la que se le inyectó LacZ. La tinción con anticuerpos anti-ubiquitina (Fig. 71D) en ratas que expresaban TDP-43 en la corteza 15 motora (Fig. 71E) no dio como resultado ninguna colocalización apreciable entre TDP-43 y ubiquitina (Fig. 71F). El recuento estereológico mostró un aumento del 38 % en las células teñidas para hTDP-43 (Fig. 71D). Sin embargo, se observó TDP-43 citosólica en neuronas corticales que expresaban TDP-43 (Fig. 71F) en comparación con TDP-43 nuclear en animales a los que se les inyectó LacZ (Fig. 71C). Los inventores expresaron parkina en la corteza motora de rata (Fig. 71G) junto con TDP-43 (Fig. 71H) y observaron la colocalización citosólica de parkina y TDP-43 (Fig. 71I, 20 35 % por estereología). Además, tiñeron con anticuerpos anti-ubiquitina y observaron niveles aumentados de ubiquitina (Fig. 71J, 35 % por estereología) en animales a los que se les inyectó parkina y TDP-43 (Fig. 71K). De manera interesante, las señales de ubiquitina potenciadas colocalizaron con TDP-43 en el citosol, lo que sugiere que la ubiquitinación puede dar como resultado el secuestro citosólico de TDP-43. Para determinar si la expresión de 25 parkina exógena afecta la localización de la proteína TDP-43 endógena, los inventores tiñeron con anticuerpos para parkina (Fig. 71M, 28 % por estereología) y TDP-43 (Fig. 71N), pero no observaron ningún cambio en el patrón de tinción de TDP-43 (Fig. 71O).

La parkina estimula la ubiquitina enlazada en K48 y K63 para TDP-43. Para demostrar si la parkina participa en la 30 ubiquitinación de TDP-43, se realizó inmunoprecipitación para mostrar TDP-43 ubiquitinada en presencia de expresión de parkina. El análisis de transferencia de Western de la entrada mostró que la parkina exógena aumentada (Fig. 72A, 1ª transferencia, N=8, $P < 0,05$, 42 %) en la corteza motora de rata, aumenta los niveles de proteínas ubiquitinadas (Fig. 72A, 2ª transferencia). El análisis de densitometría de las transferencias de TDP-43 (Fig. 72A, 3ª transferencia) mostró un aumento significativo (48 %, N=8) de los niveles de TDP-43 en cerebros a los que se les inyectó TDP-43 35 lentivírica (compatible con el trabajo anterior de los inventores en comparación con cerebros a los que se les inyectó LacZ o parkina. Sin embargo, la coinyección de TDP-43 y parkina no dio como resultado cambios significativos en los niveles de TDP-43 ($P < 0,05$, N=8), lo que sugiere que la parkina participa en la ubiquitinación de TDP-43, que puede no conducir a la degradación de la proteína. También se usó un mutante de parkina no funcional (T240R, mutación de 40 treonina a arginina), que se coexpresó con TDP-43 (Fig. 72A, transferencia de la parte superior) y no se detectaron cambios en las proteínas ubiquitinadas (Fig. 72A, 2ª transferencia) o en los niveles de TDP-43 (Fig. 72A, 3ª transferencia). Se inmunoprecipitó TDP-43 y se exploró con ubiquitina (Fig. 72A, 4ª transferencia) para determinar que las especies de alto peso molecular son proteínas TDP-43 ubiquitinadas y no algunos agregados proteicos. Se observó un aumento de la mancha de proteínas cuando se coinyectó TDP-43 con parkina, en comparación con TDP-43, parkina o LacZ solo, lo que sugiere una la ubiquitinación aumentada de TDP-43 en presencia de parkina de tipo silvestre. Sin 45 embargo, no se observaron diferencias en los niveles de proteínas ubiquitinadas (Fig. 72A, 4ª transferencia) cuando se inmunoprecipitó TDP-43 con o sin expresión de parkina mutante T240R, lo que sugiere que la parkina funcional participa en la ubiquitinación de TDP-43.

Para determinar si TDP-43 afecta la actividad de ubiquitina ligasa E3 parkina, la parkina (Fig. 72B, transferencia 50 izquierda) y la TDP-43 (Fig. 4B, transferencia derecha) se inmunoprecipitaron y se realizó un ensayo de actividad enzimática. Se usaron controles positivos con E1-E2-E3 o cadenas de poliubiquitina o parkina recombinante (Novus Biologicals) para medir la actividad de ubiquitina ligasa E3 y lecturas de cadenas de poliubiquitina (Fig. 72C). No se detectó actividad de parkina con la ubiquitina nula para lisina (K0), pero la ubiquitina enlazada en K48 o K63 mutante mostró un aumento en la actividad de ubiquitina ligasa E3 parkina en comparación con el control K0 (Fig. 72C, N=4). 55 La actividad de parkina con ubiquitina K63 fue significativamente mayor (83 %, $P < 0,05$, N=4) que la ubiquitina enlazada en K48, lo que sugiere que la parkina experimenta una autoubiquitinación enlazada en K48 y K63. La parkina también se ubiquitinó usando ubiquitina de tipo silvestre, que contiene los 7 restos de lisina. Para determinar si la actividad de parkina se altera en presencia de TDP-43, se añadieron a la mezcla enzimática tanto la parkina como la TDP-43. Como se preveía, no se detectó actividad con ubiquitina nula para lisina (K0), pero la actividad de parkina aumentó 60 significativamente en comparación con parkina sola (Fig. 72C, $P < 0,05$, N=8) con ubiquitina K48 (154 %) y K63 (156 %), lo que indica que la actividad de parkina es aún mayor en presencia de un sustrato. La parkina también mostró un nivel significativamente más alto de actividad con ubiquitina de tipo silvestre en presencia de TDP-43 (279 %) en comparación con parkina sola.

65 Para determinar que la parkina participa en la ubiquitinación de TDP-43, se inmunoprecipitó parkina y TDP-43 por

separado y se realizaron ensayos de ubiquitinación *in vitro*. La incubación de parkina y TDP-43 en presencia de ubiquitina de tipo silvestre (Fig. 72D, 2º carril) o K48 (7º carril) o K63 (8º carril) (Fig. 72D, N=3), mostró una mancha de proteínas tras el análisis de TW con anticuerpos para TDP-43 en comparación con la ubiquitina nula para lisina (K0) (6º carril), o en ausencia de E1 o E2 o de ambas (todos los demás carriles, lo que sugiere que la parkina participa en la ubiquitinación enlazada a K48 y K63 de TDP-43. Adicionalmente, la incubación de parkina en presencia de ubiquitina de tipo silvestre (Fig. 72E, 2º carril) o K48 (7º carril) o K63 (8º carril) (Fig. 72E, N=3), mostró una mancha de proteínas tras el análisis de TW con anticuerpos para parkina en comparación con la ubiquitina nula para lisina (K0) (6º carril), o en ausencia de E1 o E2 o de ambas (todos los demás carriles, lo que sugiere que la parkina experimenta autoubiquitinación enlazada a K48 y K63.

10

Se midió la actividad del proteasoma 20S (Fig. 72F), que disminuyó significativamente (31 %, $P < 0,05$) cuando TDP-43 se expresó sola (N=8, $P < 0,05$), pero la coexpresión de parkina invirtió significativamente la actividad del proteasoma (48 %, $P < 0,05$) en comparación con TDP-43 sola. Sin embargo, la actividad del proteasoma en la corteza que expresa parkina se mantuvo significativamente más alta que la de los animales a los que se les inyectó LacZ (73 %, $P < 0,05$) y parkina+TDP-43 (31 %, $P < 0,05$), lo que indica que la actividad de la parkina invierte parcialmente la actividad del proteasoma.

15

La parkina forma un complejo multiproteico con HDAC6 para mediar en la translocación de TDP-43 del núcleo al citosol.

La falta de degradación de TDP-43 ubiquitinada y la acumulación citosólica de parkina, TDP-43 y ubiquitina en los animales de transferencia génica condujeron al examen de posibles mecanismos para translocar TDP-43 al citosol. El análisis de transferencia de Western mostró un aumento significativo (41 %, $P < 0,05$) de los niveles de HDAC6 cuando se expresó TDP-43 en comparación con los animales a los que se les inyectó LacZ o parkina (Fig. 72G y H, 1ª transferencia, $P < 0,05$, N=8). Sin embargo, se detectaron aumentos adicionales de los niveles de HDAC6 (Fig. 72G y H, 112 %, $P < 0,05$) cuando la parkina se coexpresó con TDP-43, lo que sugiere una posible interacción entre estas proteínas. El examen de los marcadores moleculares de autofagia mostró un aumento significativo de P62 (28 %, $P < 0,05$) cuando se coexpresaba parkina con TDP43 (Fig. 72G y H, 2ª transferencia) en comparación con todos los demás tratamientos, lo que sugiere acumulación de proteínas ubiquitinadas. No se observaron cambios en otros marcadores de autofagia (LC3, beclina, las Atg) ni aparición de vacuolas autofágicas por ME. Se inmunoprecipitó TDP-43 humana a partir de ratones transgénicos y se verificó TDP-43 como de 46 kDa utilizando el anticuerpo hTDP-43 (Fig. 73A, transferencias 1ª y 2ª). La separación de los anticuerpos y la reexploración con anticuerpos para parkina mostró una banda ligeramente más alta de alrededor de 50 kDa, lo que sugiere la presencia de proteína parkina (Fig. 73A, 3ª transferencia). La separación y la exploración adicionales con el anticuerpo para HDAC6 (Fig. 73A, 4ª transferencia) mostraron una banda de peso molecular más alto de alrededor de 120 kDa, indicando un complejo multiproteico entre la parkina, TDP43 y HDAC6. Se realizó un experimento alternativo mediante inmunoprecipitación de parkina y verificación de la presencia de TDP-43 humana (Fig. 73B, 1ª y 2ª transferencia). La separación y la exploración con anticuerpo para parkina mostraron una banda de parkina tanto en ratones de control transgénicos como no transgénicos (Fig. 73B, 3ª transferencia), lo que indica que la parkina se inmunoprecipitó satisfactoriamente. Se detectó una banda de peso molecular más alto representativa de HDAC6 (Fig. 73B, 4ª transferencia) en ratones transgénicos pero no en ratones de control, lo que sugiere además la formación de complejos multiproteicos entre TDP43, parkina y HDAC6.

40

Para comprobar de que tanto la parkina como HDAC6 son necesarias para la translocación de TDP-43, se expresó TDP-43 etiquetada con GFP en células de neuroblastoma M17 en presencia de parkina de tipo silvestre o mutante con pérdida de función (T240R) y se trató con un inhibidor selectivo de HDAC6 5 μ M durante 24 horas. La expresión de GFP se observó predominantemente dentro de núcleos teñidos con DAPI en células M17 vivas (Fig. 73C, el recuadro de detalle es mayor aumento), sin embargo, la coexpresión de parkina condujo a una fluorescencia de GFP significativa dentro del citoplasma (Fig. 73D y E) y de prolongaciones neuronales (Fig. 73D, el recuadro de detalle muestra un mayor aumento de la fluorescencia de GFP). El tratamiento con el inhibidor de HDAC6, tubacina, no condujo a fluorescencia de GFP en el citosol en presencia (Fig. 73F) o ausencia (Fig. 73G) de parkina. La pérdida de la función de la ubiquitina ligasa E3 parkina (T240R) no condujo a la acumulación de TDP-43 en el citosol (Fig. 73H), lo que sugiere que la función de la ubiquitina ligasa E3 de la parkina y la actividad de HDAC6 son necesarias para facilitar la acumulación de TDP-43 dentro del citosol.

45

50

Para verificar si la expresión de TDP-43 aumenta los niveles de ARNm de parkina, el qRT-PCR realizado se realizó en muestras aisladas de corteza de rata, en células M17 humanas y ratones TDP43-Tg. Los niveles de ARNm de Park2 en células M17 que expresaban parkina fueron significativamente más altos (Fig. 73I y J, 55 %, $P < 0,05$, N=4) que LacZ, pero similares a los cerebros a los que se les inyectó TDP-43 (61 %, $P < 0,05$). La coexpresión de parkina con TDP-43 mostró niveles significativamente más altos de ARNm de park2 (Fig. 73J, 74 %, $P < 0,05$, N=4) en comparación con parkina sola. De manera similar, los niveles de ARNm de Park2 en cerebros de ratas que expresaban parkina fueron significativamente más altos (Fig. 73K y L, 41 %, $P < 0,05$, N=4) que los animales LacZ, así como cerebros a los que se les inyectó TDP-43 (21 %, $P < 0,05$). Sin embargo, la coexpresión de parkina con TDP-43 mostró niveles significativamente más altos de ARNm de park2 (Fig. 73J, 84 %, $P < 0,05$, N=4) en comparación con todos los demás tratamientos. Por lo tanto, se compararon los niveles de ARNm de park2 entre TDP43-Tg y los compañeros de camada de control no transgénicos. Se observó un aumento significativo (Fig. 73M y N, 114 %, N=4, $P < 0,05$) del mRNA de park2 en cerebros de TDP43-Tg inyectados en comparación con los C57BL/6 de control, demostrando que

65

la parkina es una diana transcripcional para TDP-43.

Ejemplo 7

5 **La parkina desempeña un papel esencial en la supervivencia de las neuronas motoras a través de la modulación del transporte de TDP-43 nuclear a la sinapsis**

La ubiquitina ligasa E3 parkina es importante en la neurodegeneración. La parkina estimula la ubiquitinación específica de la proteína de unión a ADN de TAR (TDP)-43, y podría mediar su transporte a través de la formación de complejos con la histona desacetilasa 6 (HDAC6). En neuronas sanas, TDP-43 es predominantemente nuclear y podría transportarse a la sinapsis para la generación de proteínas sinápticas. Como se muestra en la Figura 74, 1). La parkina podría ubiquitinar TDP-43 y trasladarlo desde el núcleo al citosol; 2). El complejo de parkina-HDAC6 es necesario para el transporte axoplásmico de TDP-43 a la sinapsis; y 3). La disponibilidad de TDP-43 en la sinapsis modula la expresión de proteínas sinápticas que mantienen el metabolismo del glutamato.

15 Las neuronas motoras largas, que se degeneran en la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), podrían depender del transporte axonal de TDP-43 a sinapsis distantes, aumentando así su vulnerabilidad a la localización de TDP-43. En la neurodegeneración, incluyendo la ELA y la demencia frontotemporal (DFT-TDP), la TDP-43 de tipo silvestre y mutada se agregan, y las neuronas que portan agregados de TDP-43 expresan menos parkina. Los datos proporcionados en el presente documento demuestran que la parkina altera la localización de TDP-43, invierte la alteración inducida por TDP-43 de los niveles de glutamato y mejora el rendimiento motor. La TDP-43 se une a ARNm que codifican proteínas implicadas en la función sináptica, incluyendo la sinaptotagmina y los portadores vesiculares de glutamato. El transporte de glutamato es defectuoso en la ELA, debido a la pérdida de portadores de glutamato que facilitan la conversión de glutamato sináptico en glutamina. Por tanto, la translocación nuclear de TDP-43 y el transporte axoplásmico a la sinapsis podrían ser particularmente importantes para las neuronas motoras.

La localización de TDP-43 mediada por parkina en la sinapsis podría afectar las proteínas sinápticas que mantienen el metabolismo del glutamato. Por tanto, la parkina podría desempeñar un papel esencial en la supervivencia de las neuronas motoras a través de la modulación del transporte de TDP-43 nuclear a la sinapsis.

30 Los siguientes datos sustentan estas conclusiones. La Figura 75 muestra la distribución de TDP-43 etiquetada con GFP en células M17 transfectadas con 3 mg de ADNc durante 24 horas y luego tratadas con Nilotinib (10 mM) o Bosutinib (5 mM), y el inhibidor de HDAC6 Tubacina (5 mM) durante 24 horas adicionales. Los recuadros de detalle (B y D) representan imágenes de mayor aumento que muestran la translocación de TDP-43 marcada con GFP desde el núcleo (A) hacia el citosol (B y D y recuadro de detalle), mientras que la tubacina altera la translocación.

REIVINDICACIONES

1. Inhibidor de las tirosina cinasas para su uso en el tratamiento o la prevención de la esclerosis lateral amiotrófica en un sujeto, en donde el tratamiento o la prevención comprende:
- 5 la selección de un sujeto con esclerosis lateral amiotrófica o con riesgo de esclerosis lateral amiotrófica; y la administración de una cantidad efectiva del inhibidor de las tirosina cinasas al sujeto, en donde el inhibidor de las tirosina cinasas no es Gleevec, en donde el inhibidor de las tirosina cinasas cruza la barrera hematoencefálica, en donde el inhibidor de las tirosina cinasas se selecciona del grupo que consiste en nilotinib, bosutinib y una
- 10 combinación de los mismos, y en donde el inhibidor de las tirosina cinasas se va a administrar a una dosificación de menos de 10 mg/kg.
2. Inhibidor de las tirosina cinasas para el uso de la reivindicación 1, en donde el tratamiento comprende
- 15 la selección de un sujeto con esclerosis lateral amiotrófica, en donde el sujeto tiene una mutación TDP-43; y la administración de una cantidad efectiva del inhibidor de las tirosina cinasas al sujeto.
3. El inhibidor de las tirosina cinasas para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en donde el inhibidor de las tirosina cinasas es para administración sistémica, opcionalmente para administración oral, y/o en donde el
- 20 inhibidor de las tirosina cinasas es para administración diaria.
4. El inhibidor de las tirosina cinasas para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde la cantidad efectiva del inhibidor de las tirosina cinasas estimula la actividad de la Parkina.
- 25 5. El inhibidor de las tirosina cinasas para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que comprende además la administración de un segundo agente terapéutico al sujeto, en donde opcionalmente el segundo agente terapéutico se selecciona del grupo que consiste en levadopa, un agonista de la dopamina, un agente anticolinérgico, un inhibidor de la monoaminoxidasa, un inhibidor de la COMT, amantadina, rivastigmina, un antagonista del NMDA, un inhibidor de colinesterasa, riluzol, un agente antipsicótico, un antidepresivo y tetrabenacina.
- 30 6. Composición farmacéutica que comprende una cantidad efectiva del inhibidor de las tirosina cinasas en un portador farmacéuticamente aceptable para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.

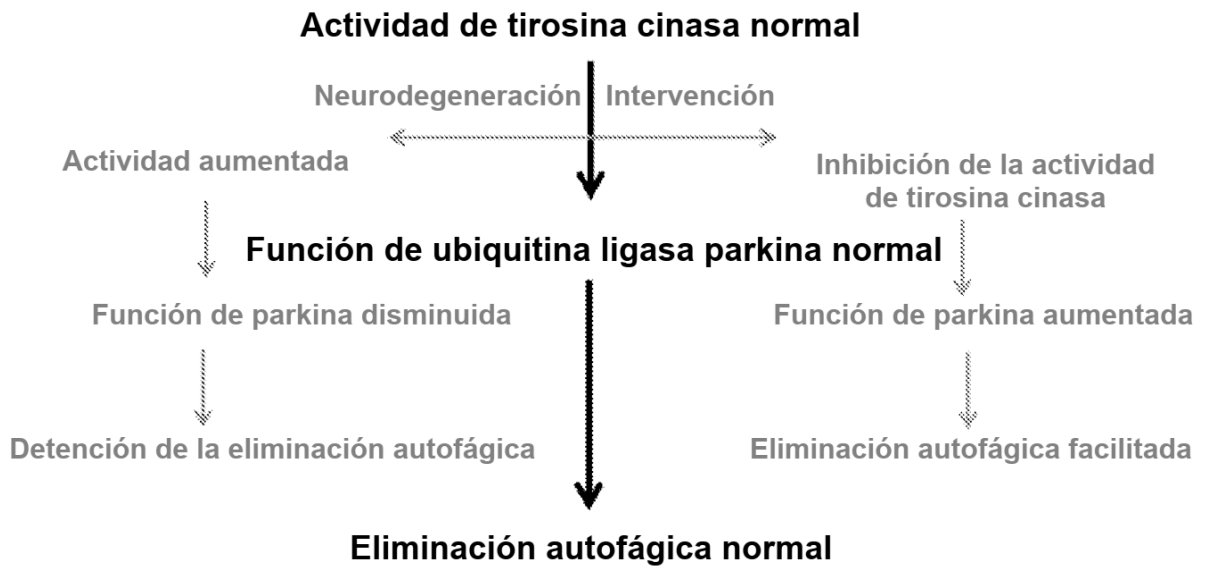


FIG. 1

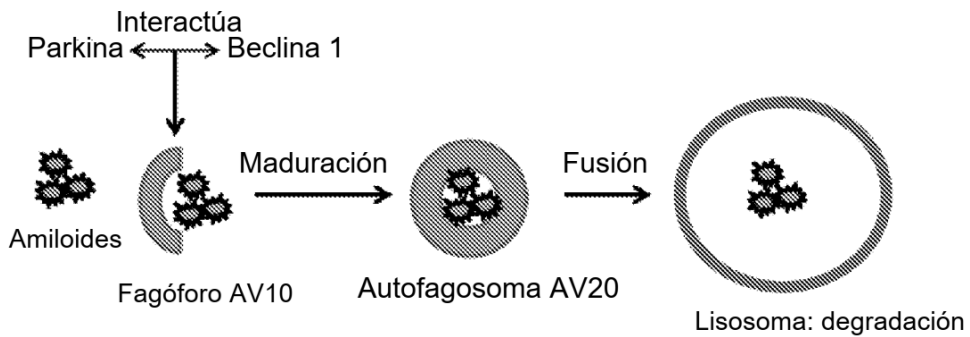


FIG. 2

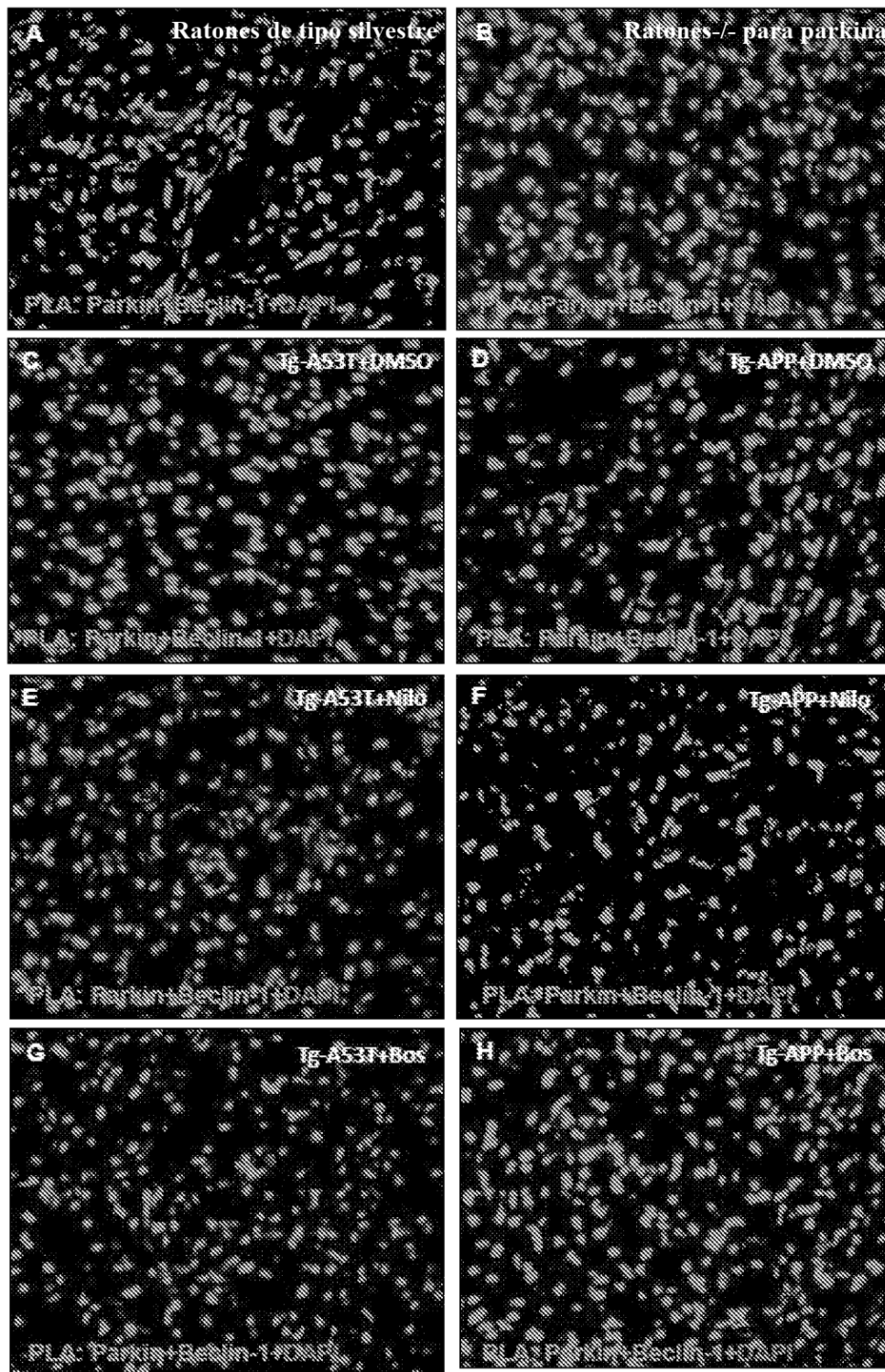


FIG. 3

Lisados cerebrales: ELISA de A β ₁₋₄₂ humana sobre ratones 3X APP tratados con Nilotinib

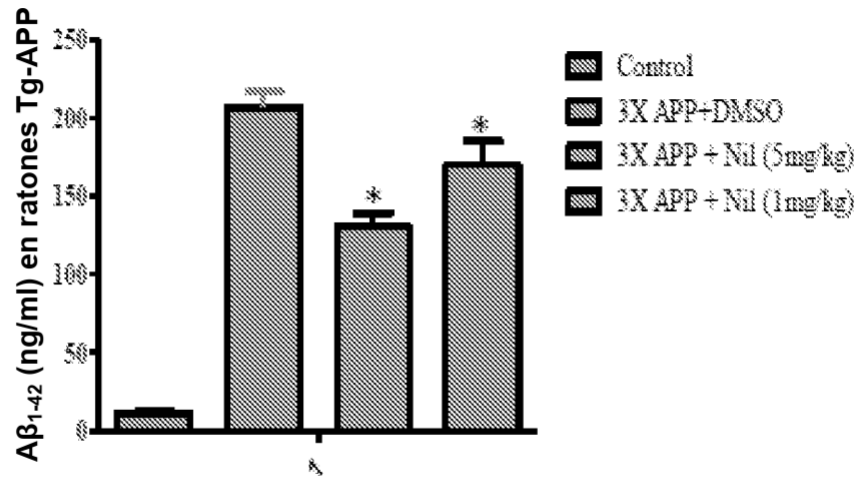


FIG. 4

Lisados cerebrales: ELISA de A β ₁₋₄₂ humana sobre ratones 3X APP tratados con Bosutinib

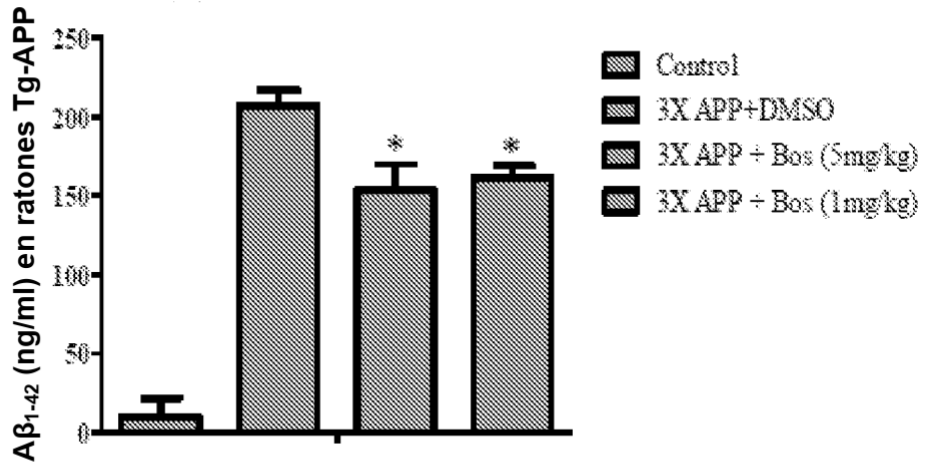


FIG. 5

Lisados cerebrales: ELISA de sin α humana en ratones A53T TG tratados con Bosutinib durante 3 semanas

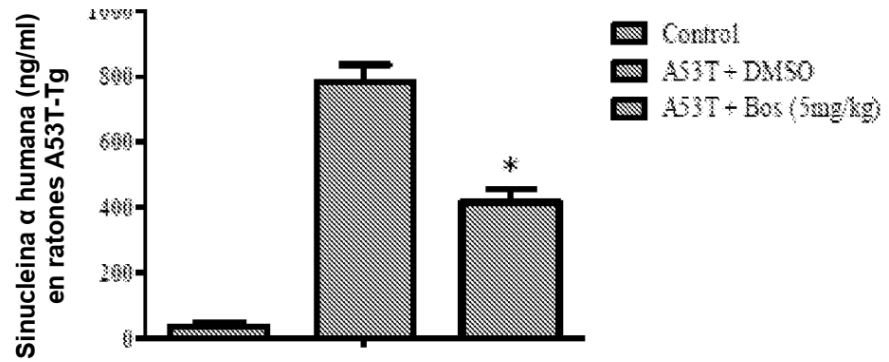


FIG. 6

Lisados cerebrales: ELISA de sin α humana en ratones A53T TG tratados con Bosutinib

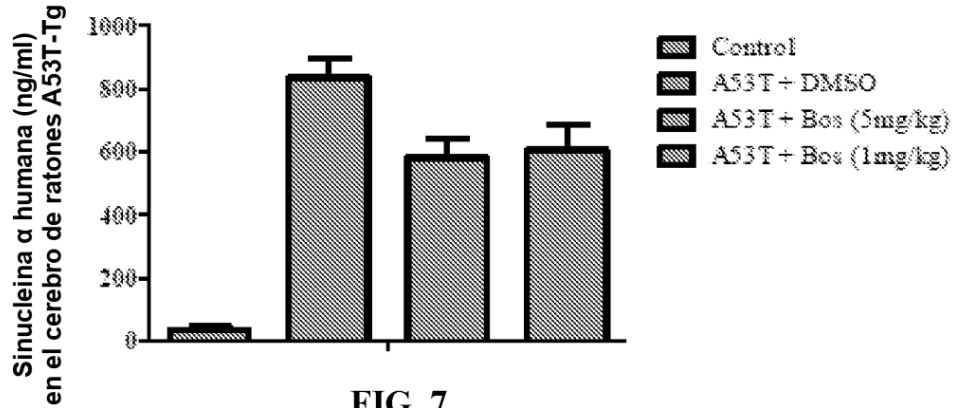


FIG. 7

Sangre: ELISA de sin α humana en ratones A53T TG tratados con Bosutinib

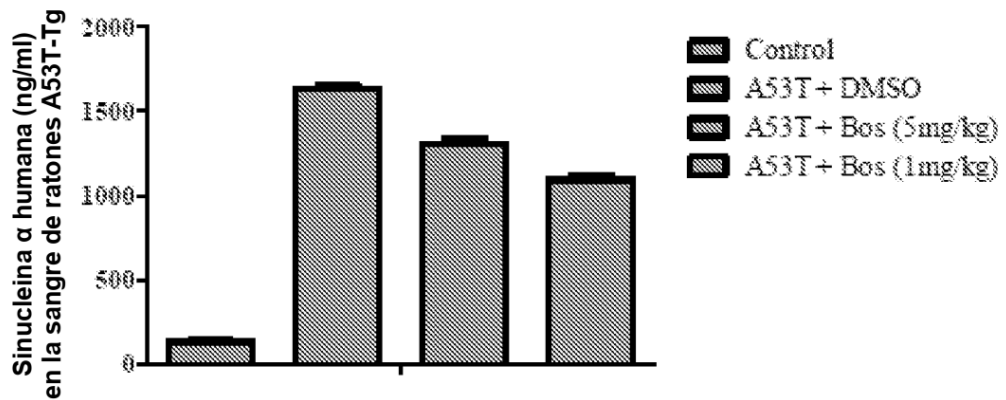


FIG. 8

Lisados cerebrales: ELISA de sin α humana en ratones A53T TG tratados con Nilotinib

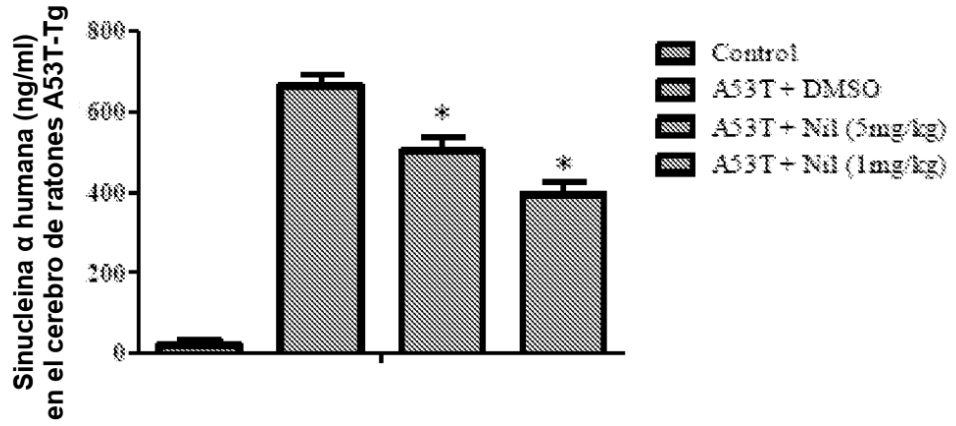


FIG. 9

Sangre: ELISA de sin α humana en ratones A53T TG tratados con Nilotinib

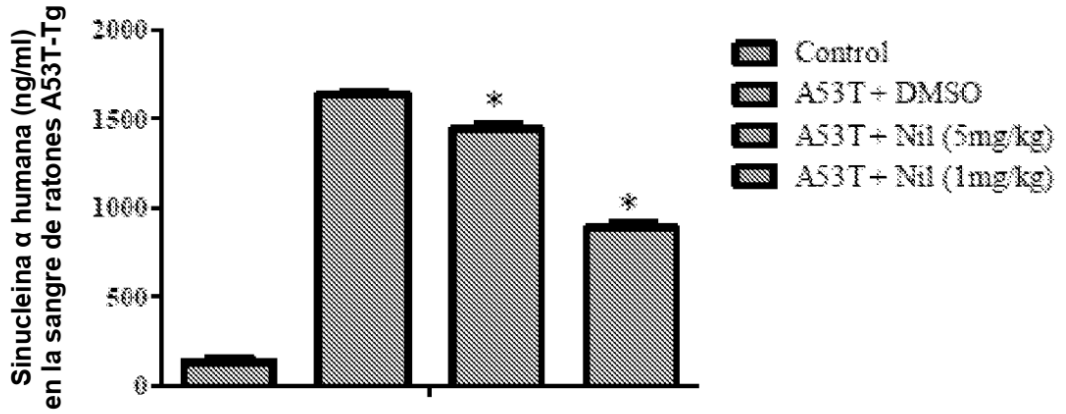


FIG. 10

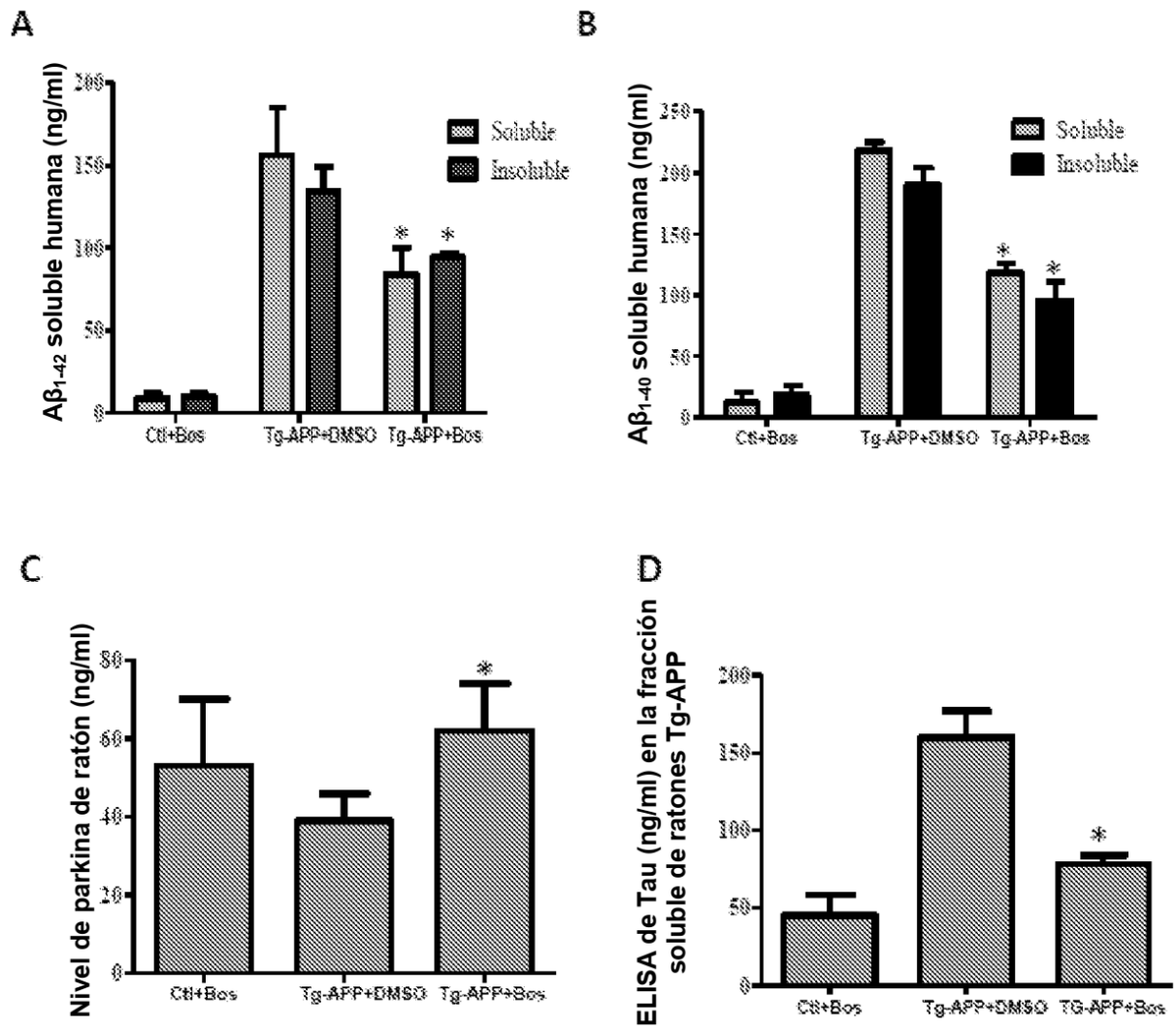


FIG. 11

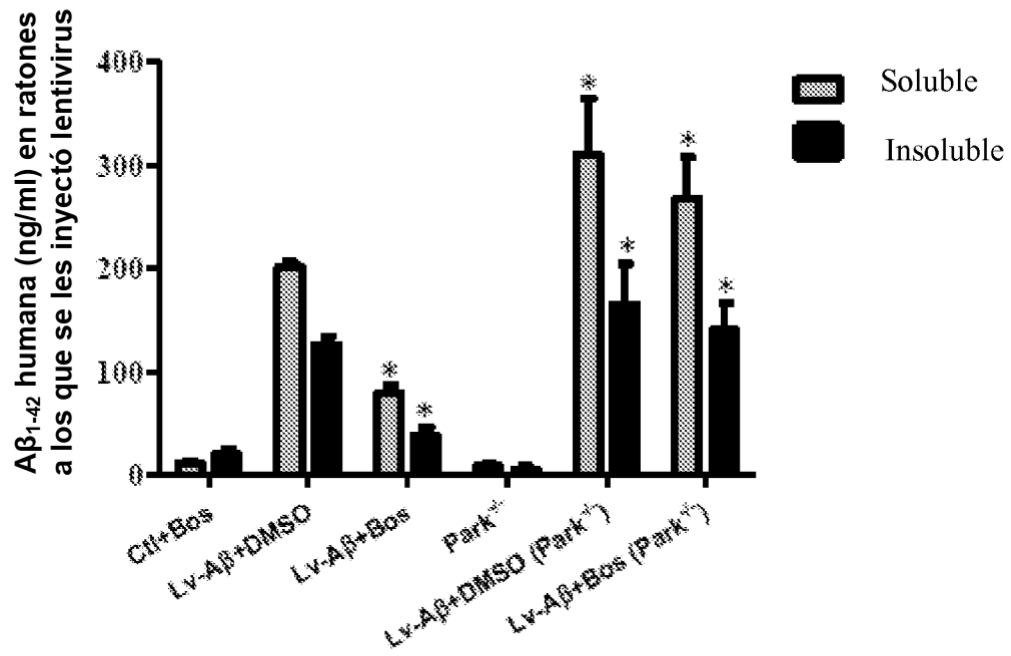
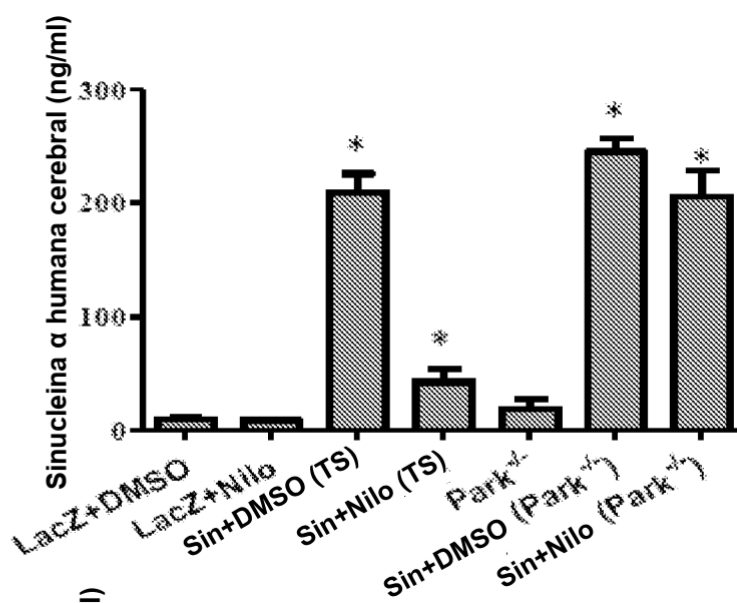


FIG. 12

A



B

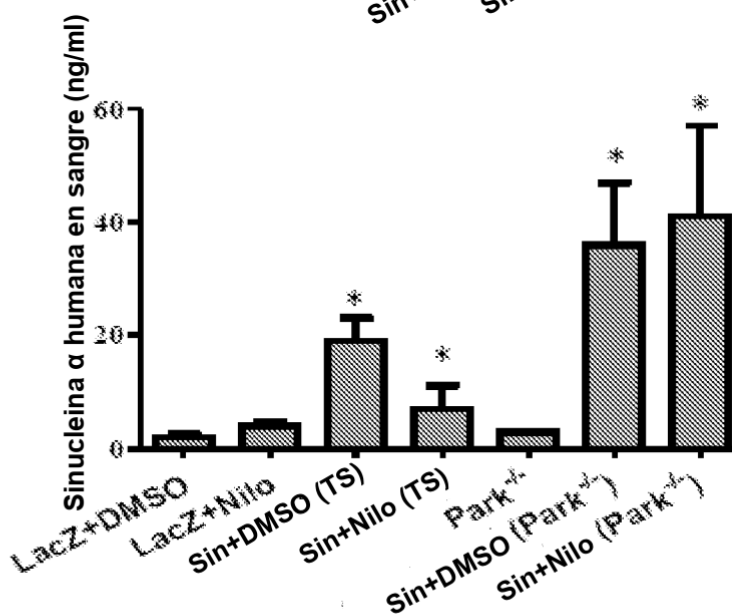
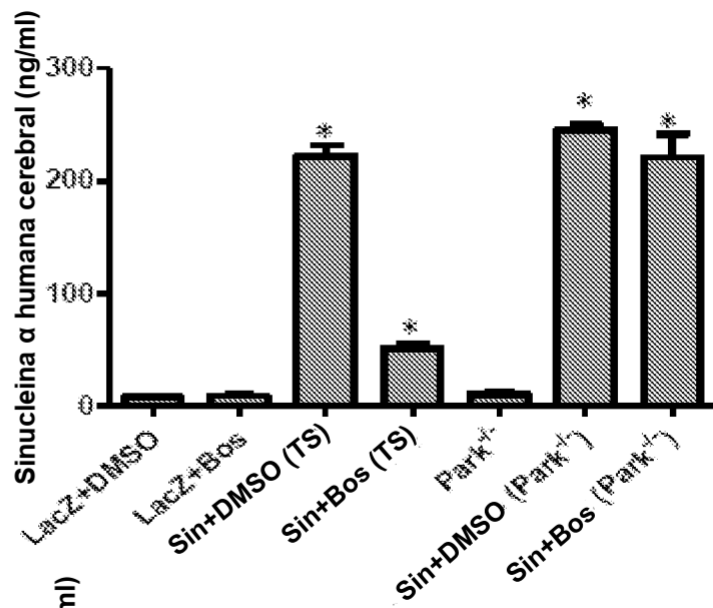


FIG. 13

A



B

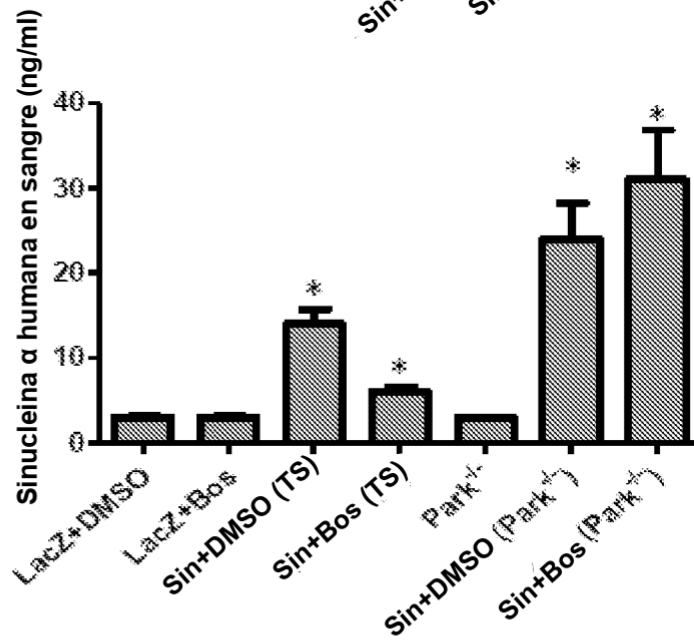
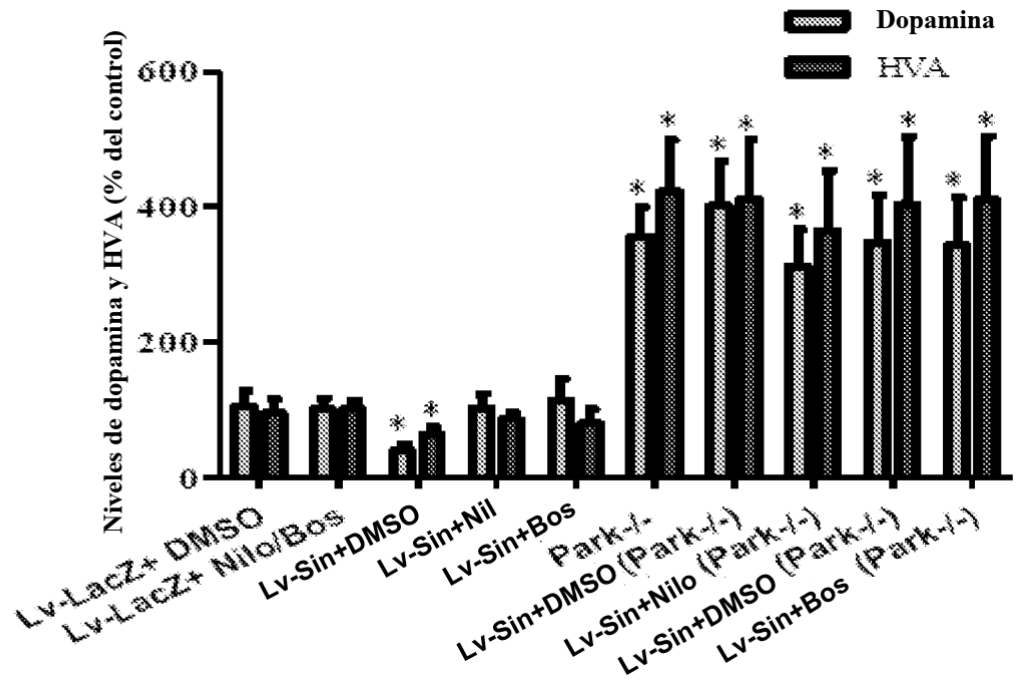


FIG. 14

A



B

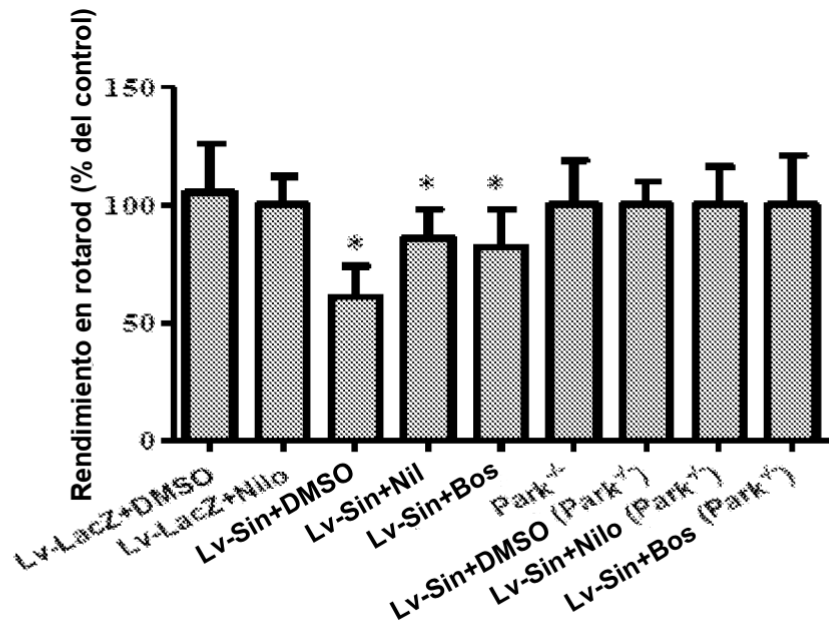


FIG. 15

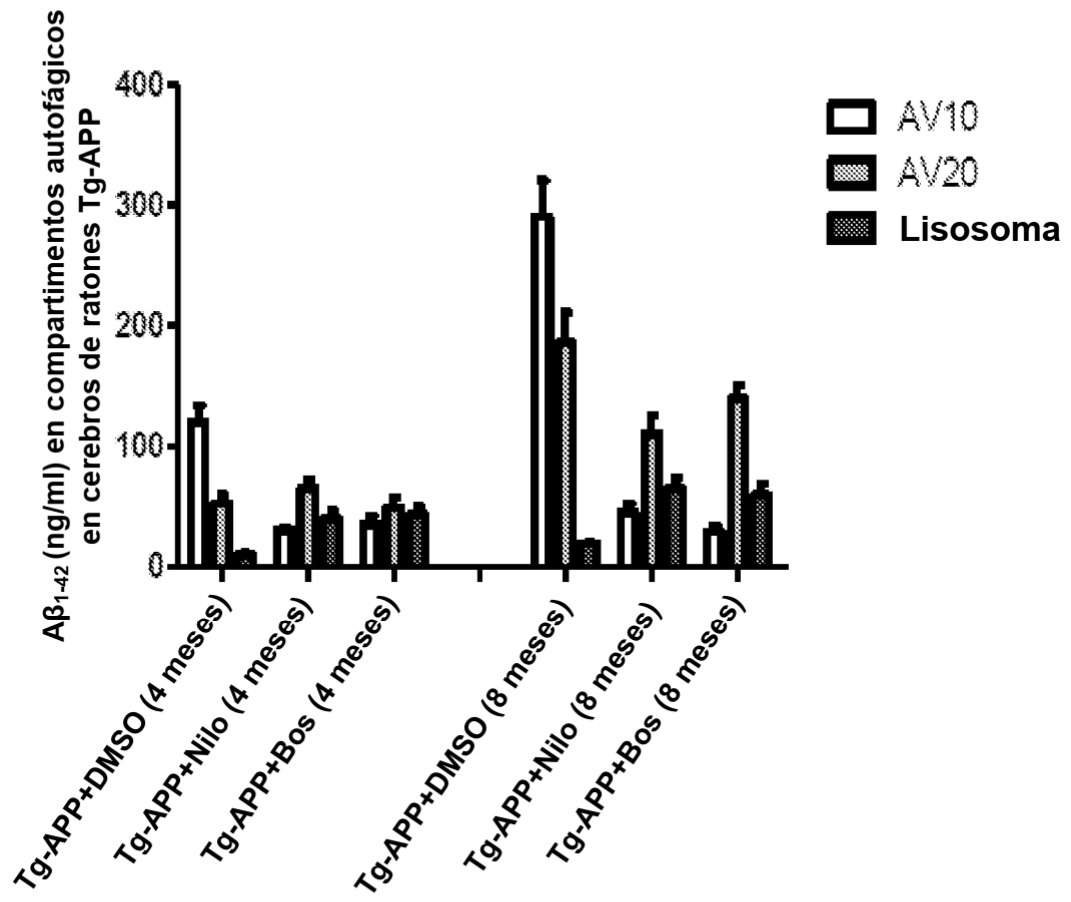


FIG. 16

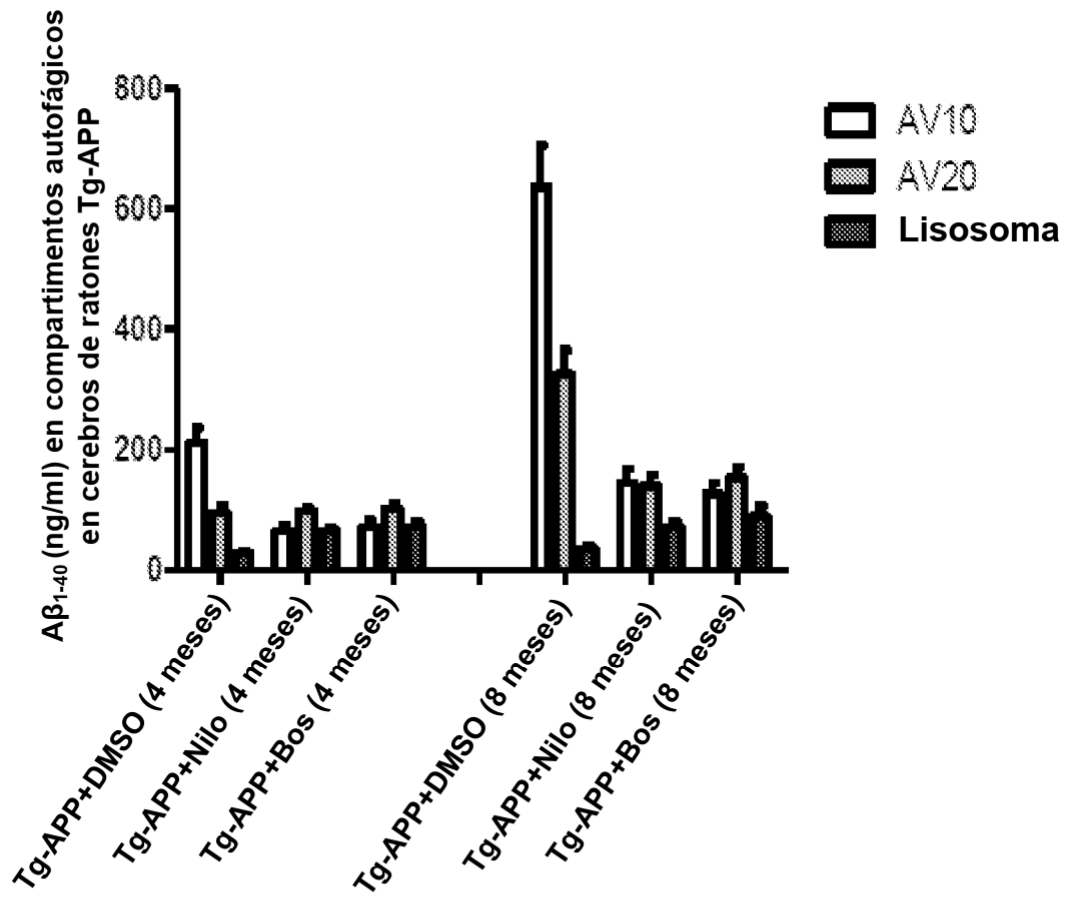


FIG. 17

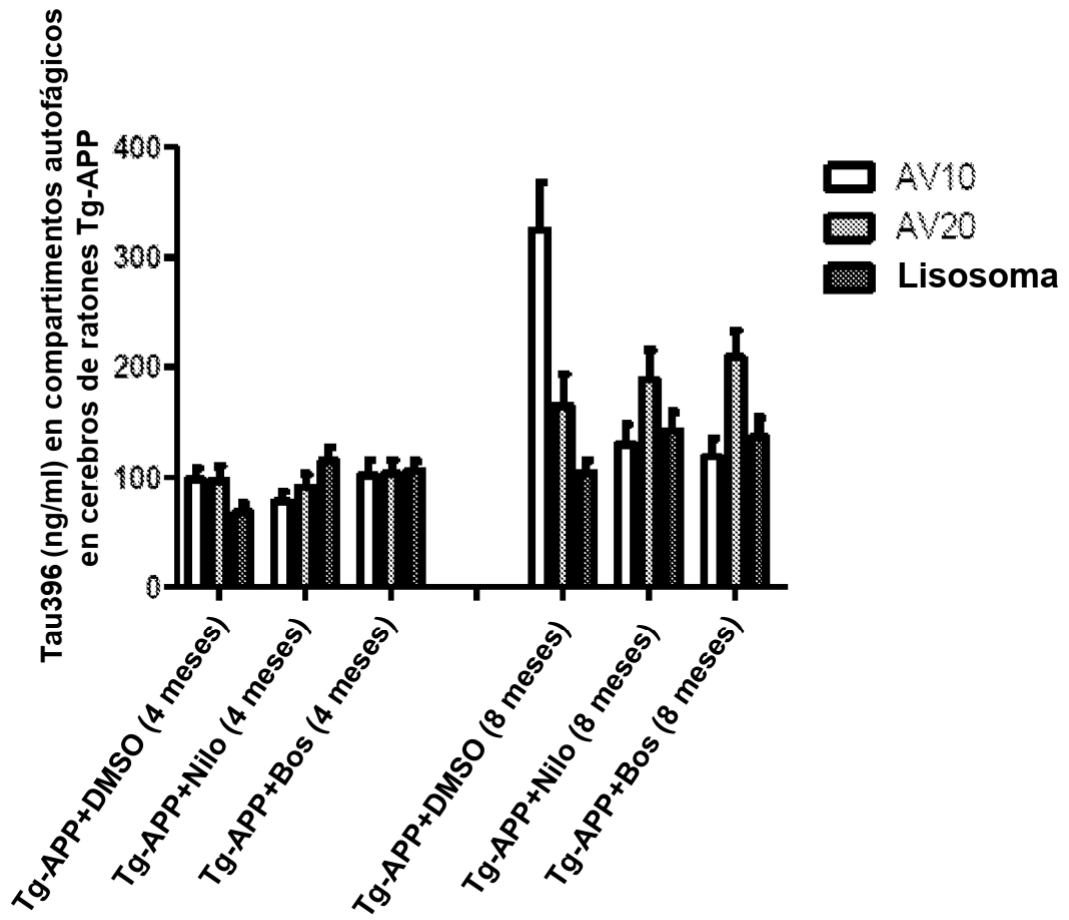


FIG. 18

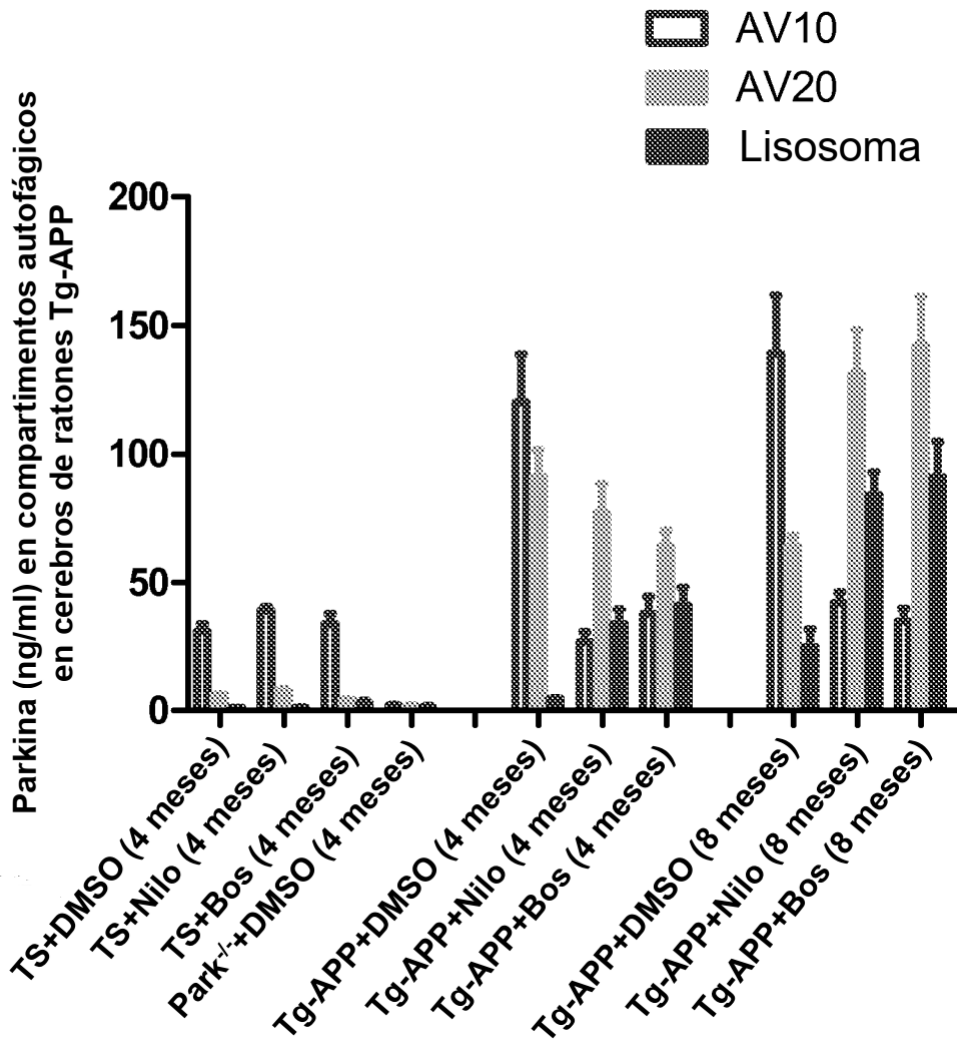


FIG. 19

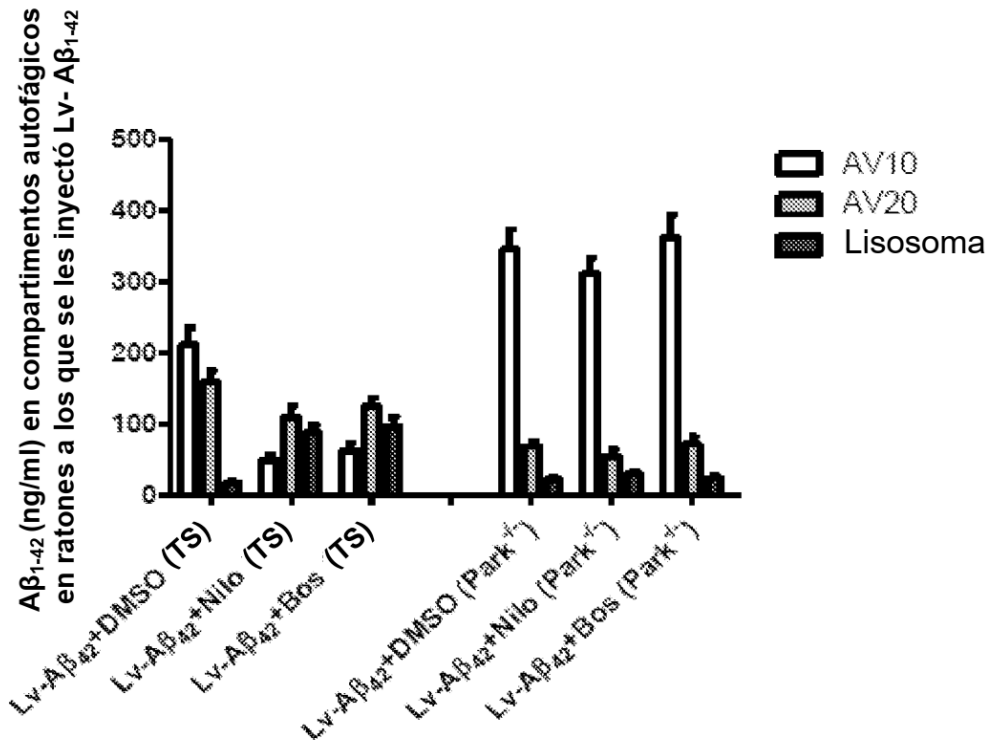


FIG. 20

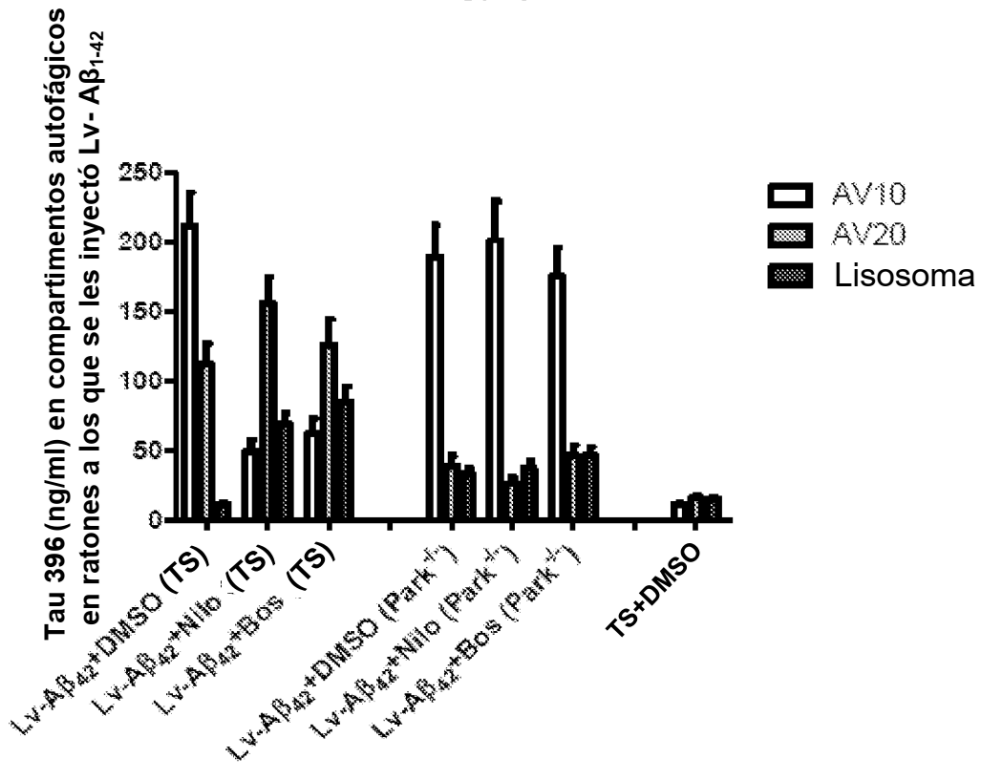


FIG. 21

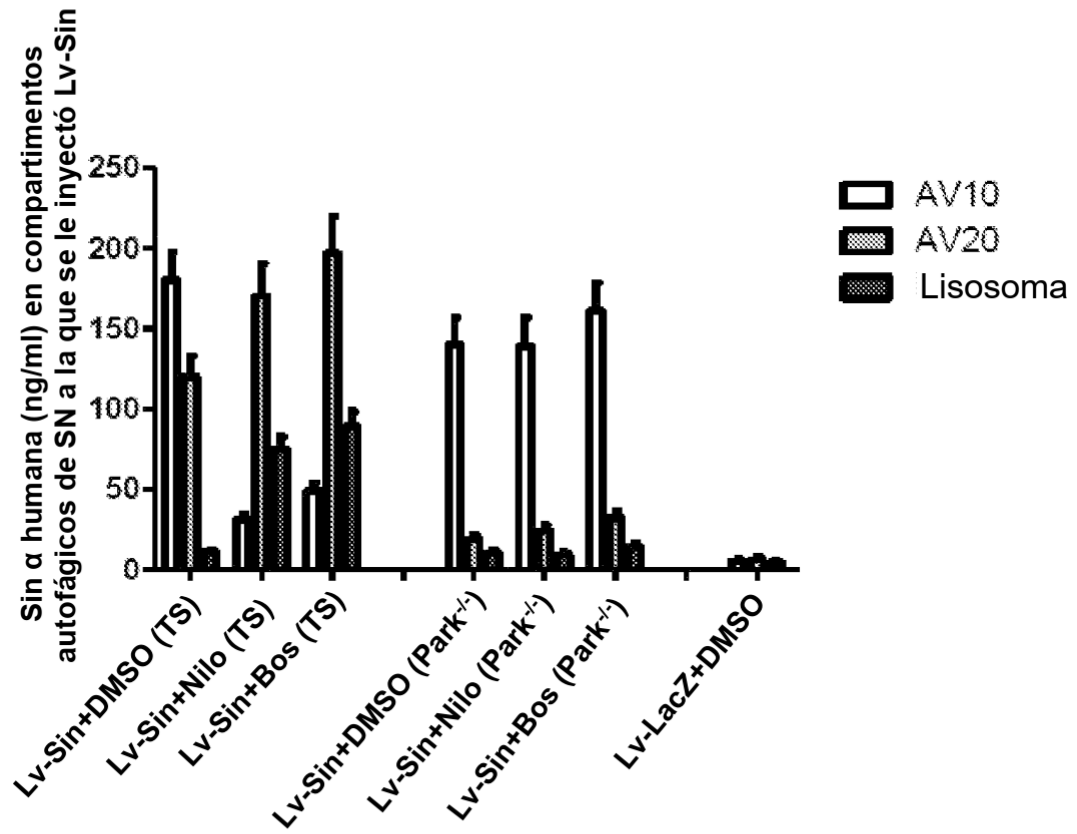


FIG. 22

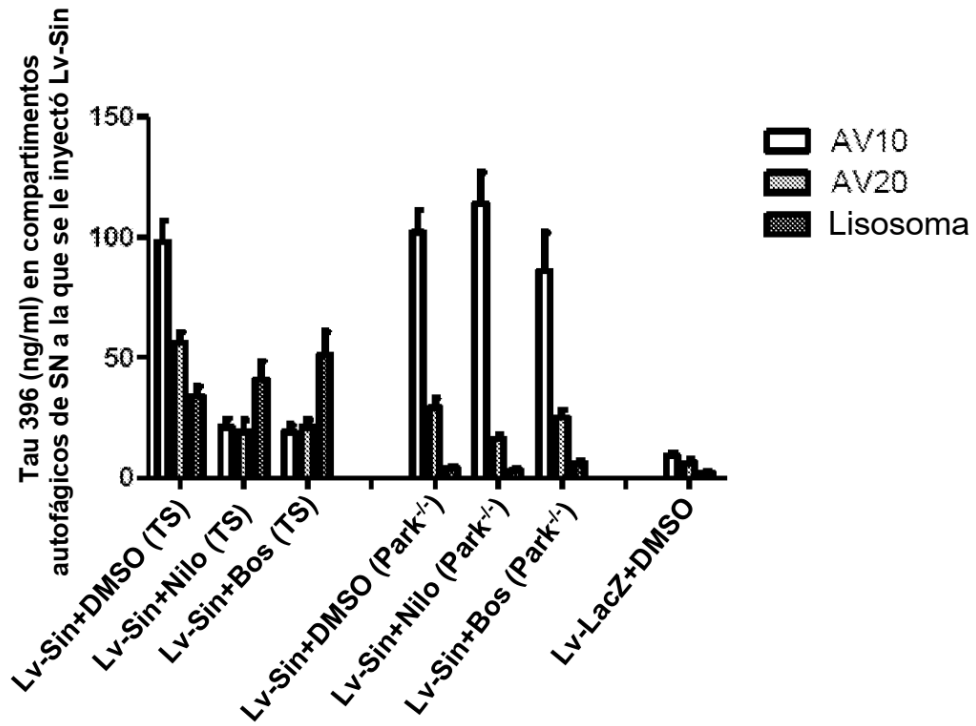


FIG. 23

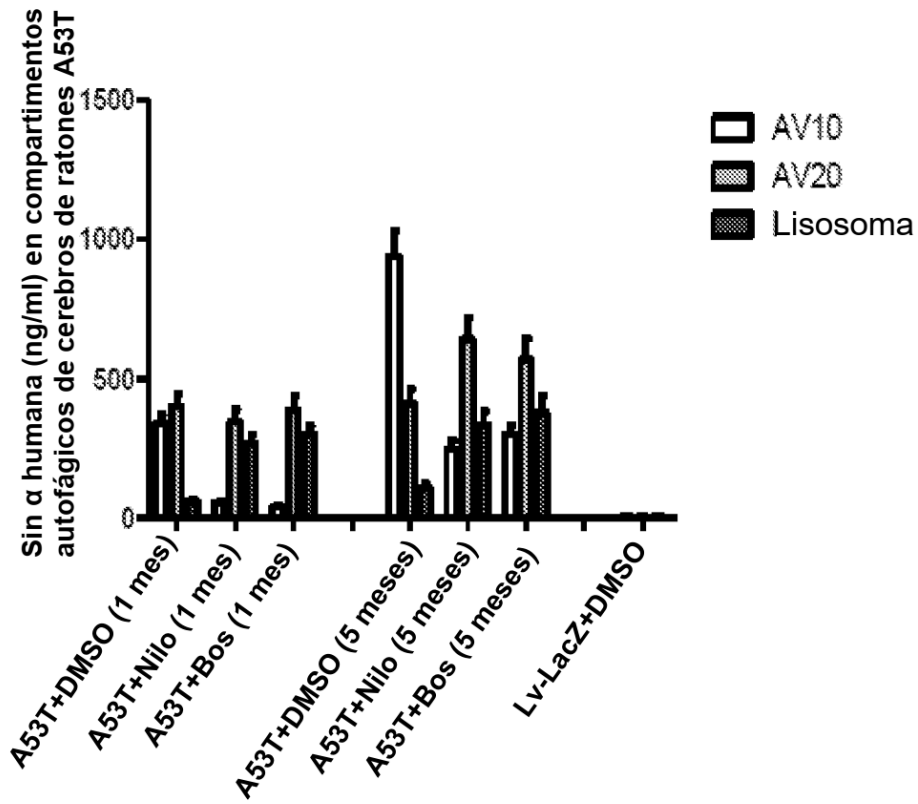


FIG. 24

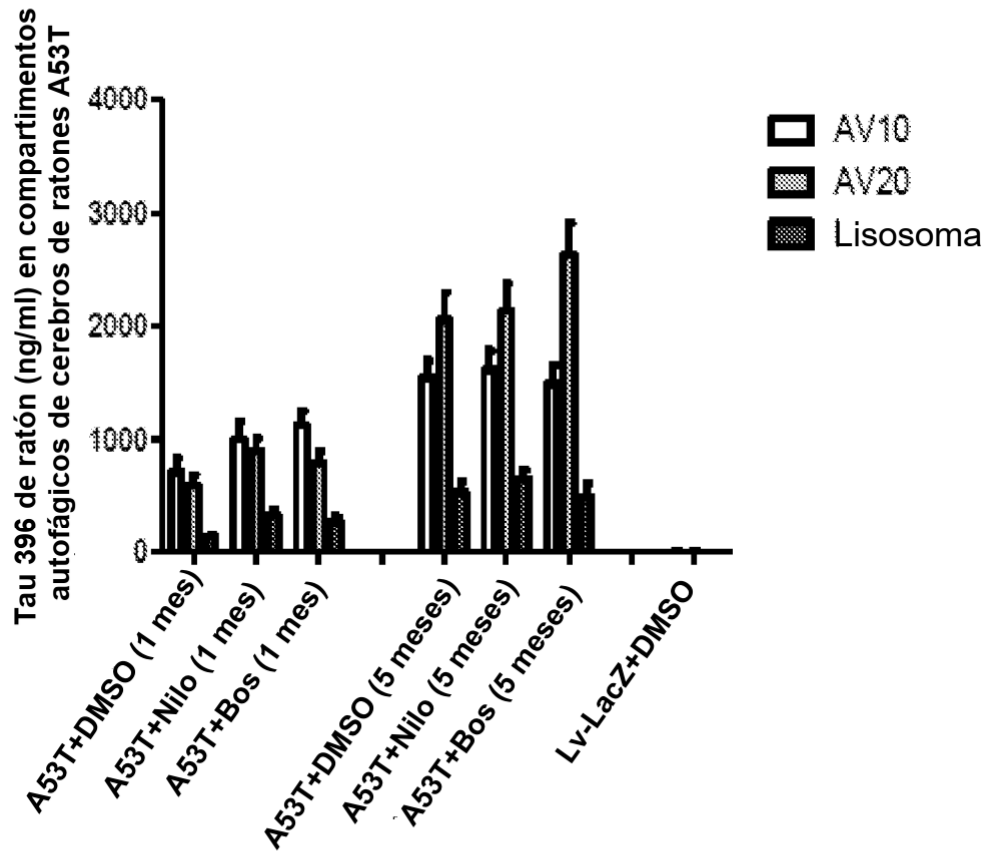


FIG. 25

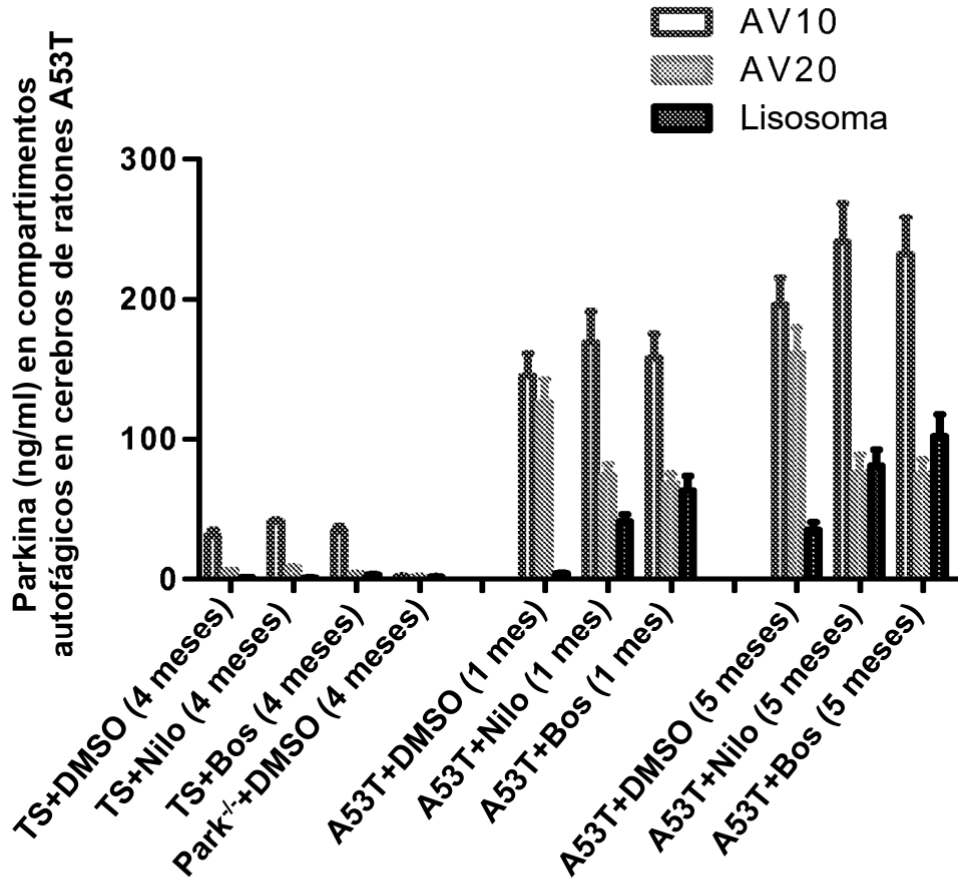


FIG. 26

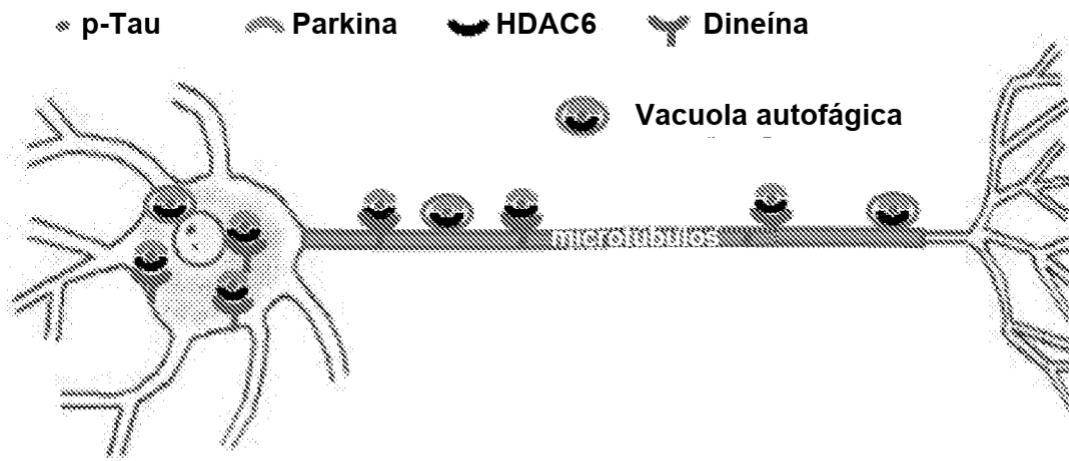
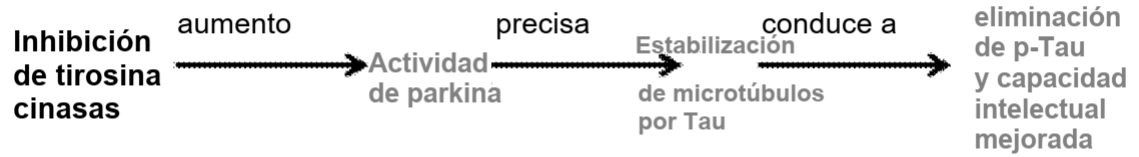


FIG. 27

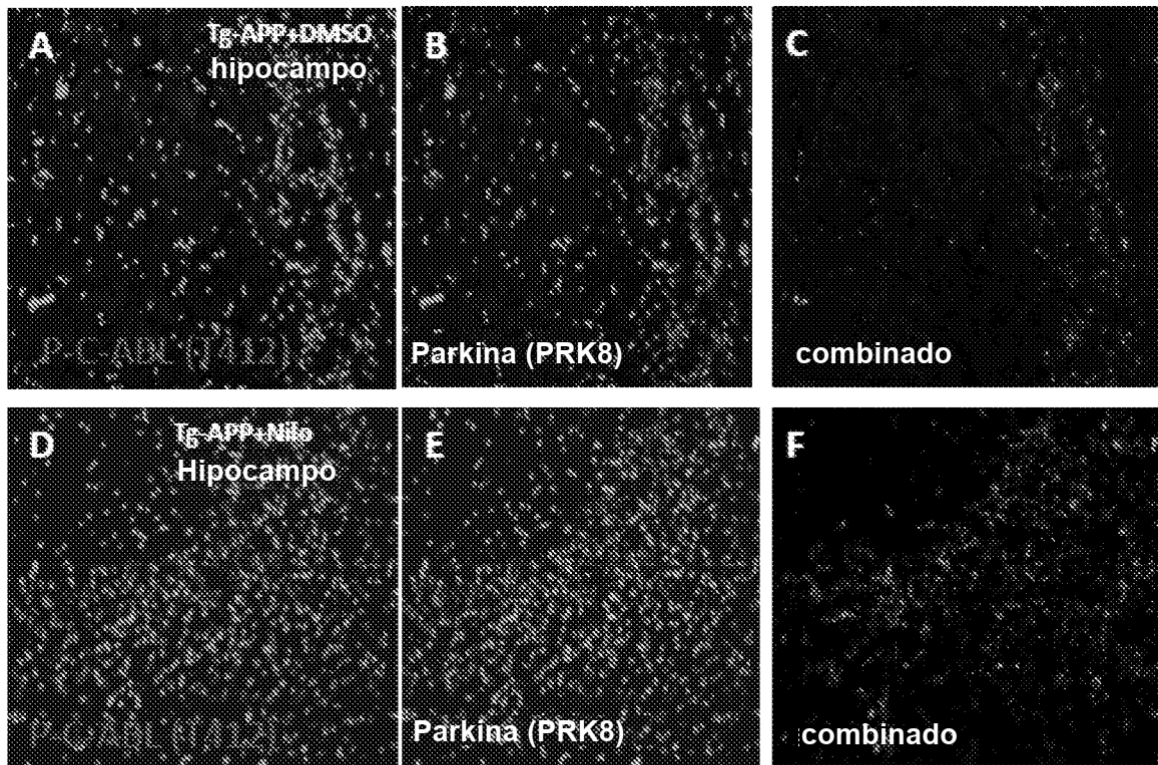


FIG. 28

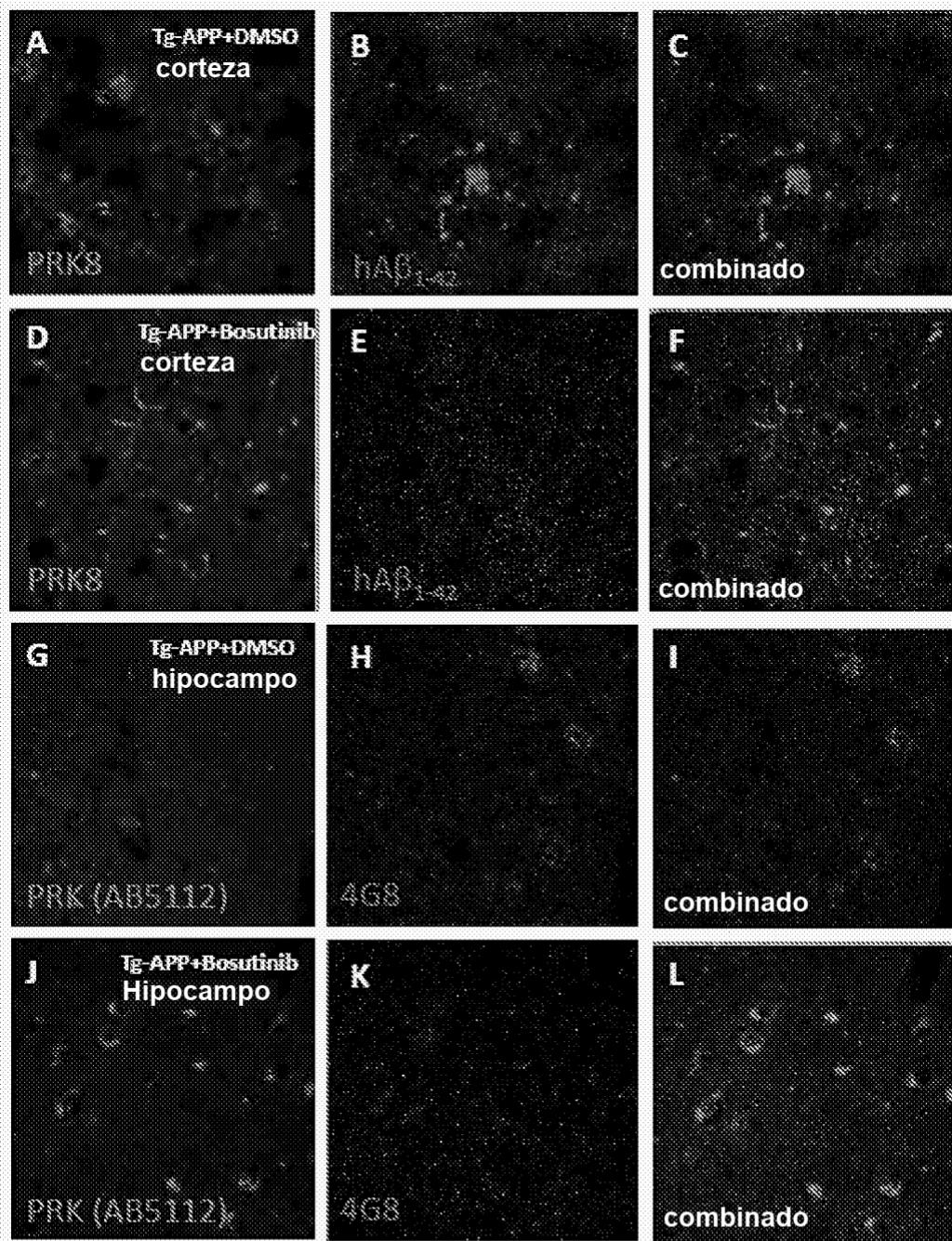


FIG. 29

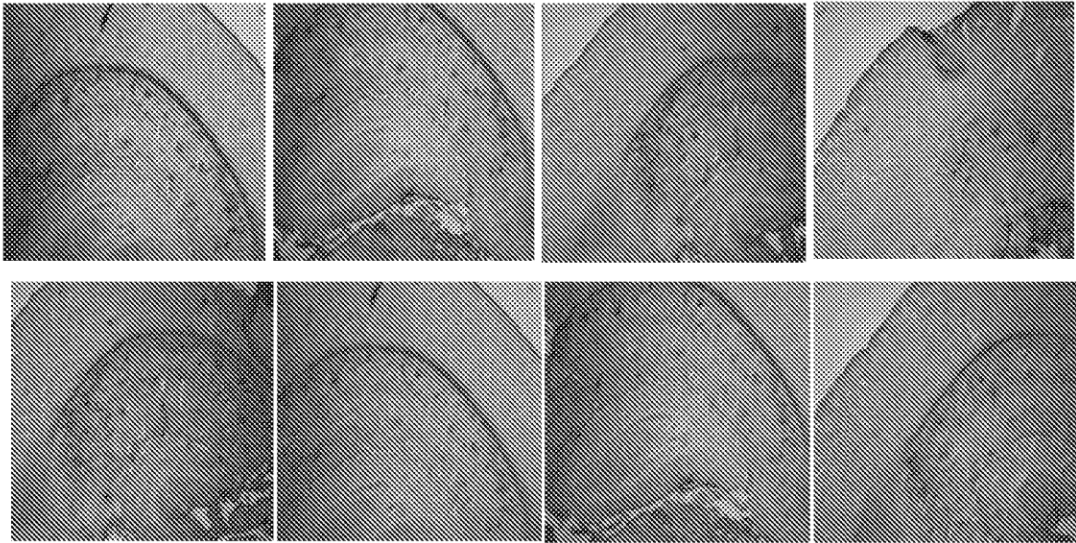


FIG. 30

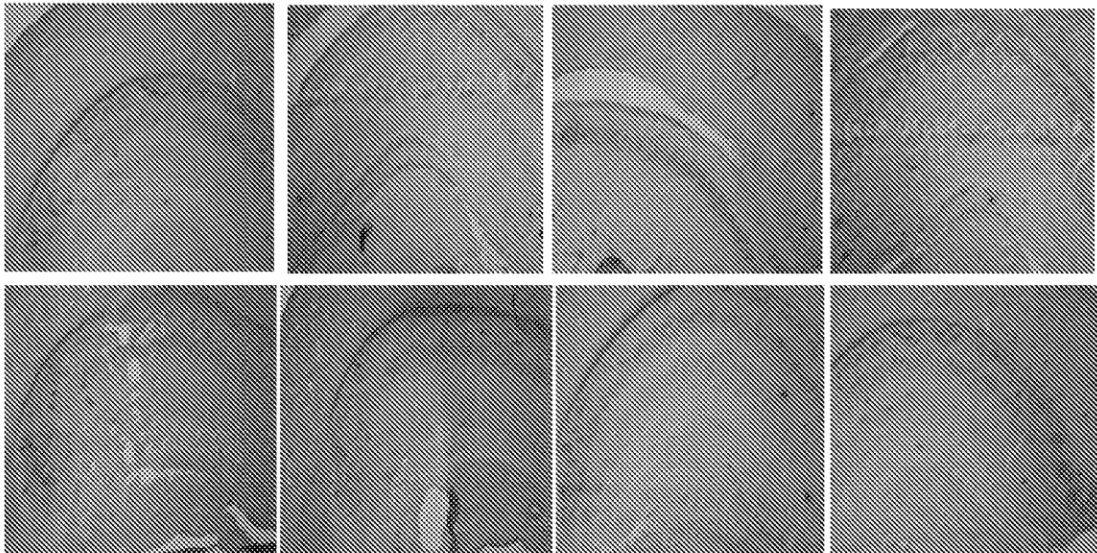


FIG. 31

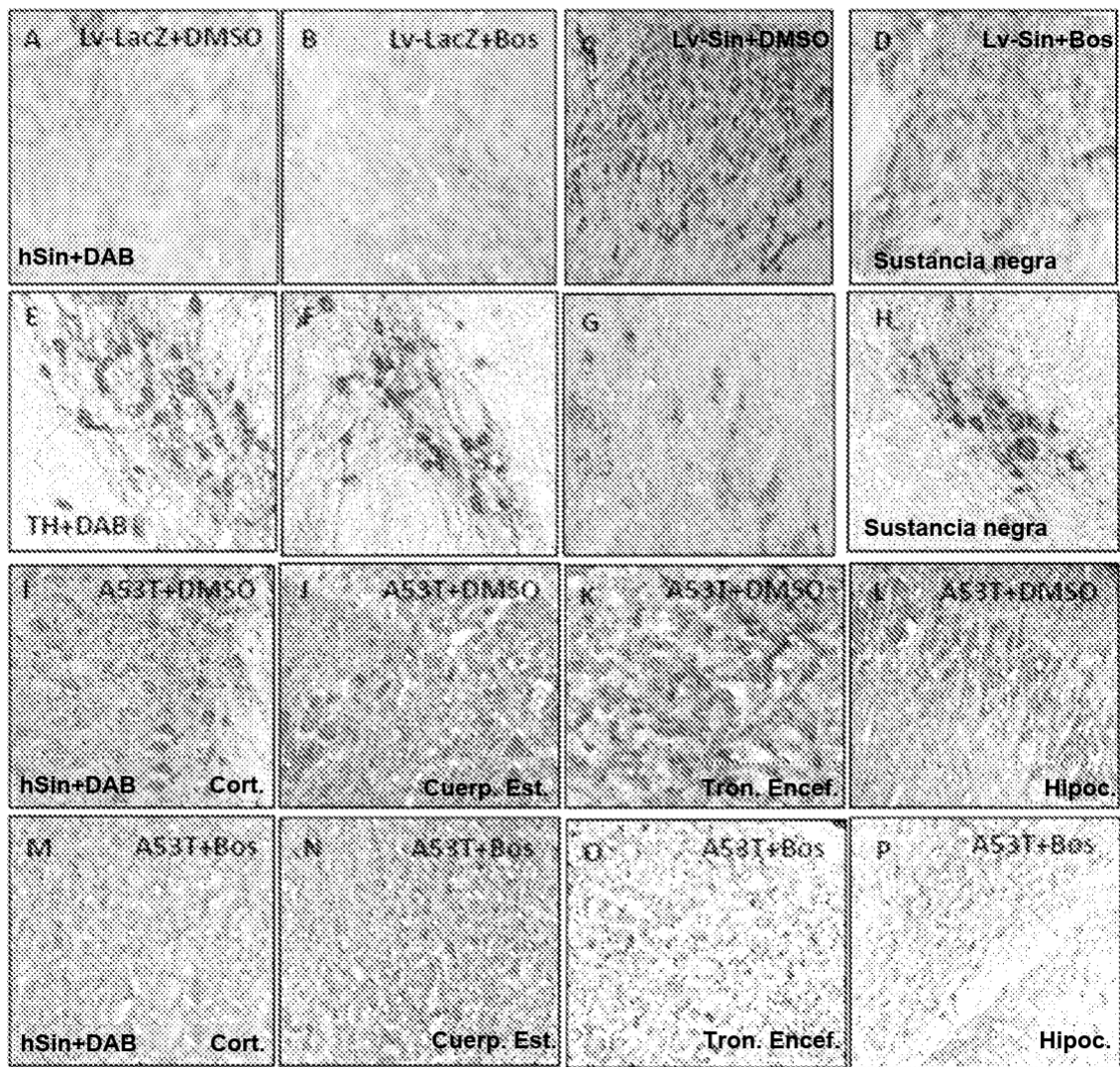
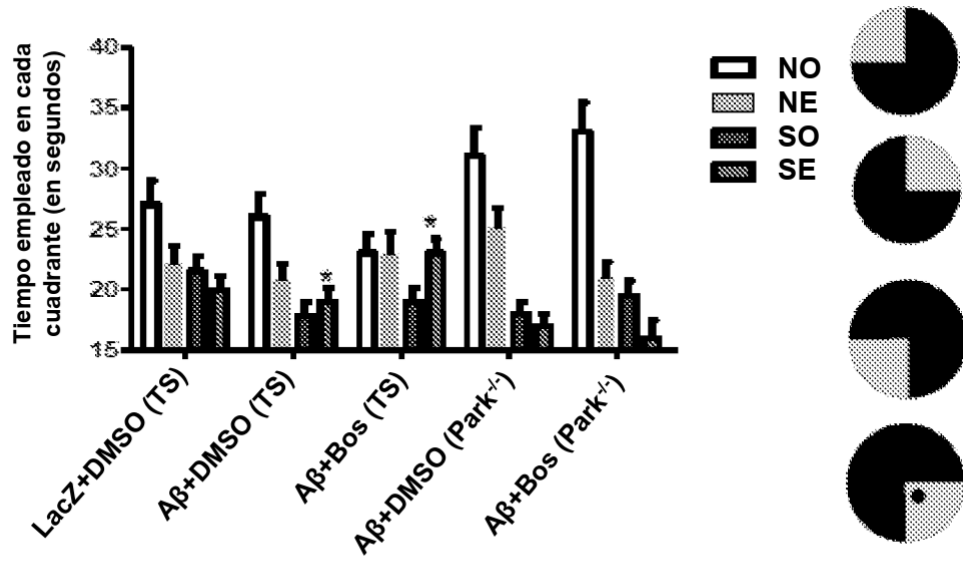


FIG. 32

A



B

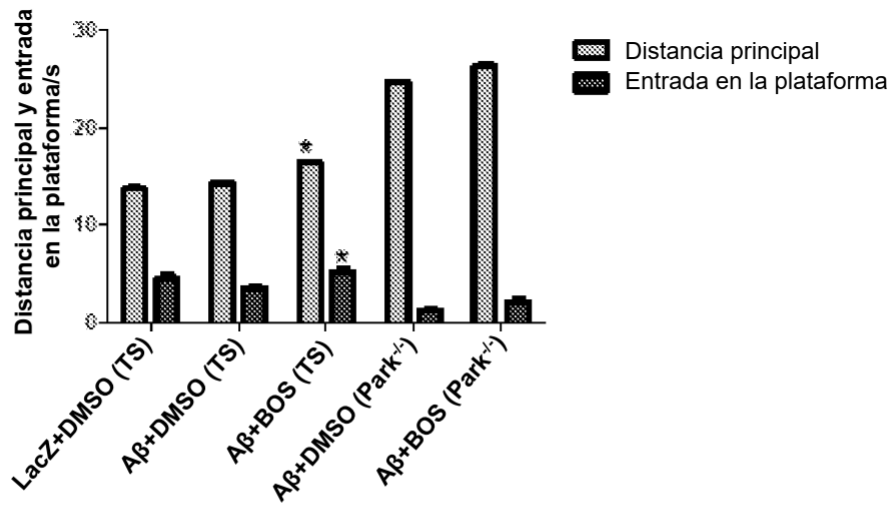
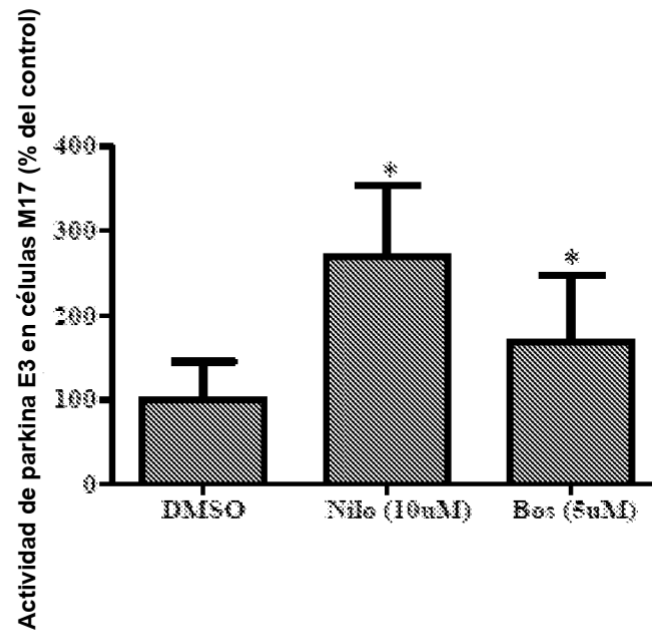


FIG. 33

A.



B.

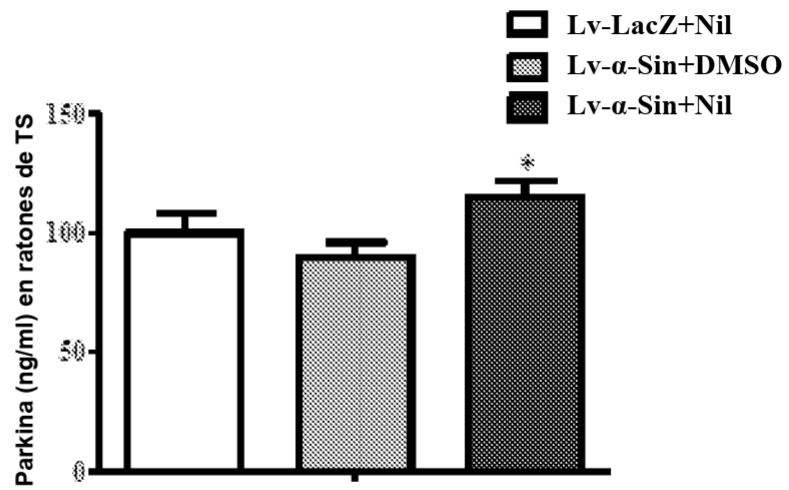


FIG. 34

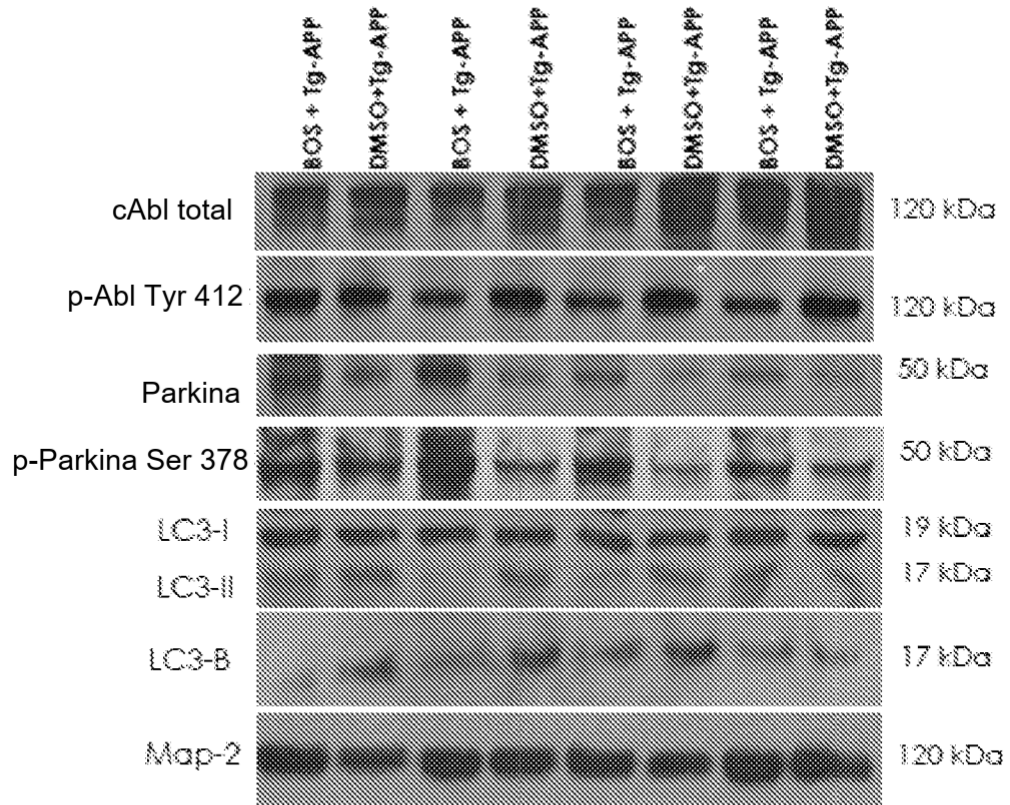


FIG. 35

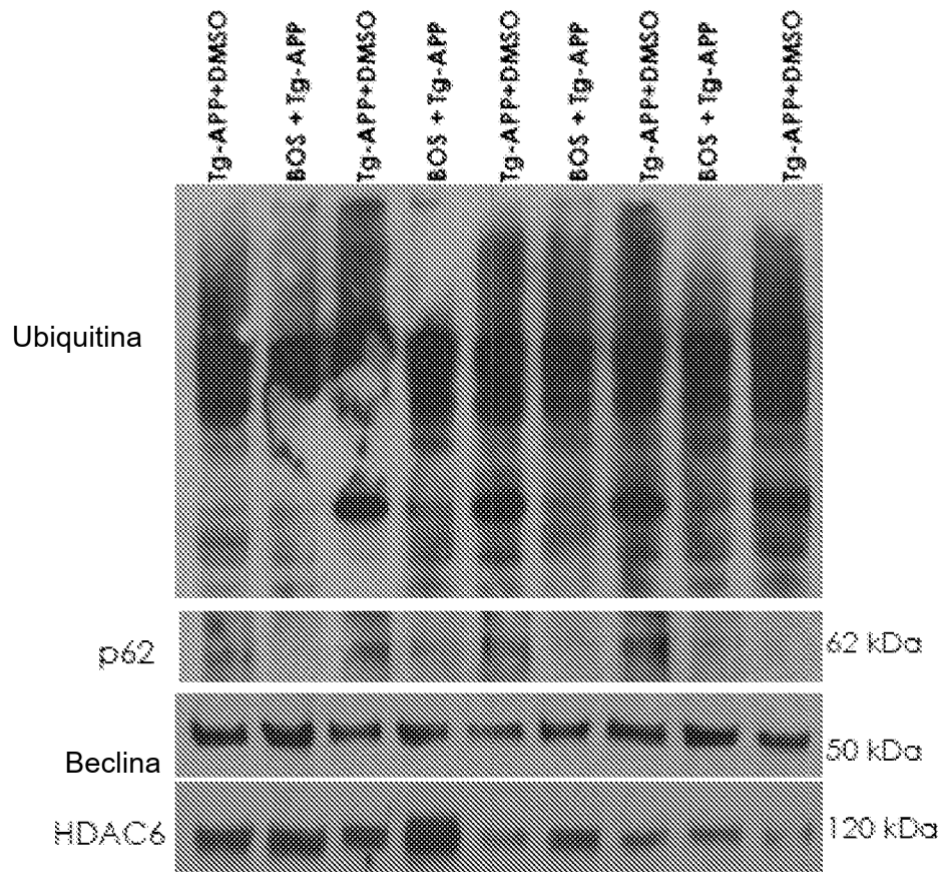


FIG. 36

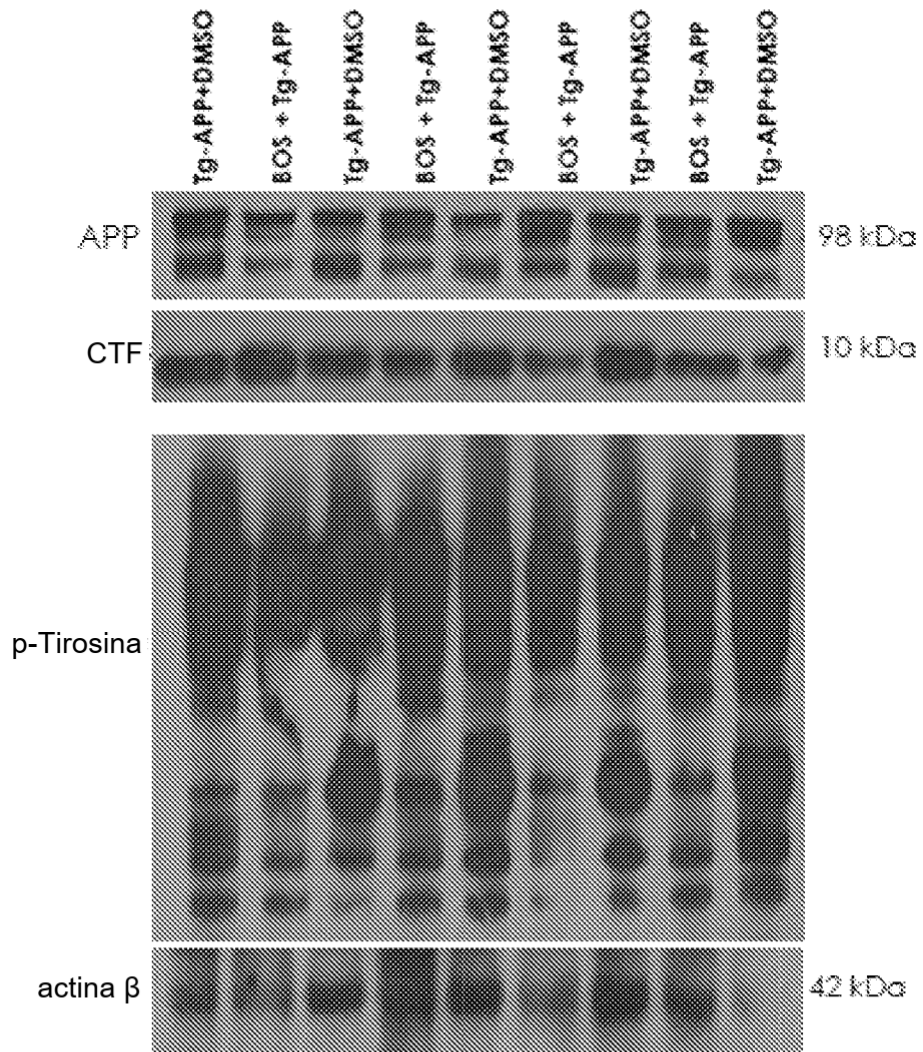


FIG. 37

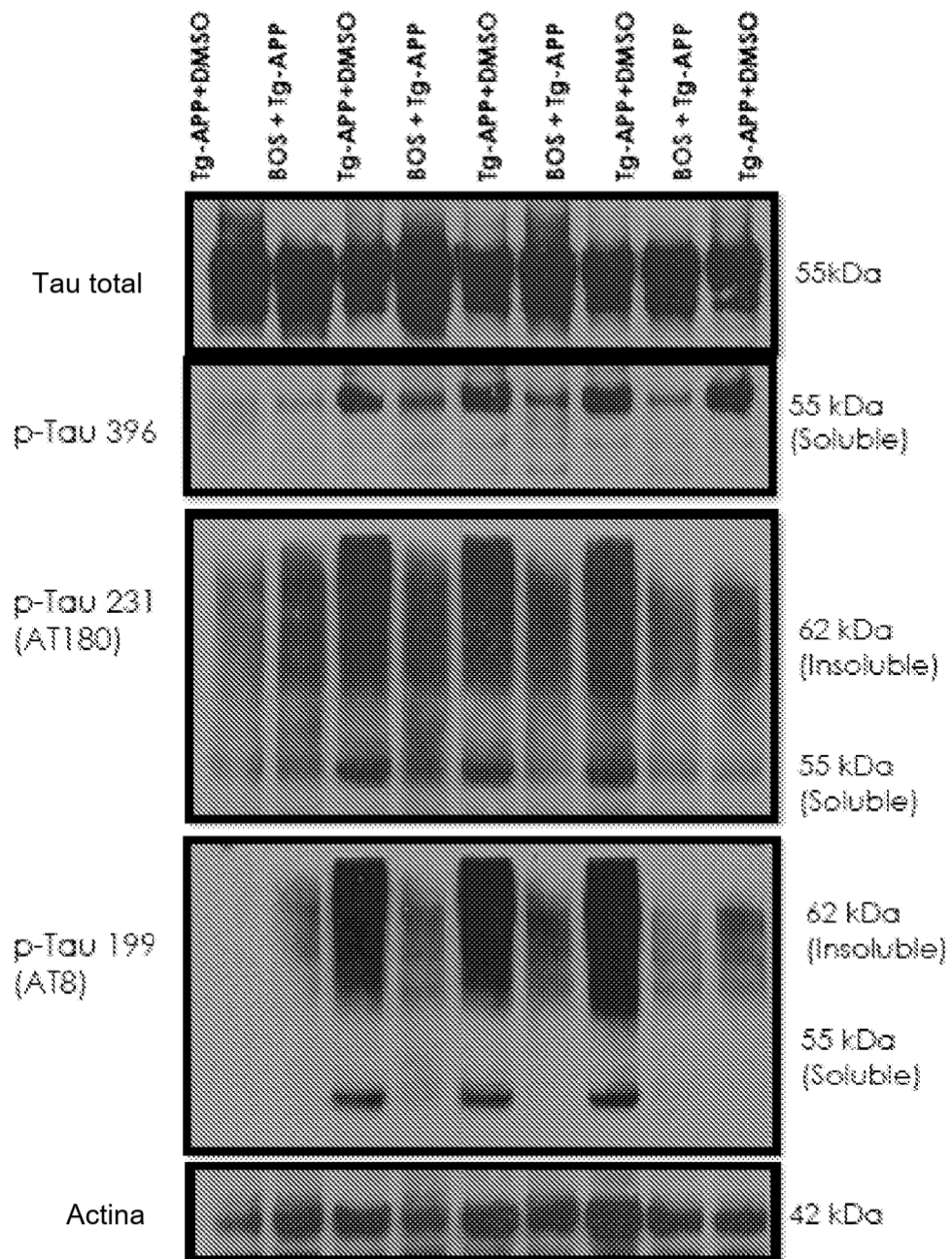


FIG. 38

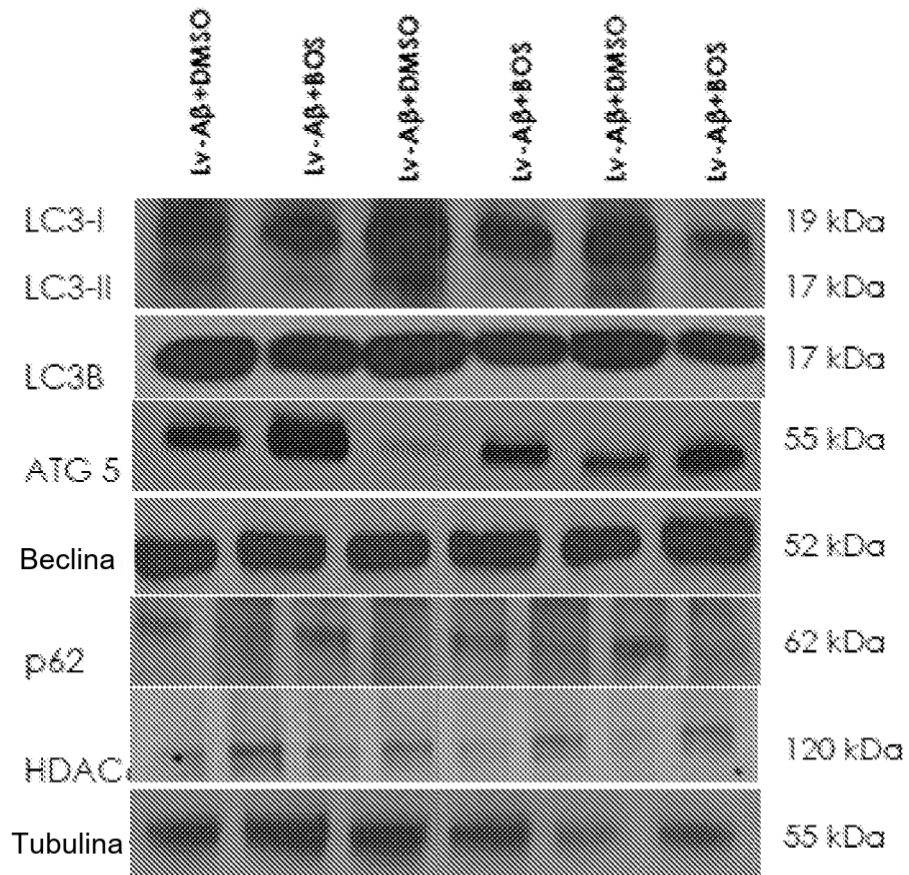


FIG. 39

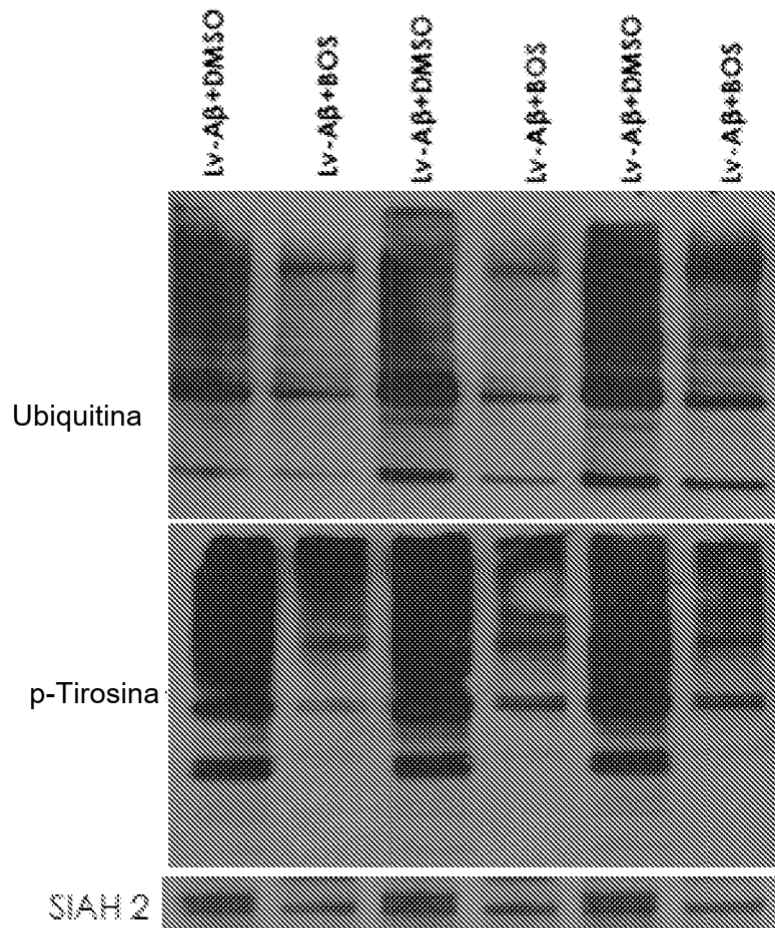


FIG. 40

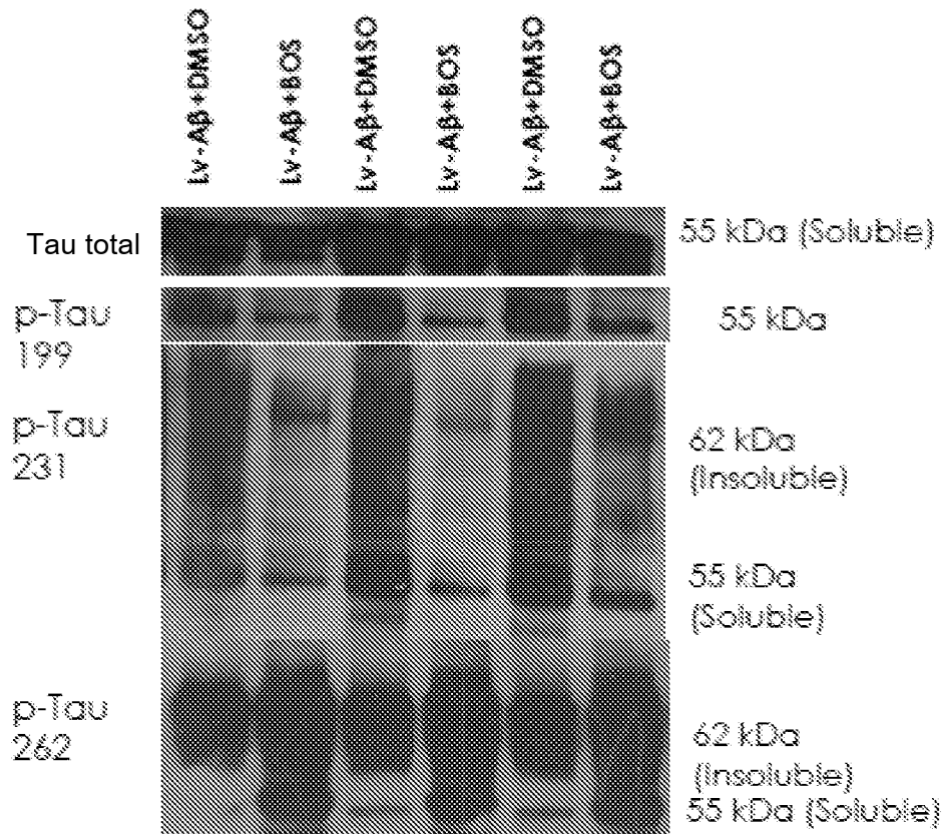


FIG. 41

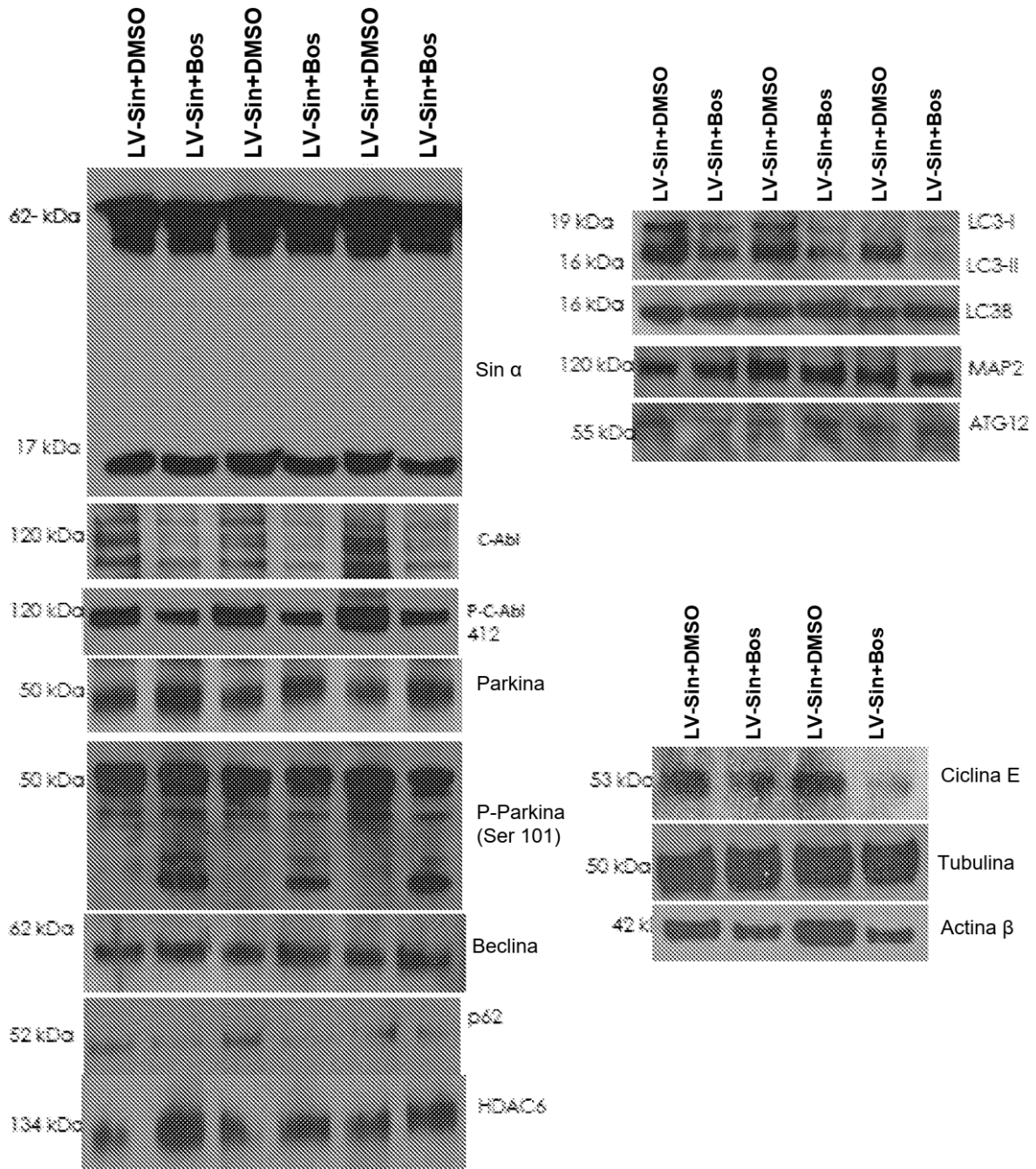


FIG. 42

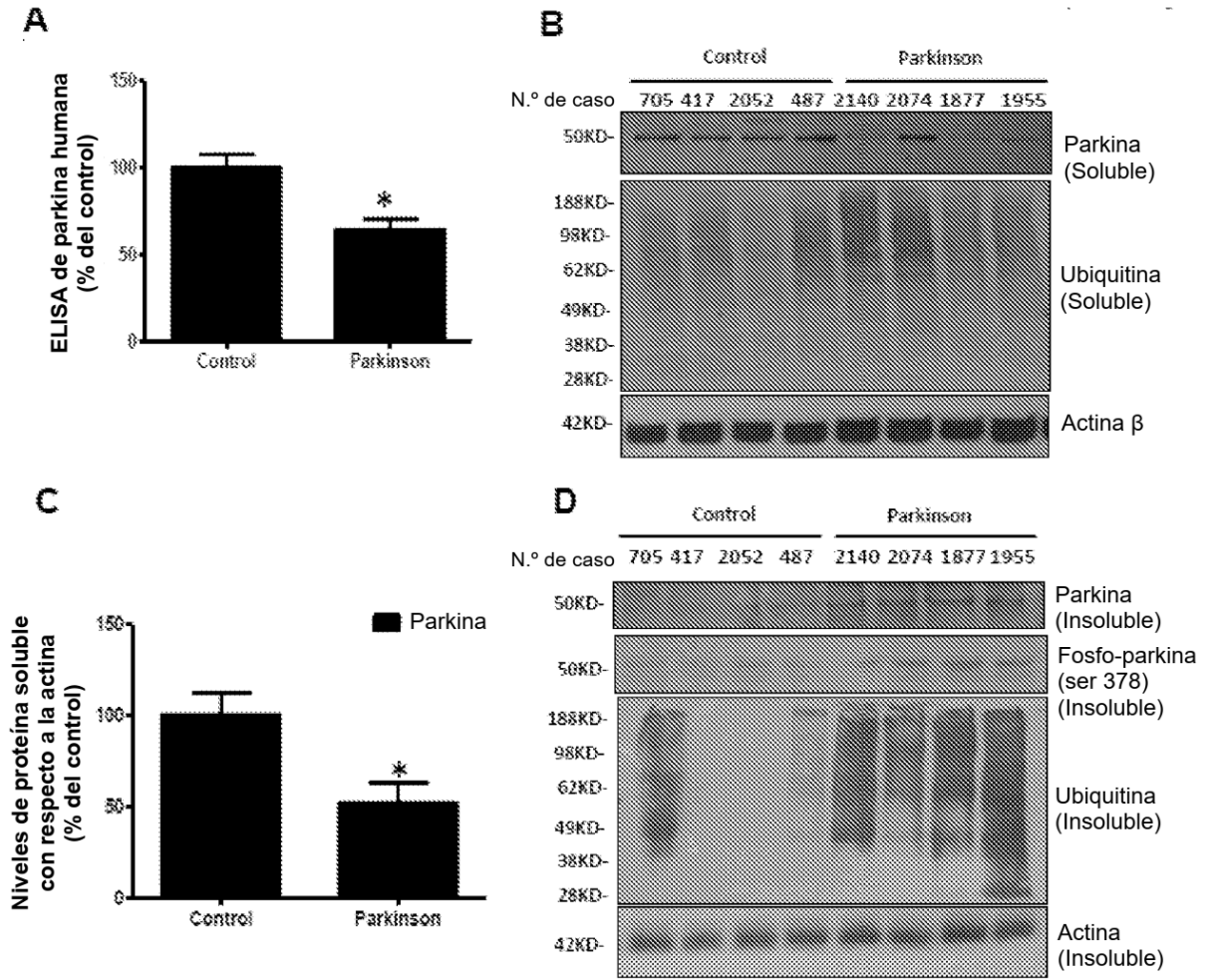
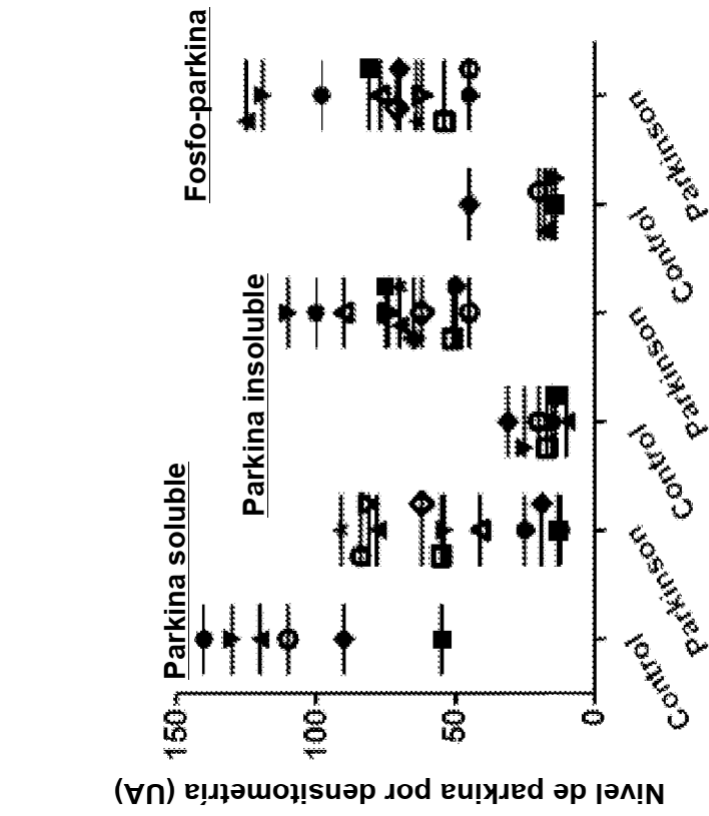
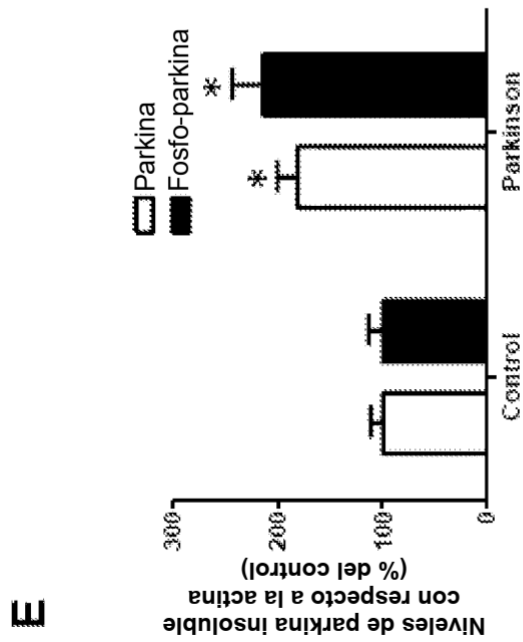


FIG. 43



F



E

FIG. 43 (cont.)

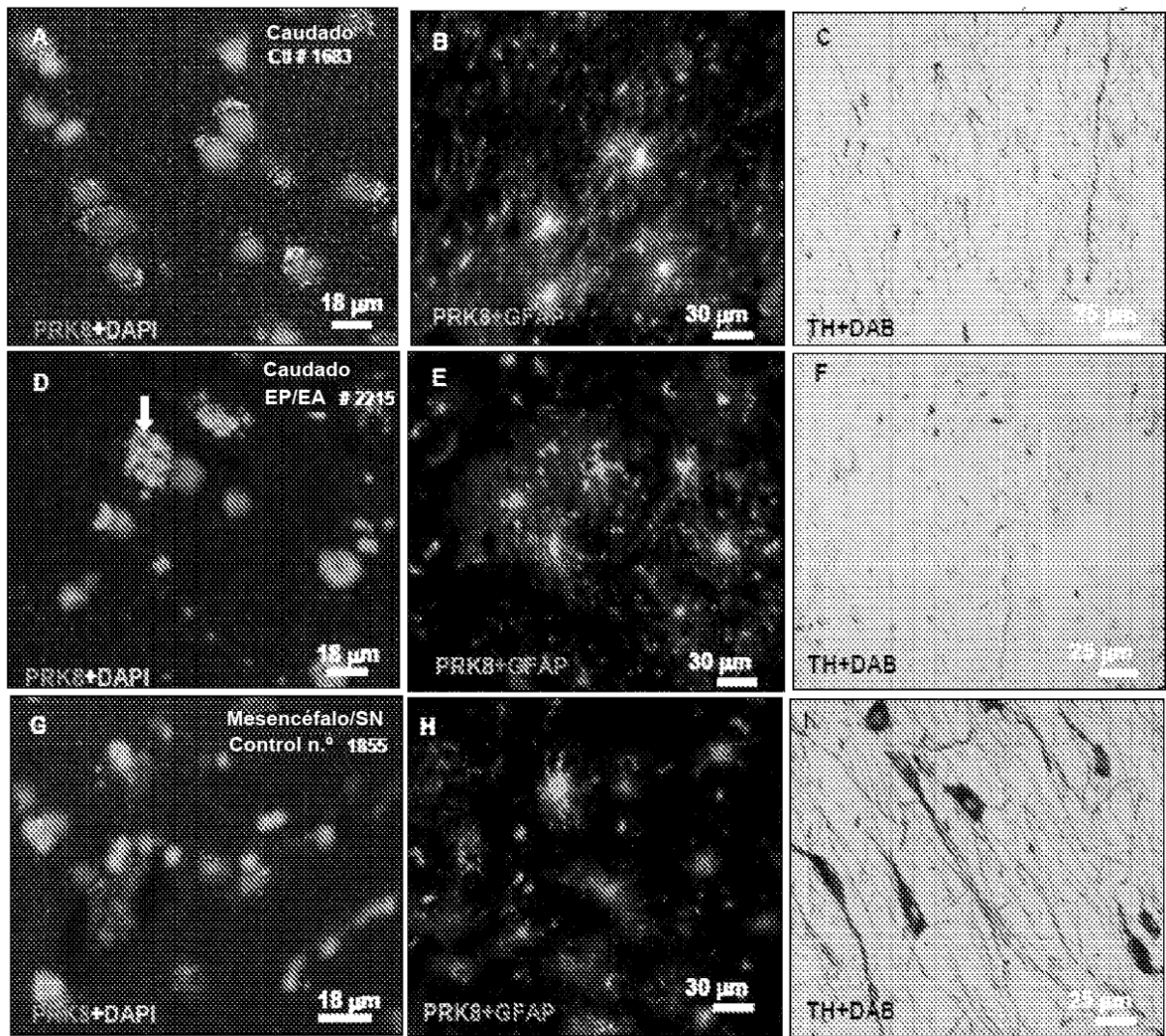


FIG. 44

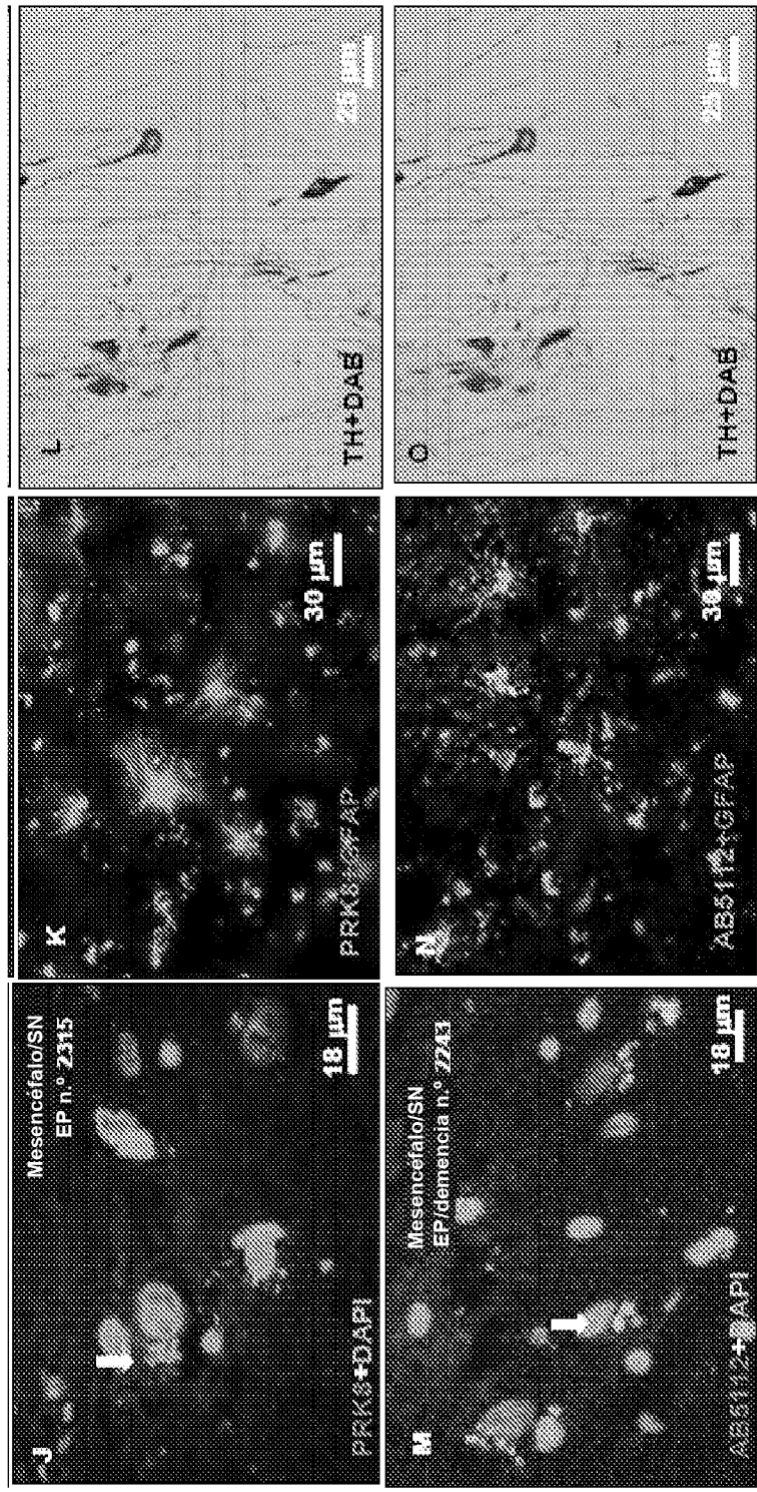


FIG. 44 (cont.)

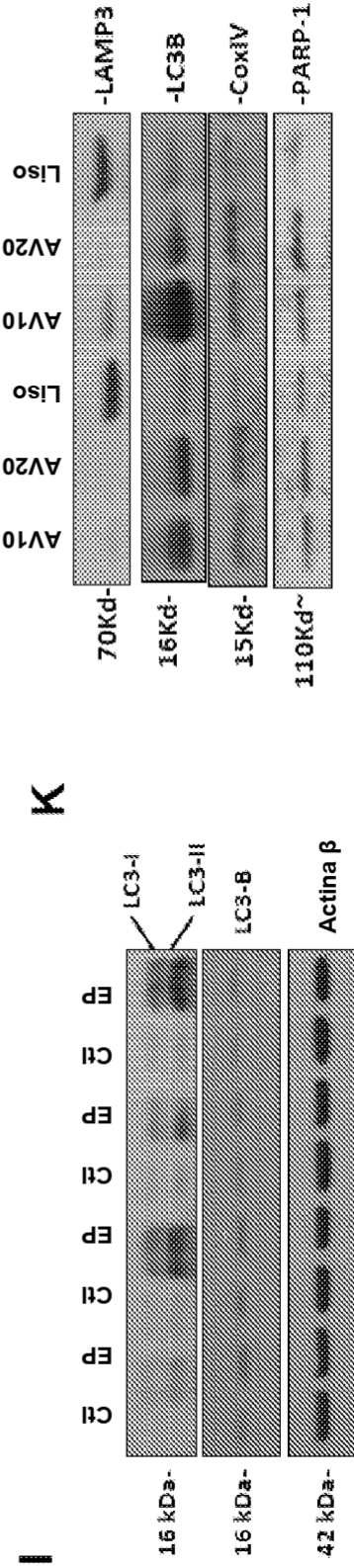
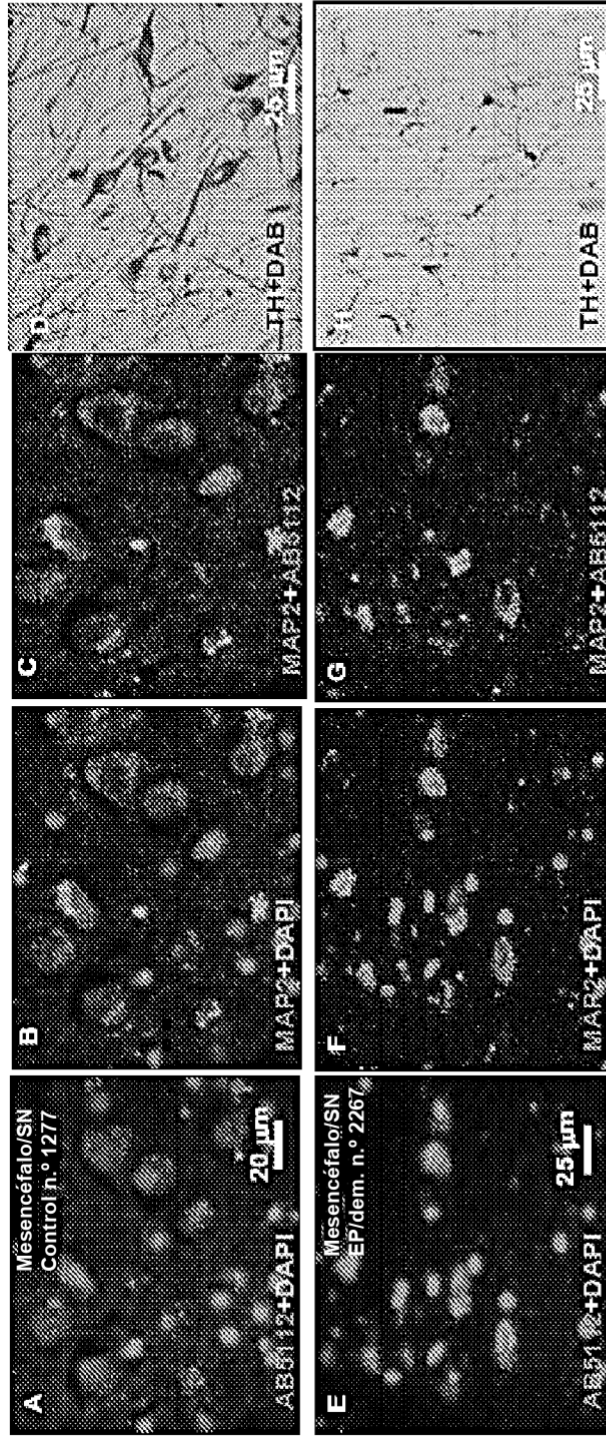


FIG. 45

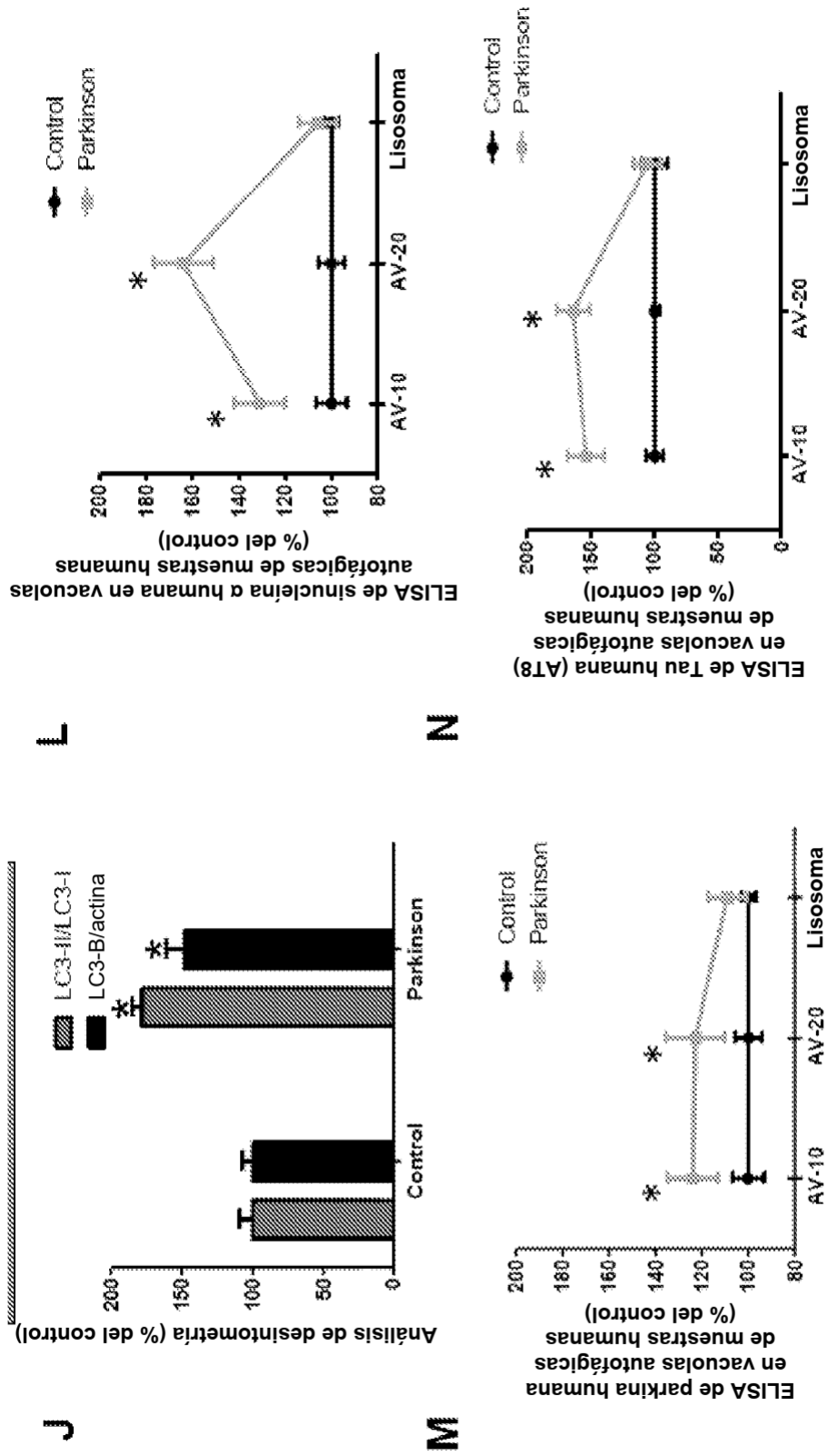


FIG. 45 (cont.)

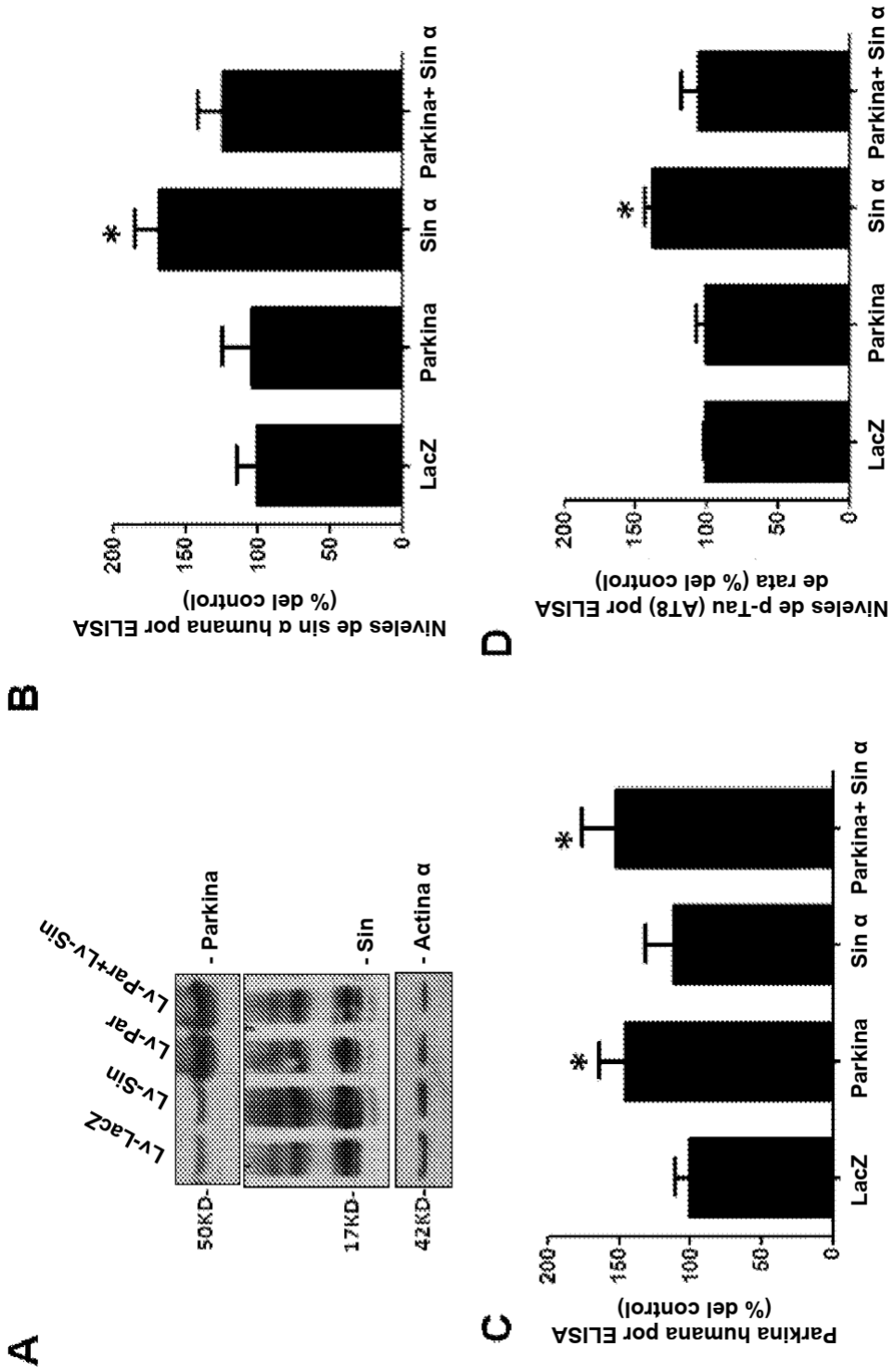


FIG. 46

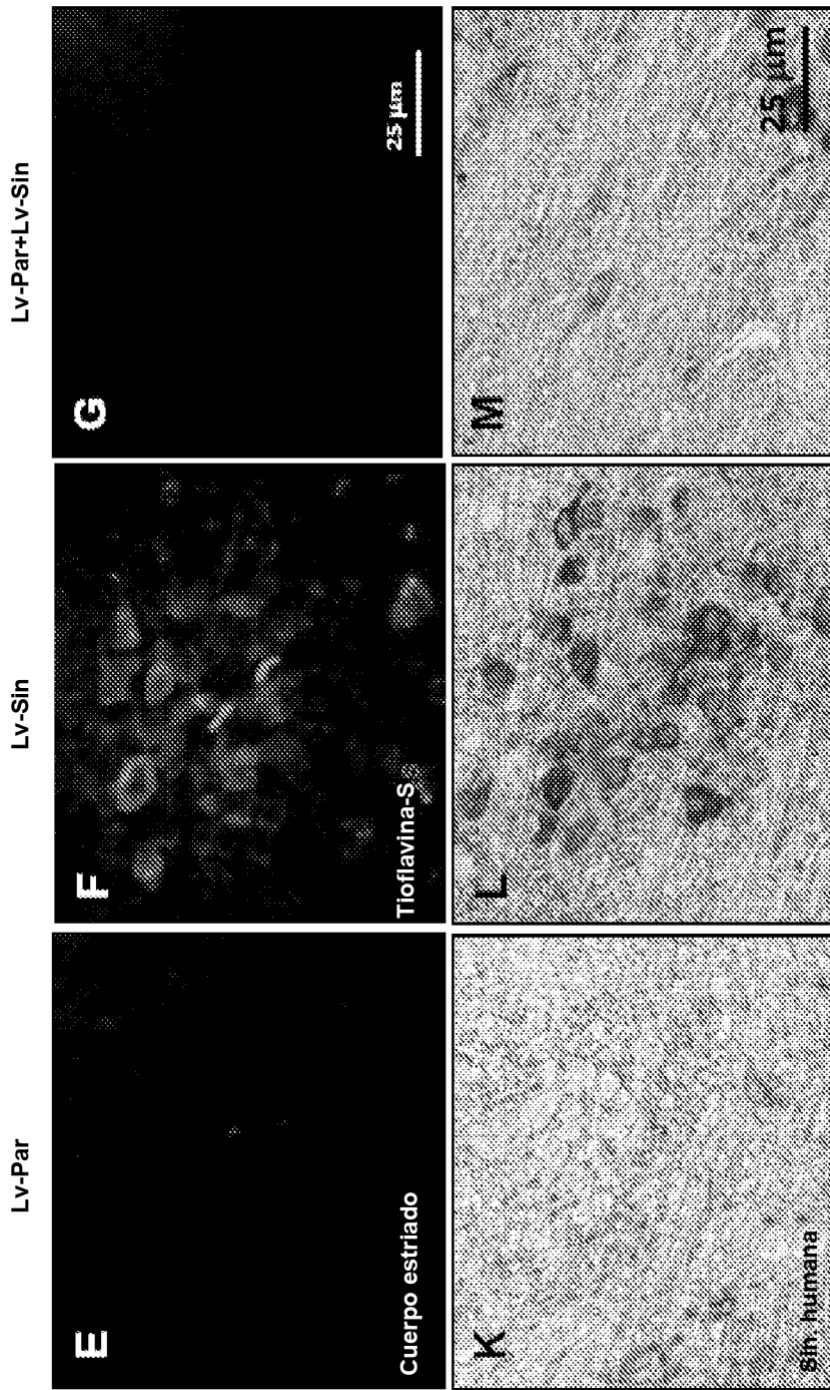


FIG. 46(cont.)

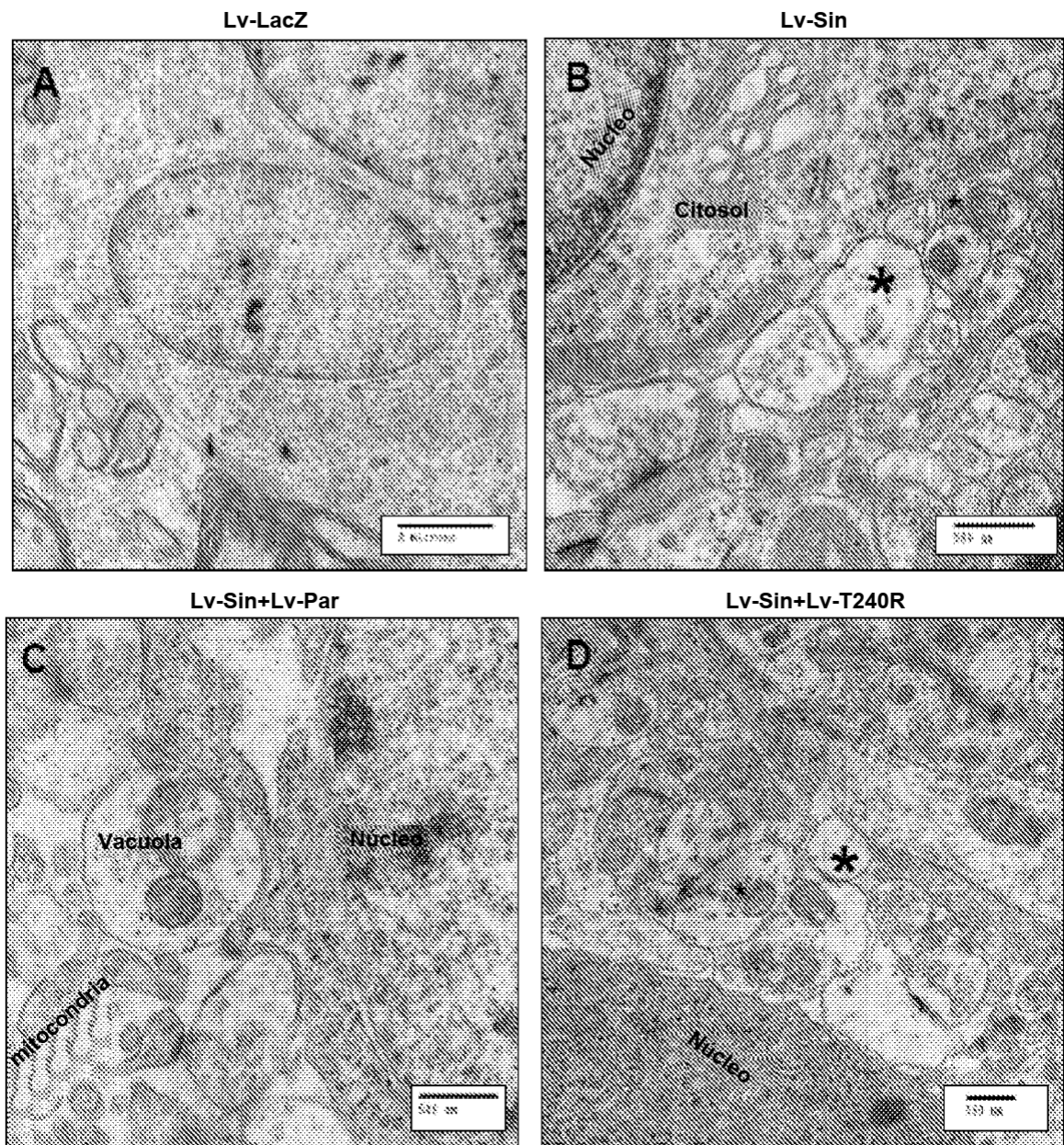


FIG. 47

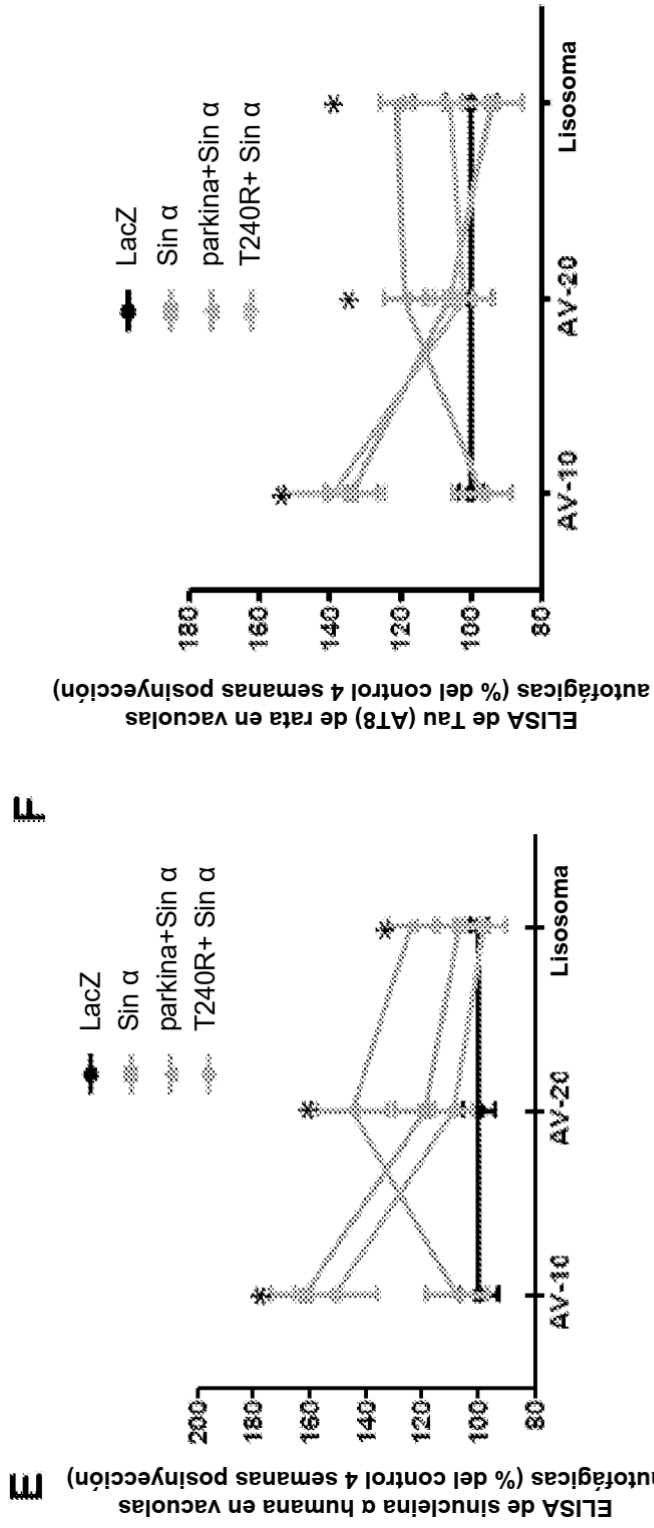


FIG. 47 (cont.)

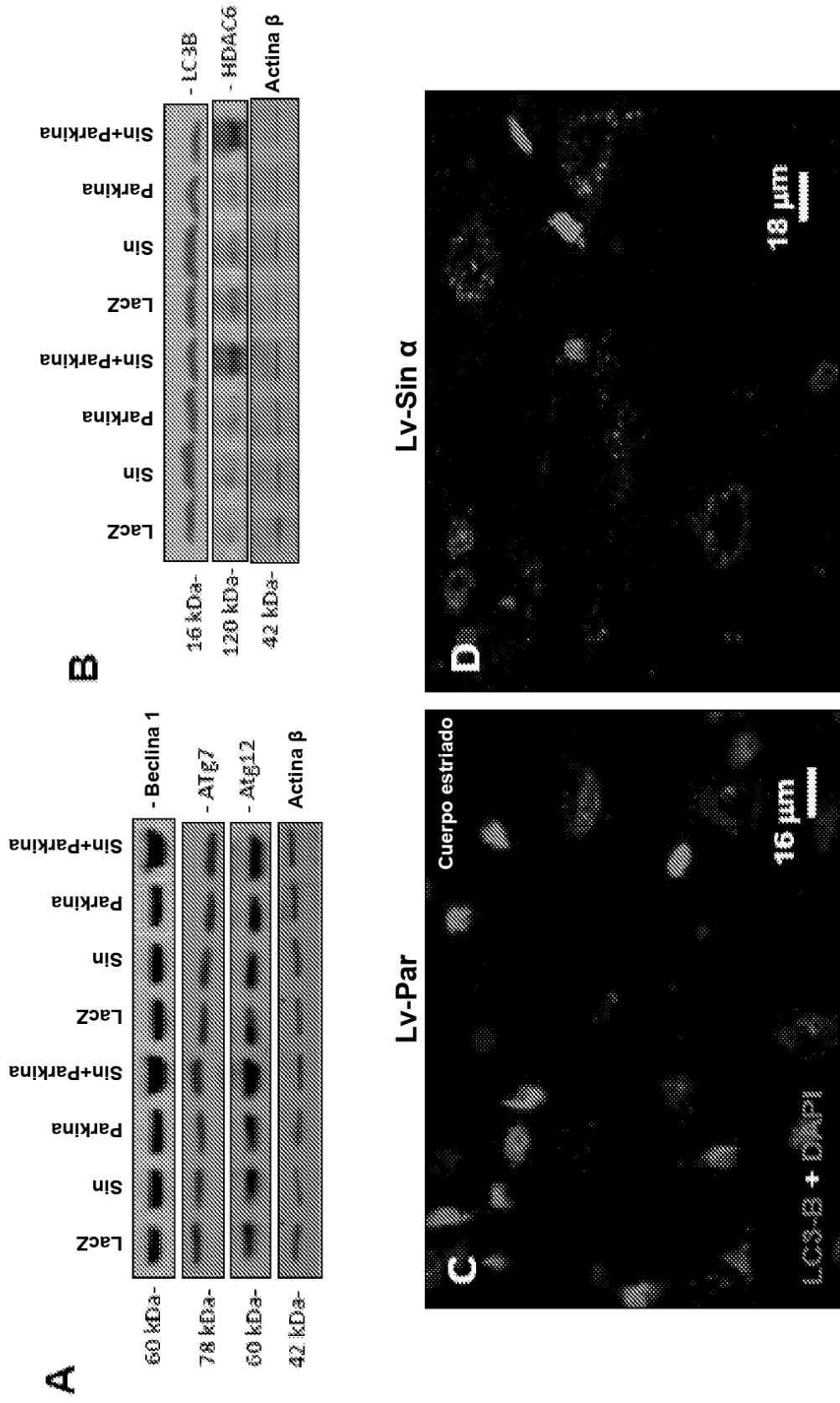


FIG. 48

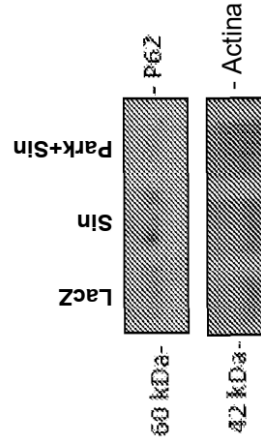
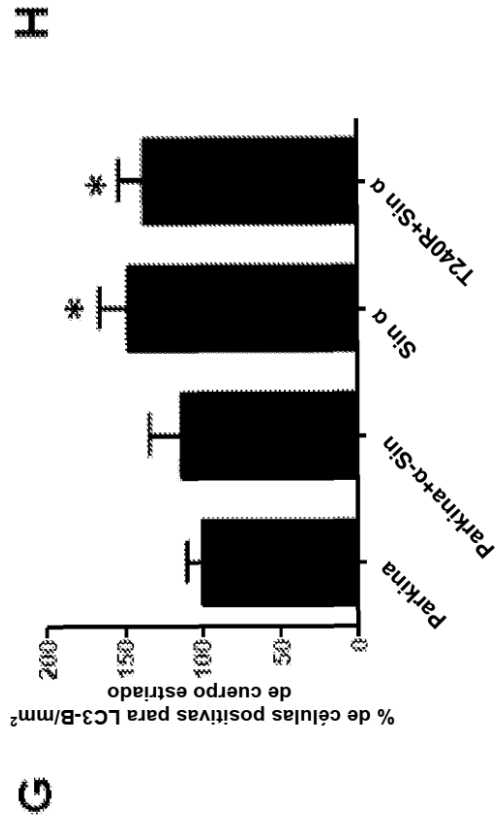
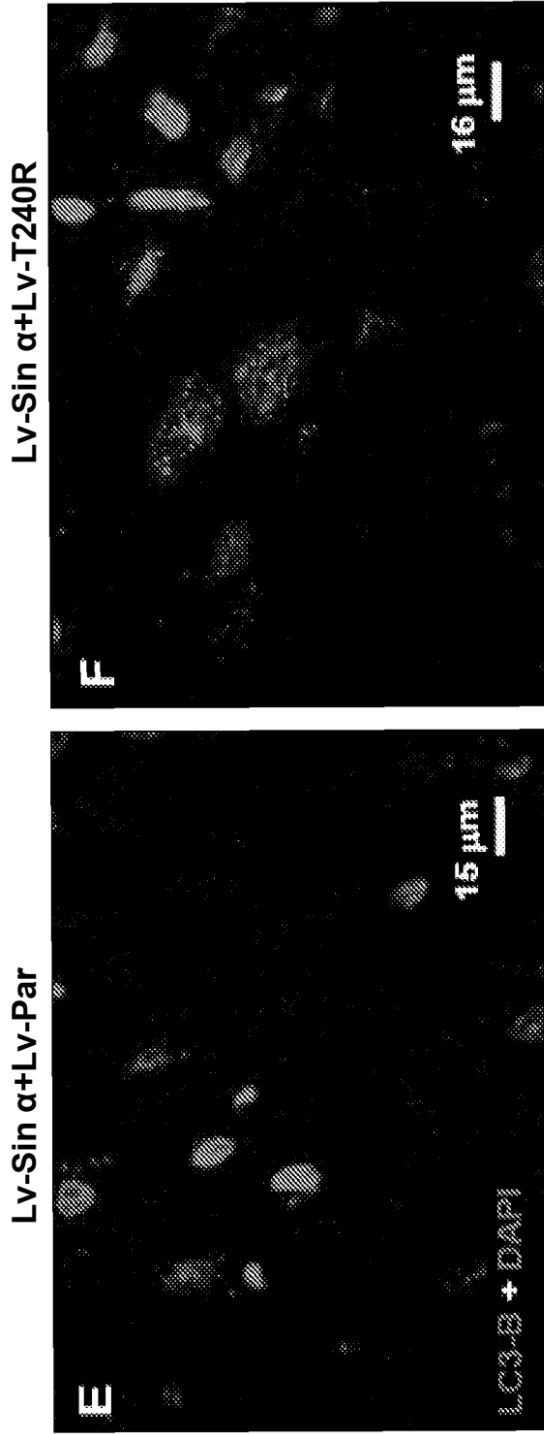


FIG. 48 (cont.)

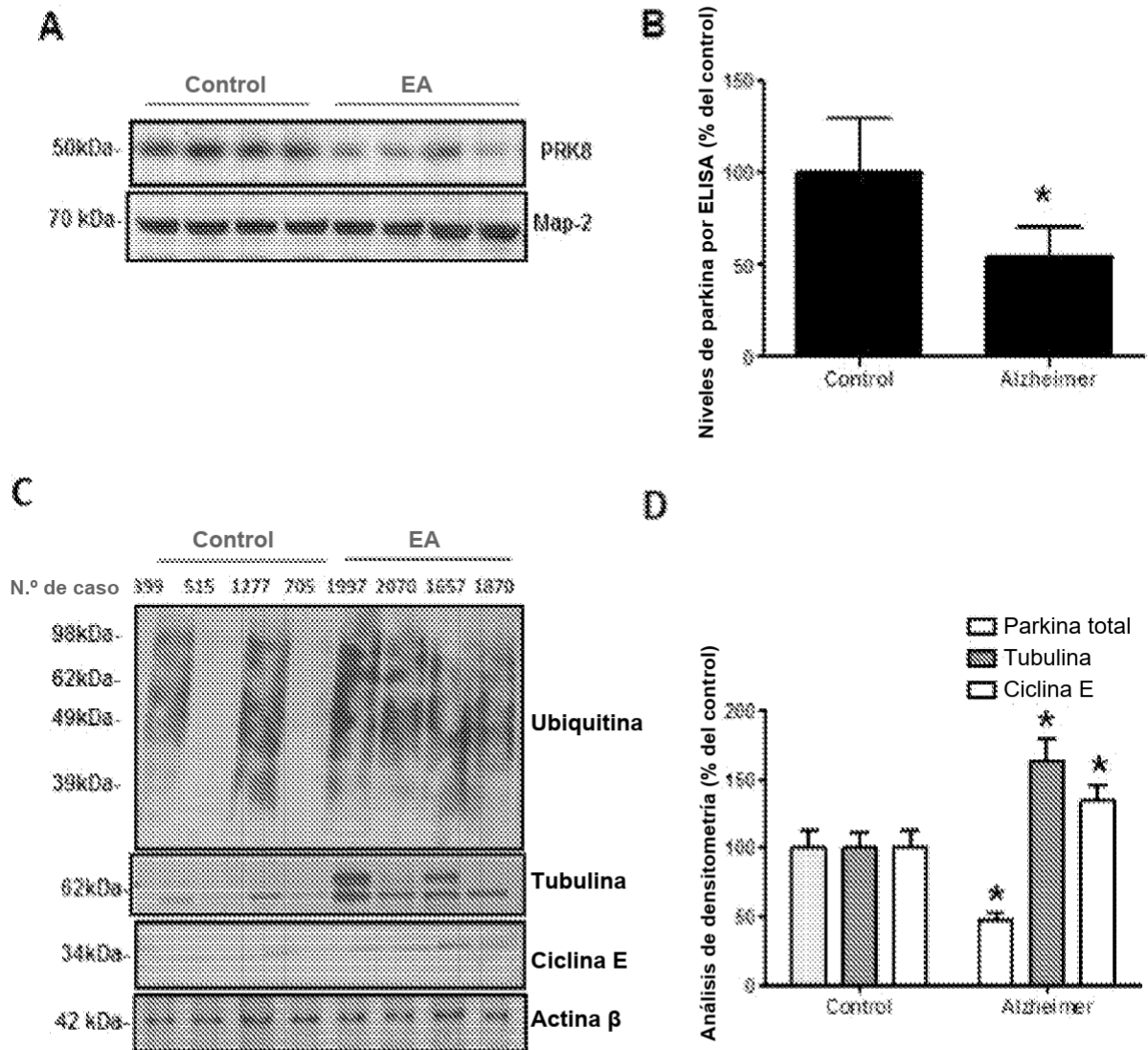


FIG. 49

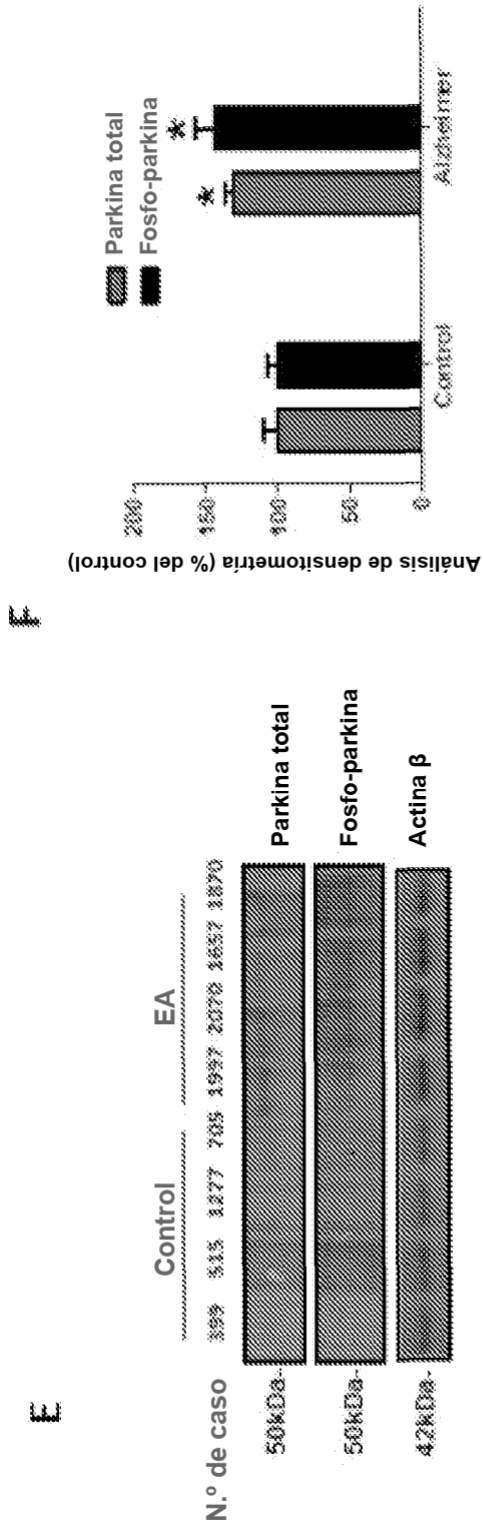


FIG. 49 (cont.)

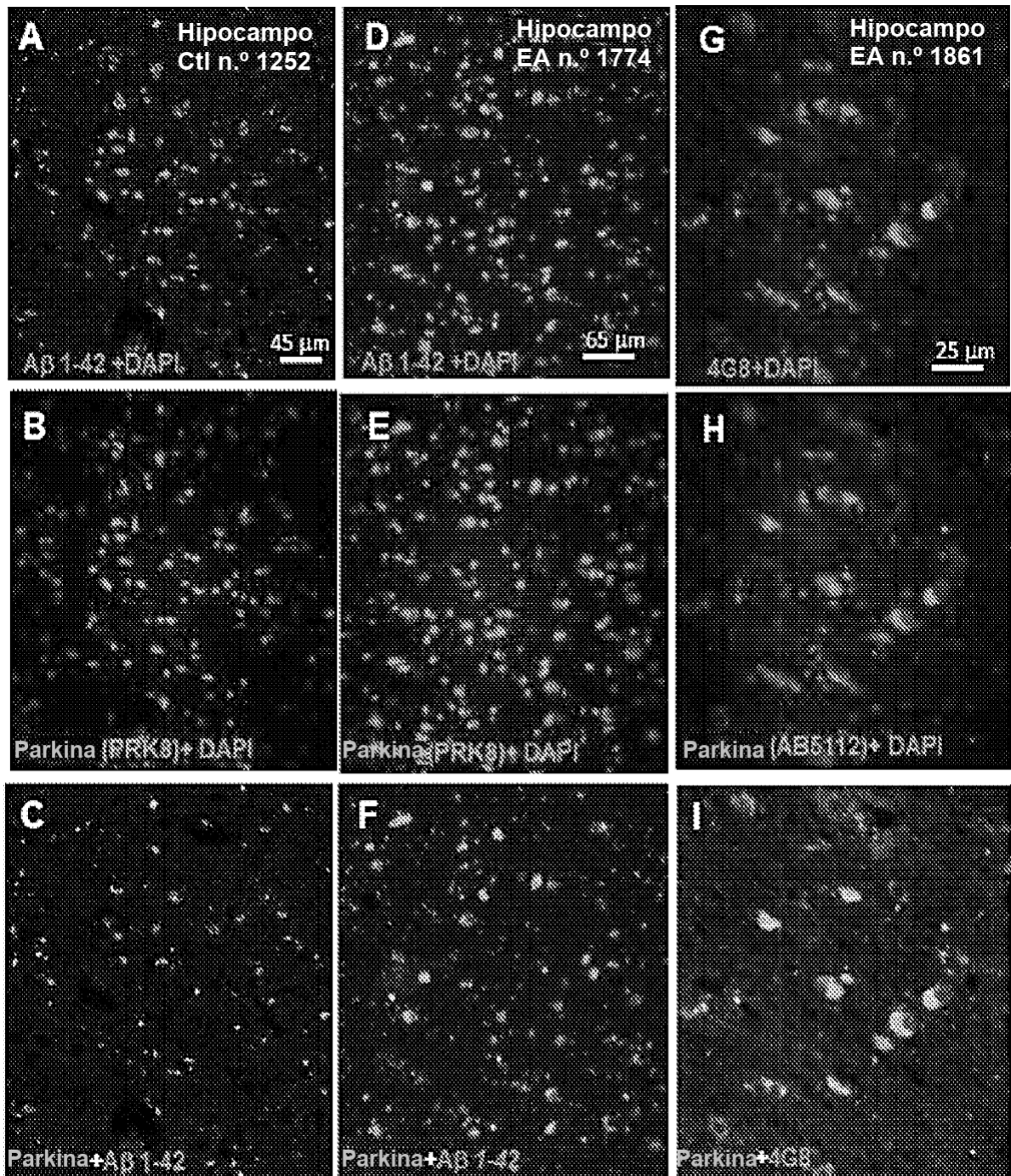


FIG. 50

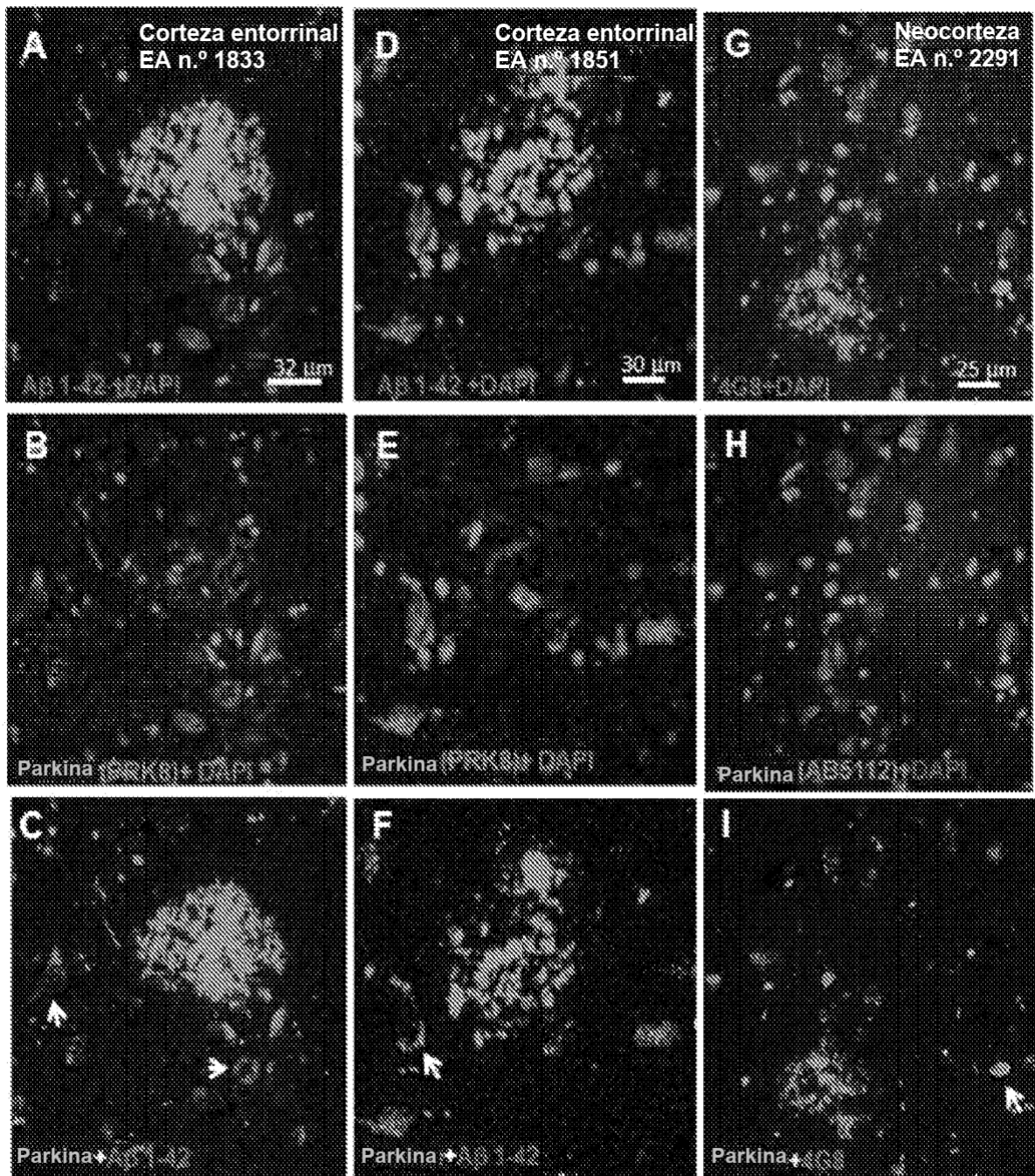


FIG. 51

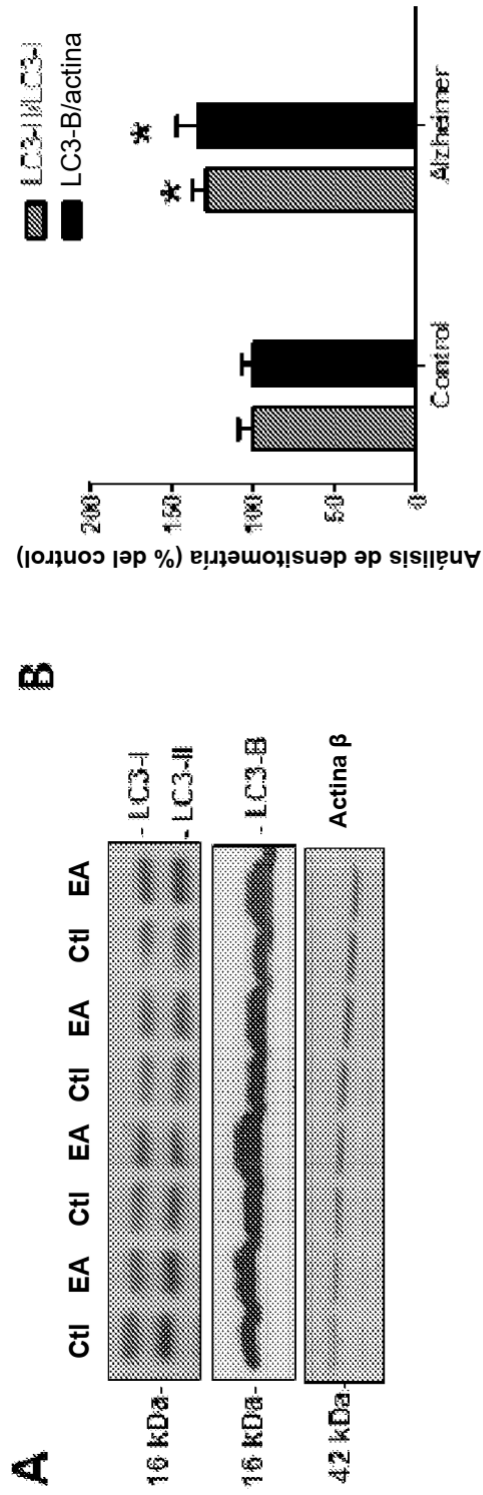


FIG. 52

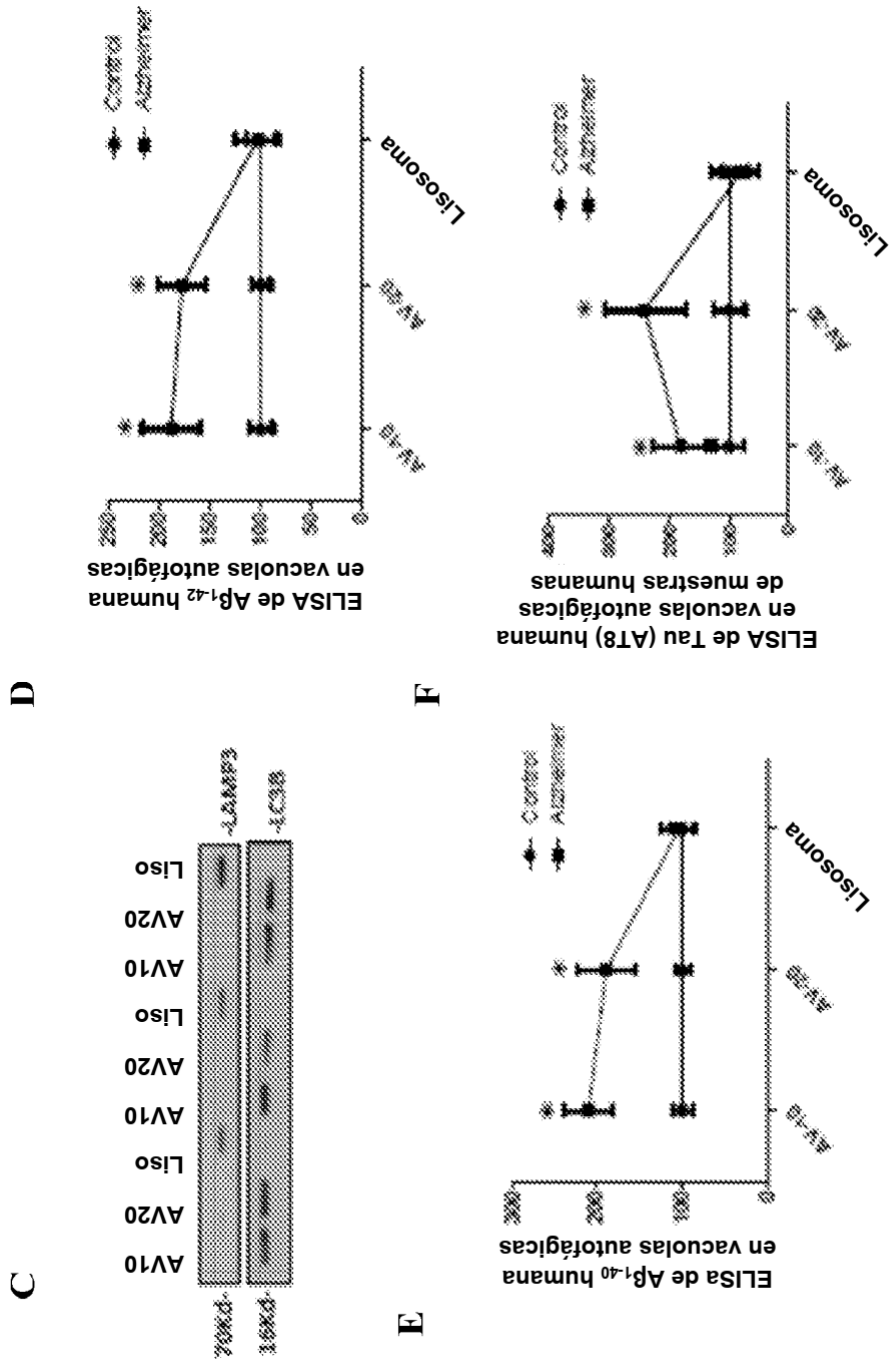


FIG. 52 (cont.)

G

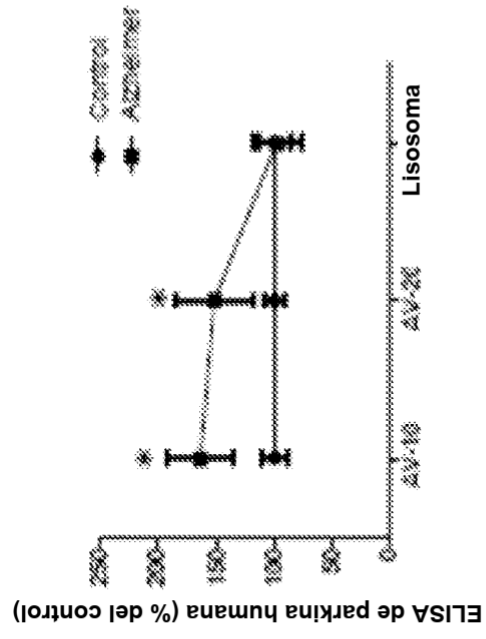


FIG. 52 (cont.)

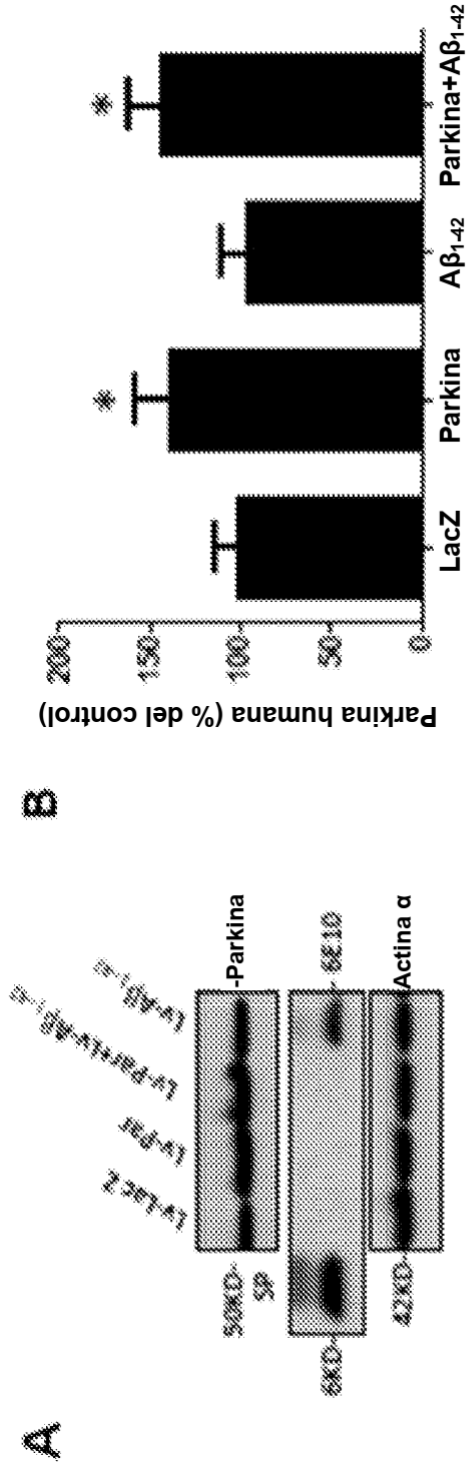
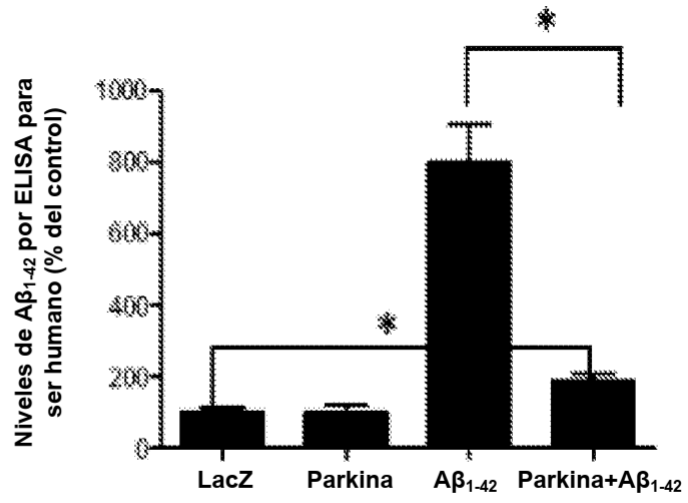


FIG. 53

C



D

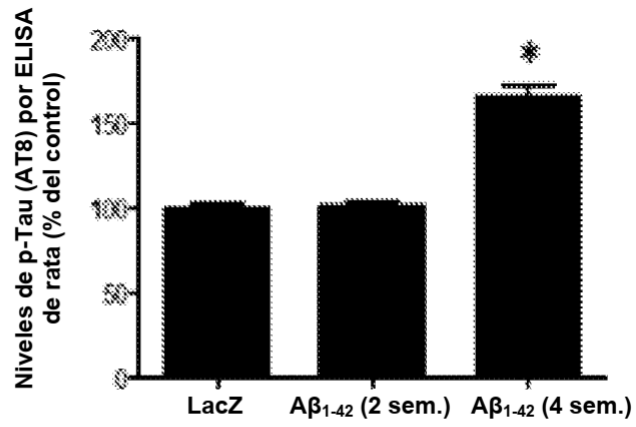


FIG. 53(cont.)

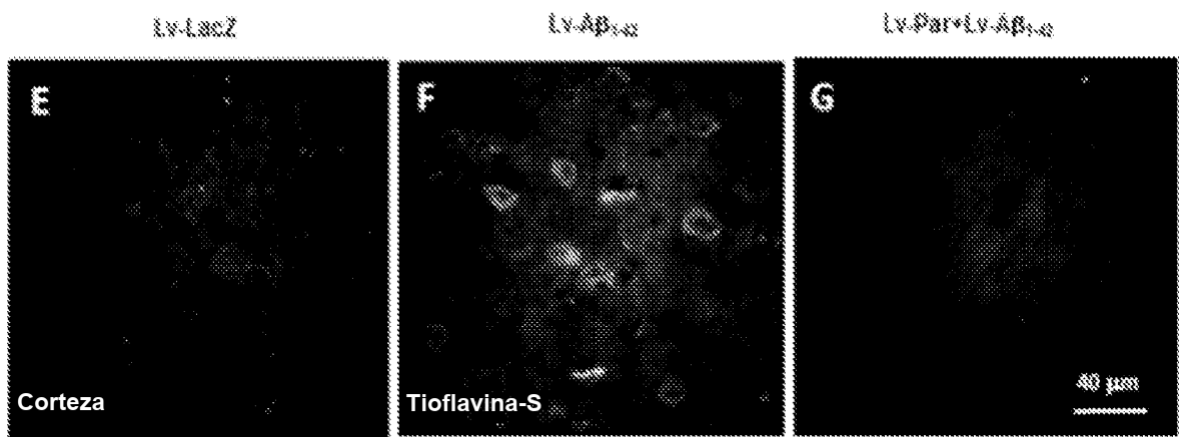


FIG. 53 (cont.)

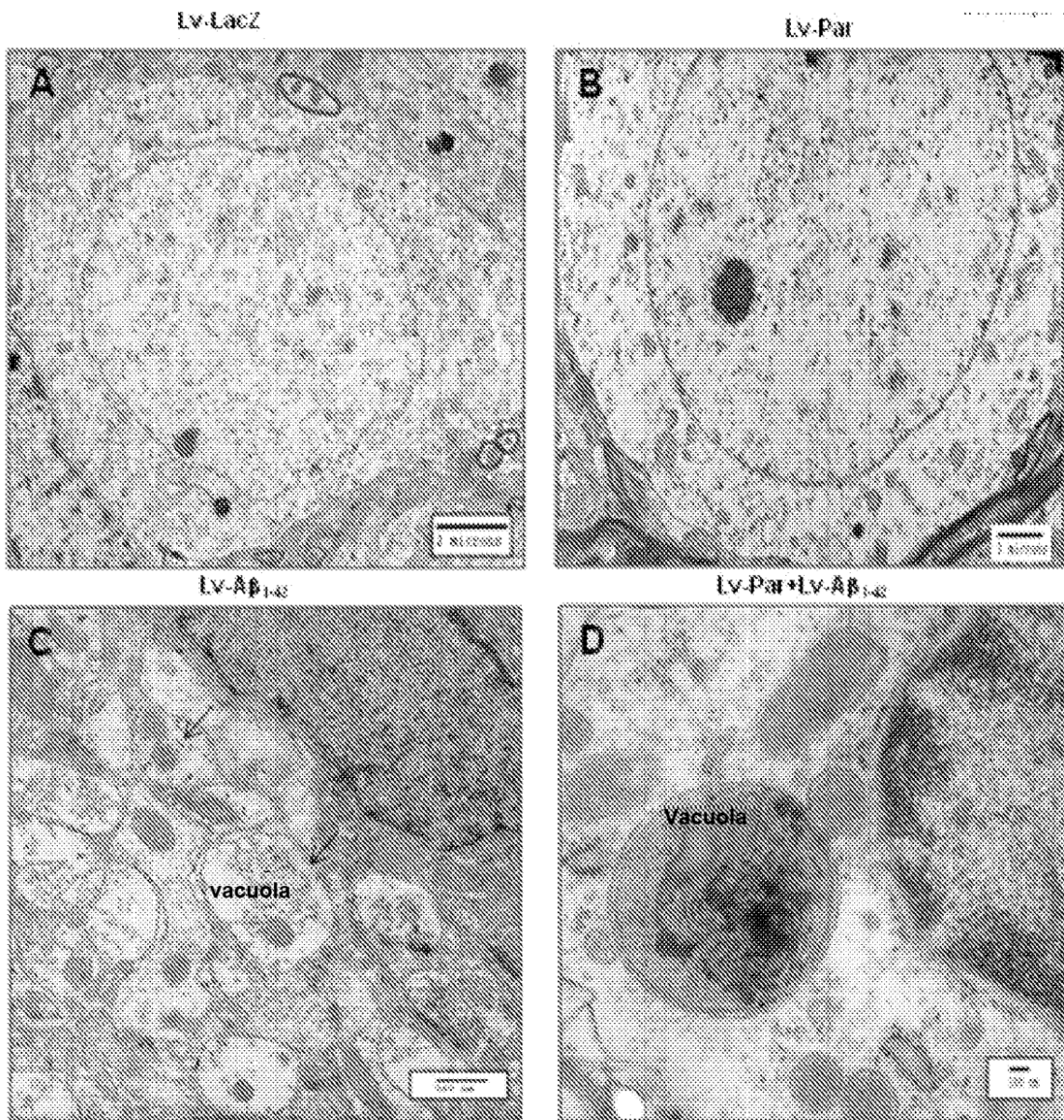
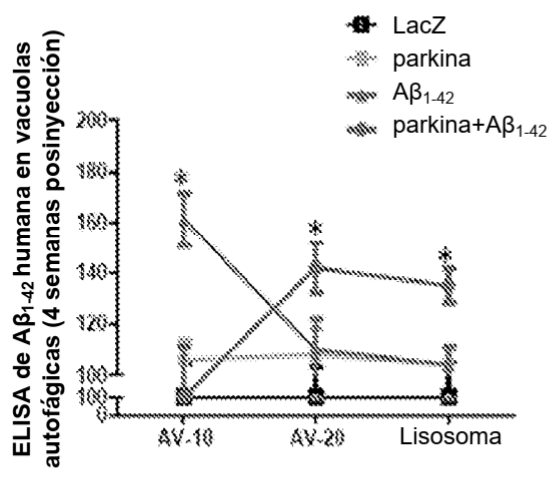


FIG. 54

III



II

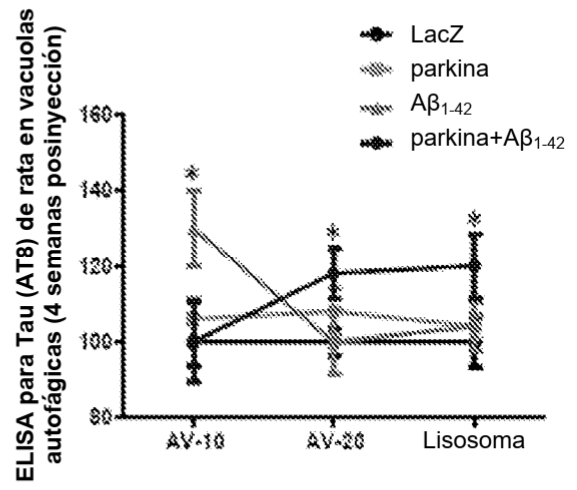


FIG. 54(cont.)

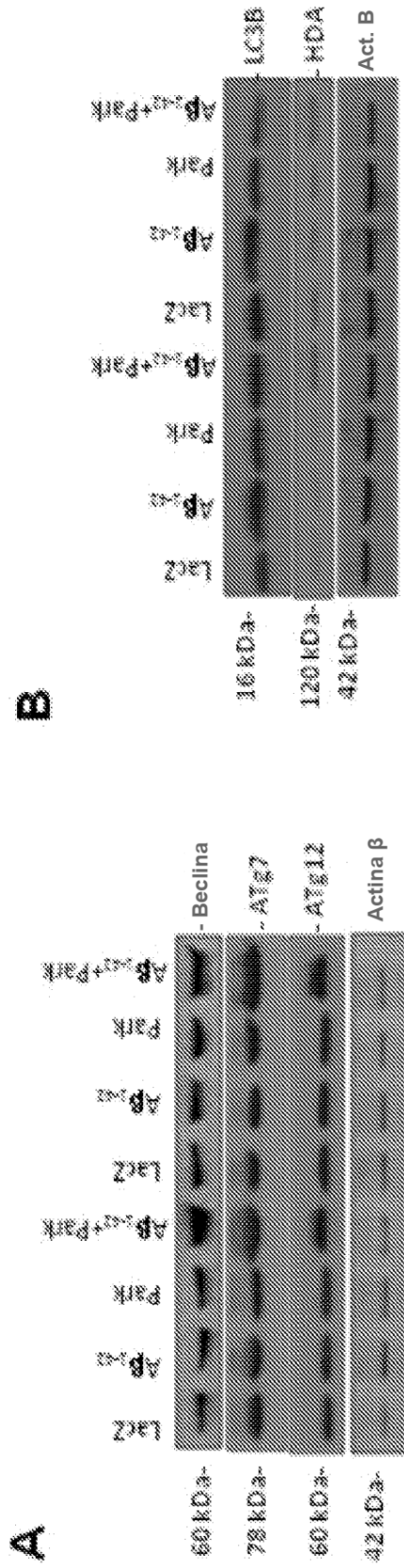


FIG. 55

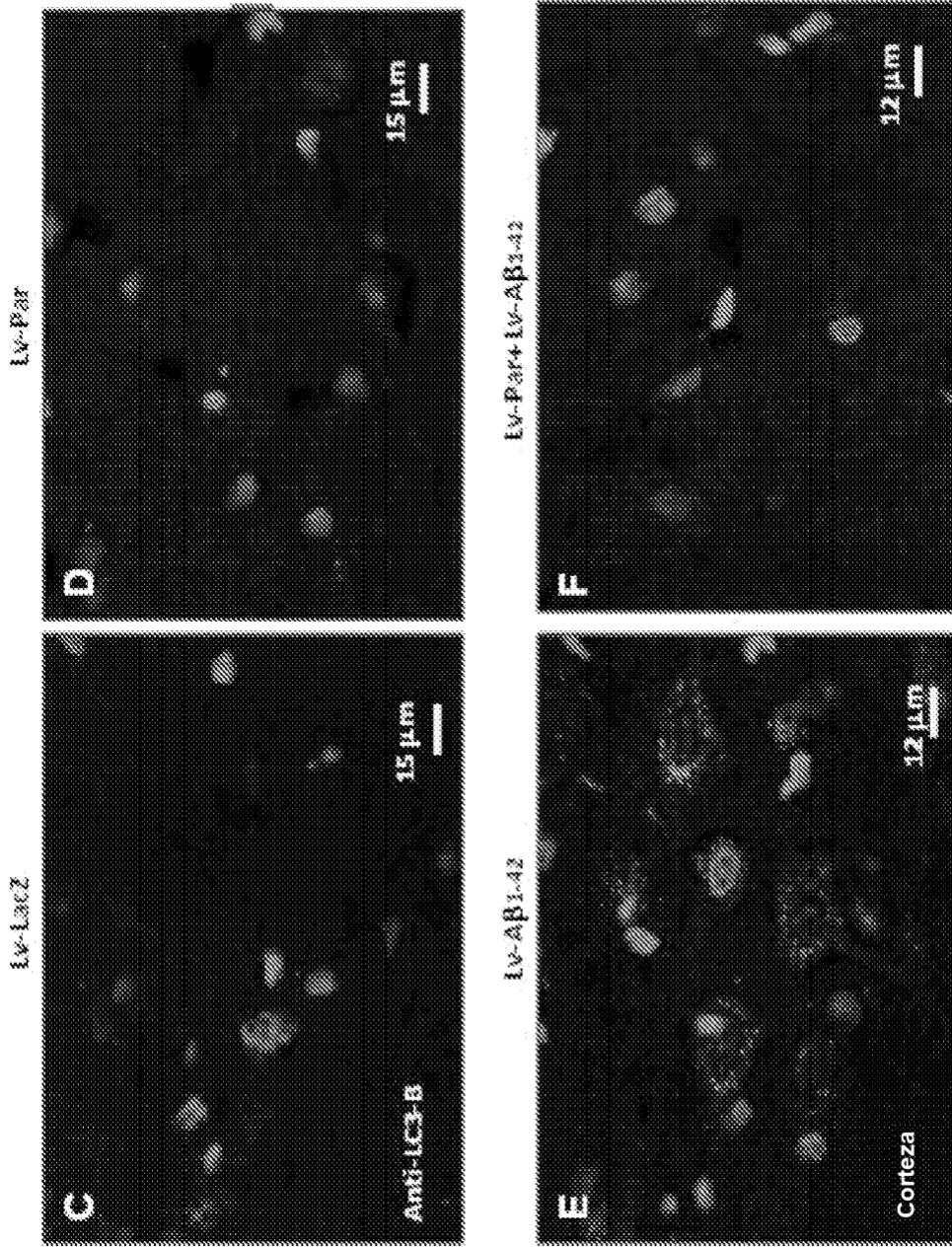


FIG. 55 (cont.)

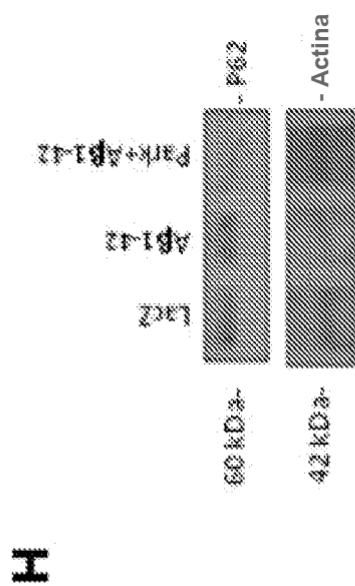
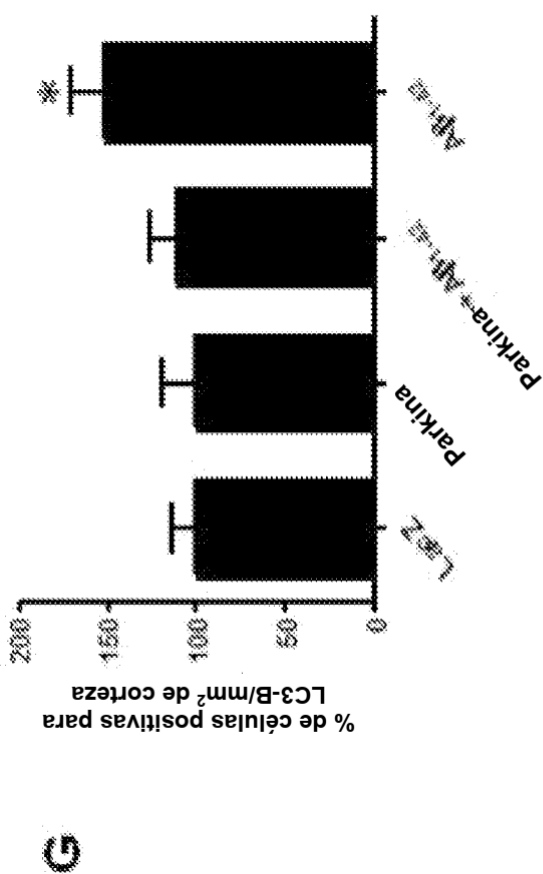


FIG. 55 (cont.)

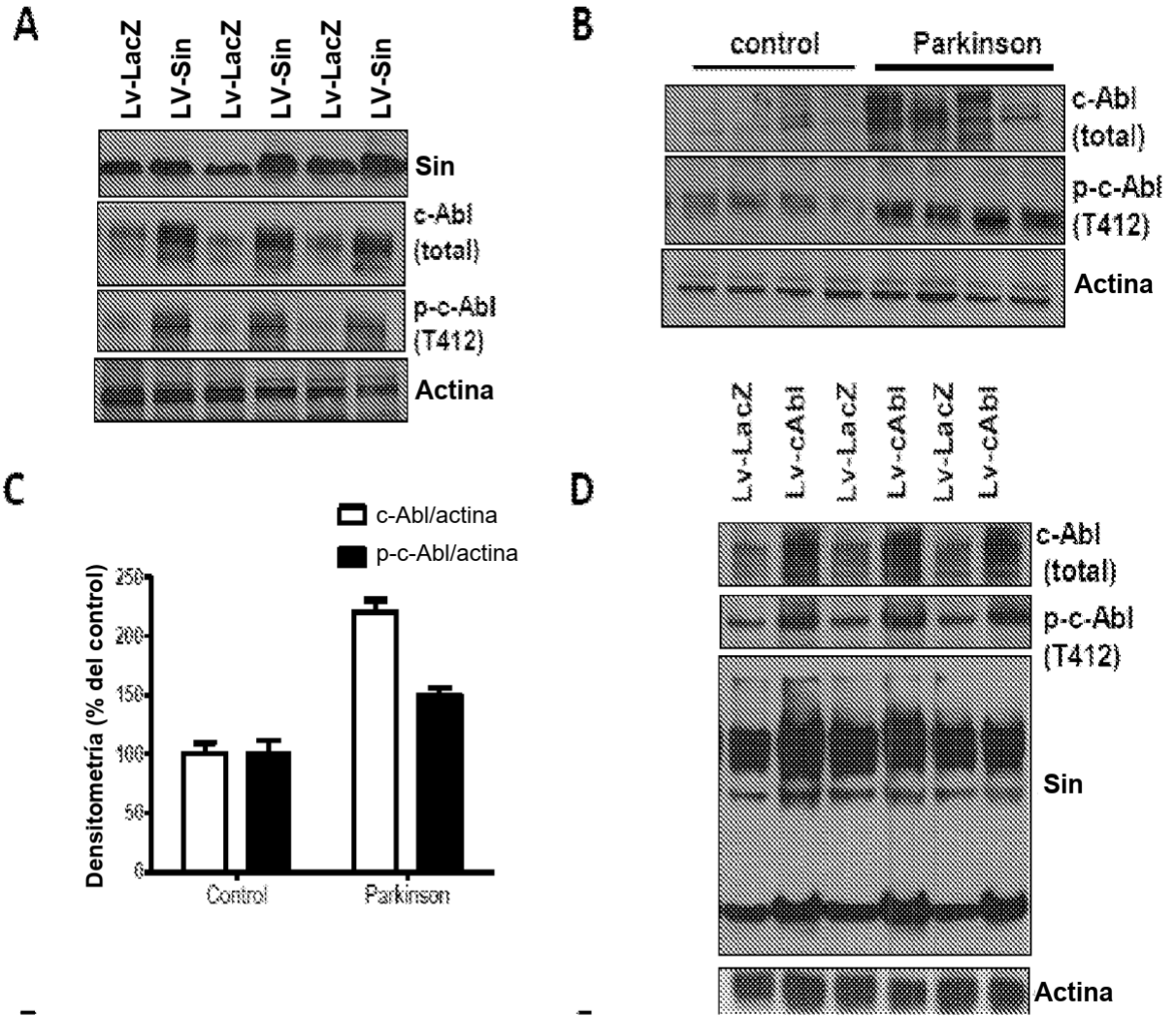


FIG. 56

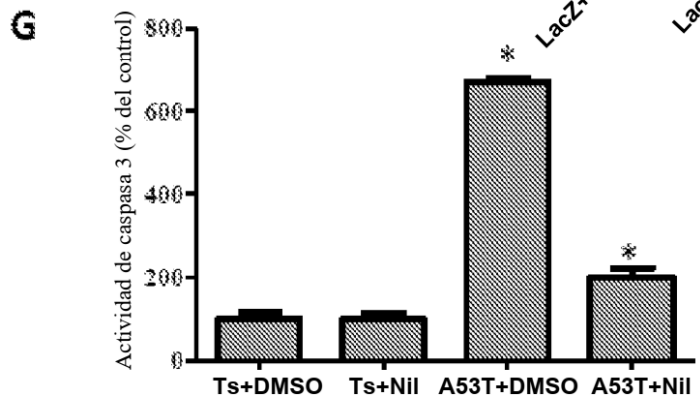
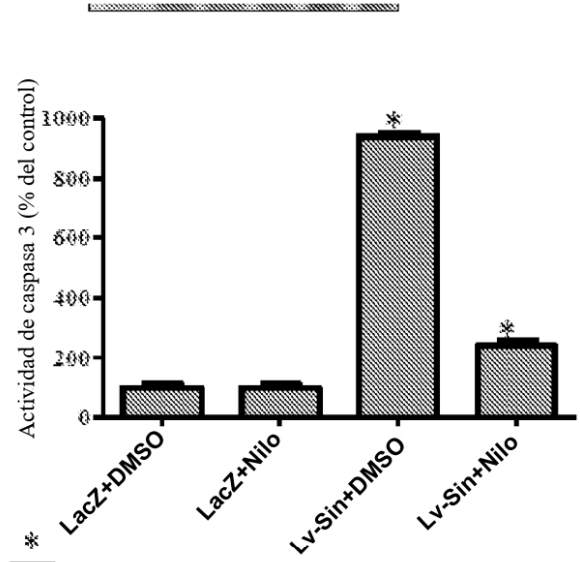
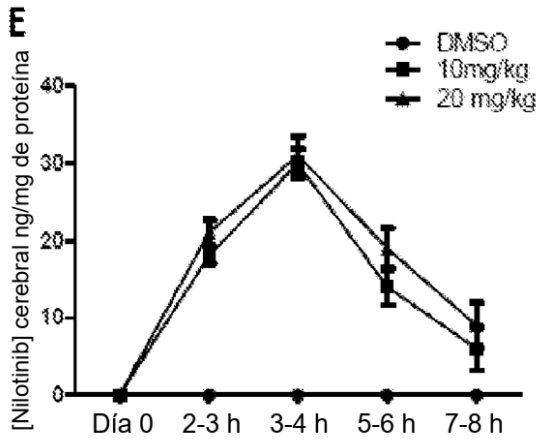


FIG. 56 (cont.)

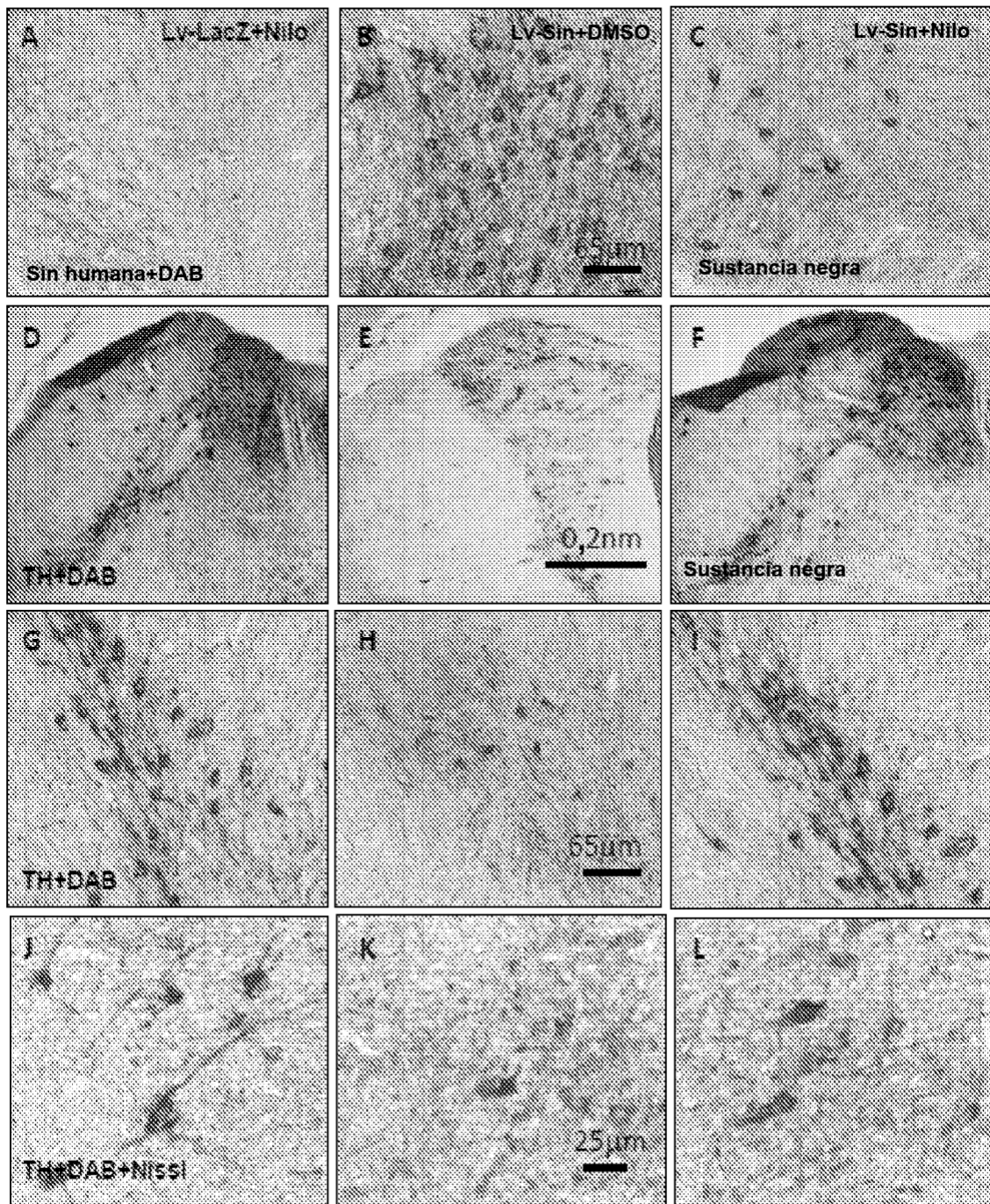


FIG. 57

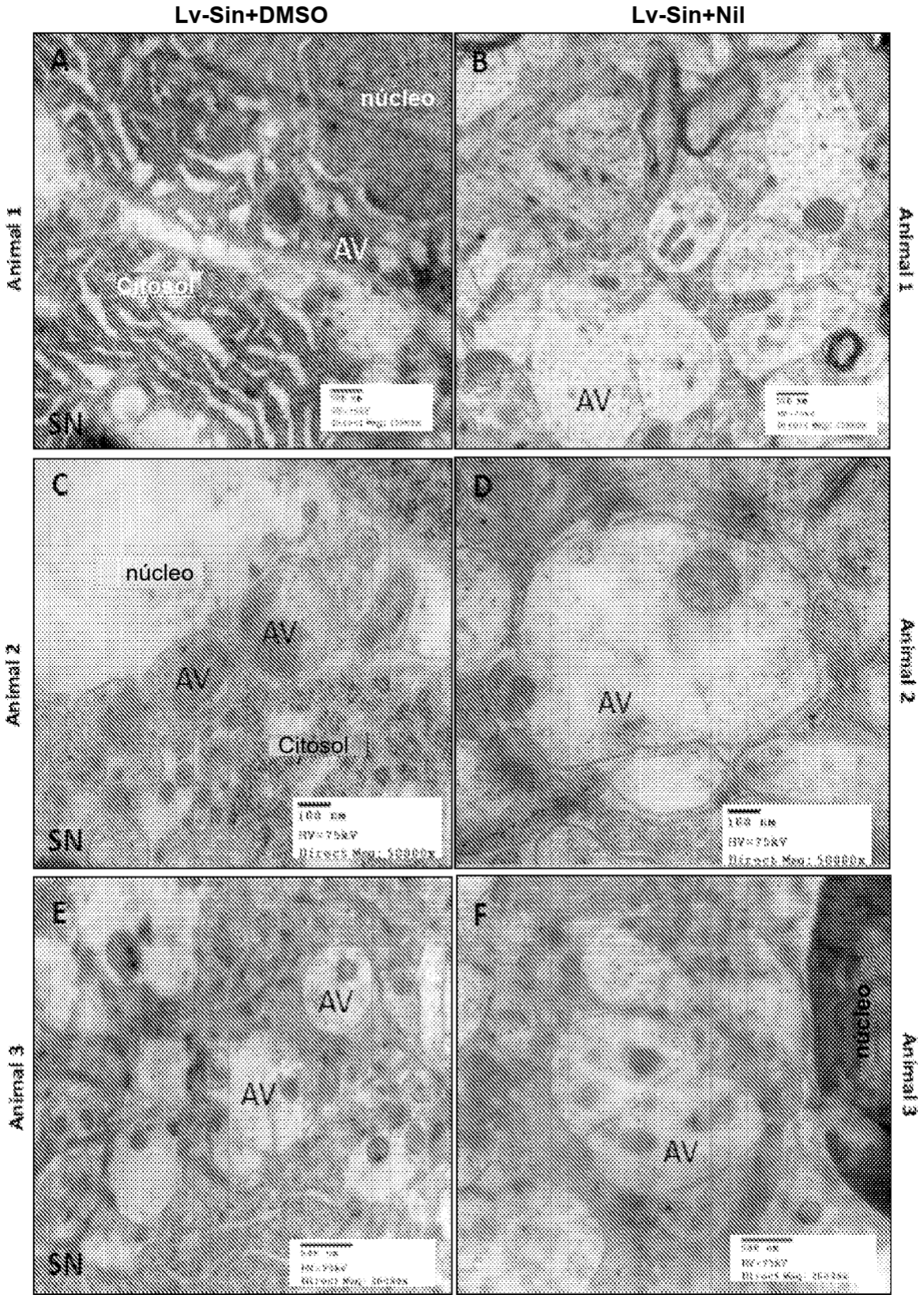


FIG. 58

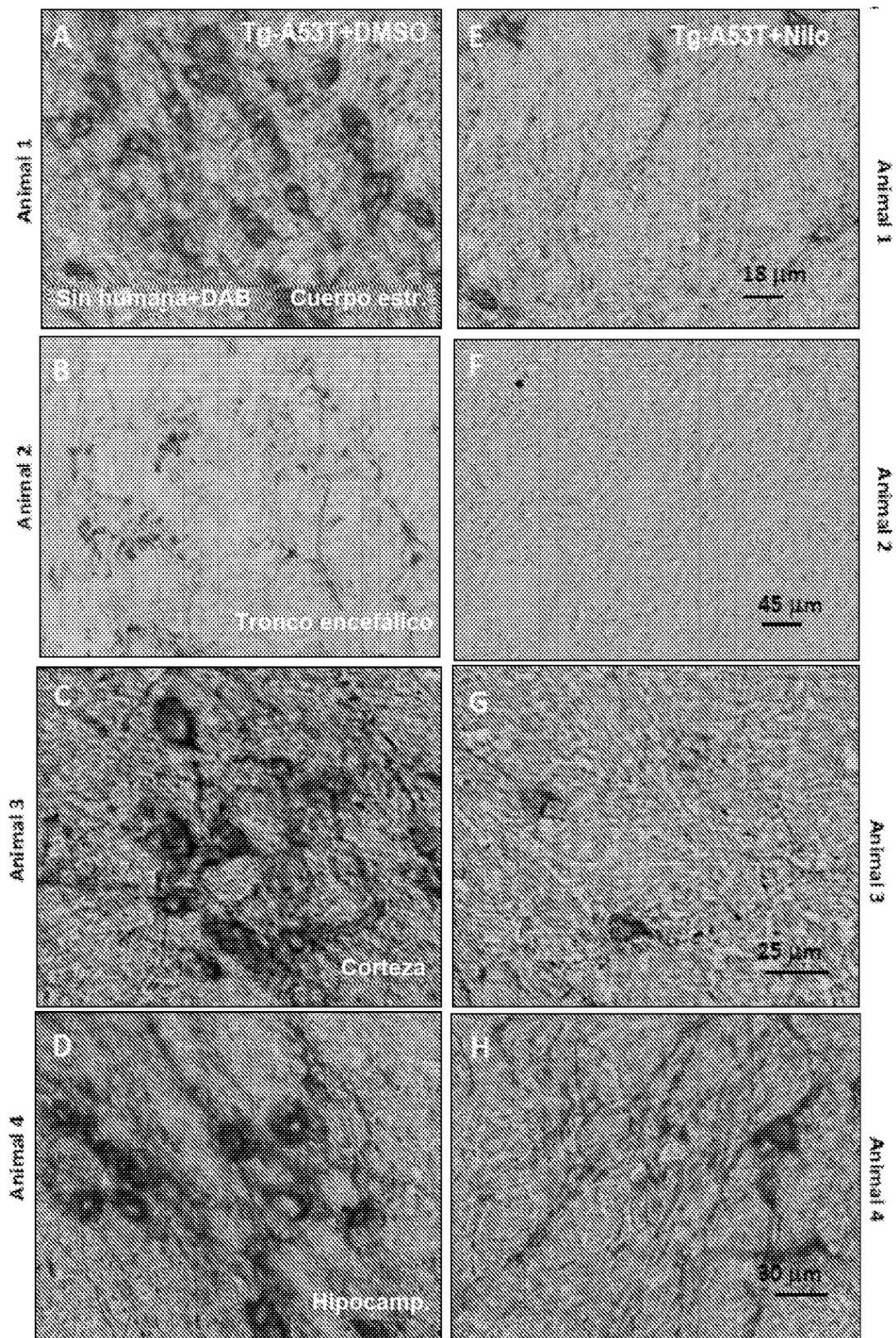


FIG. 59

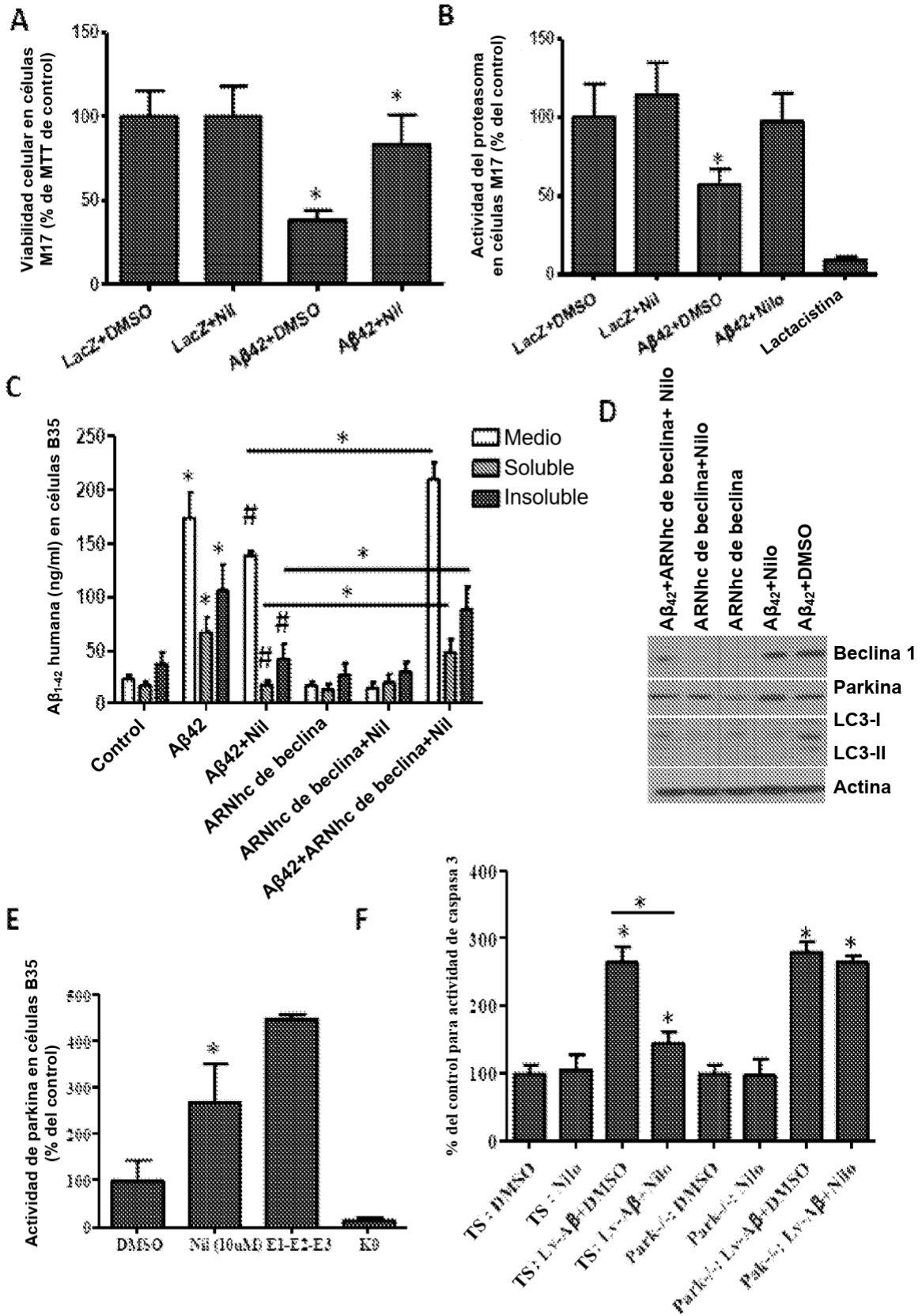


FIG. 60

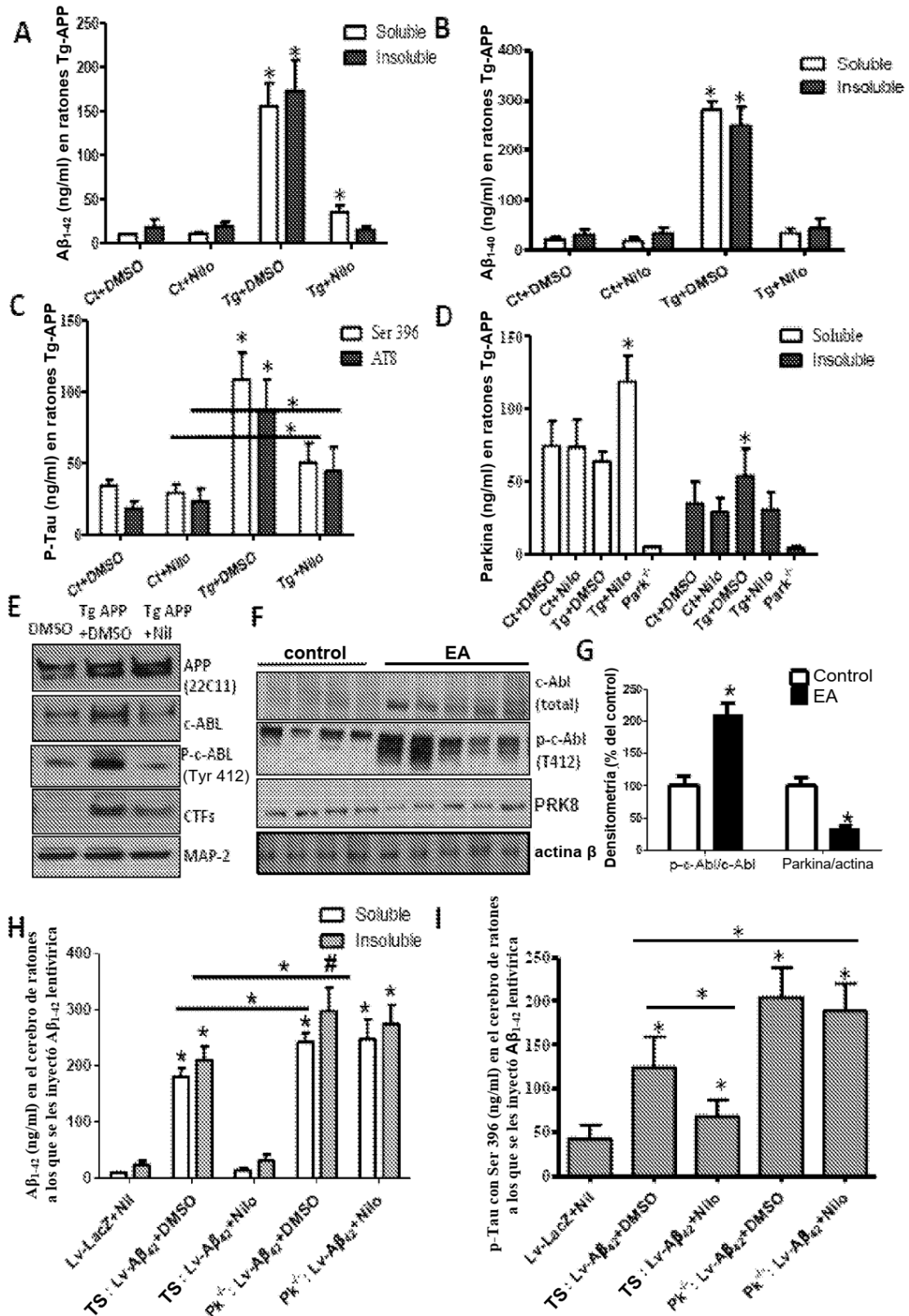


FIG. 61

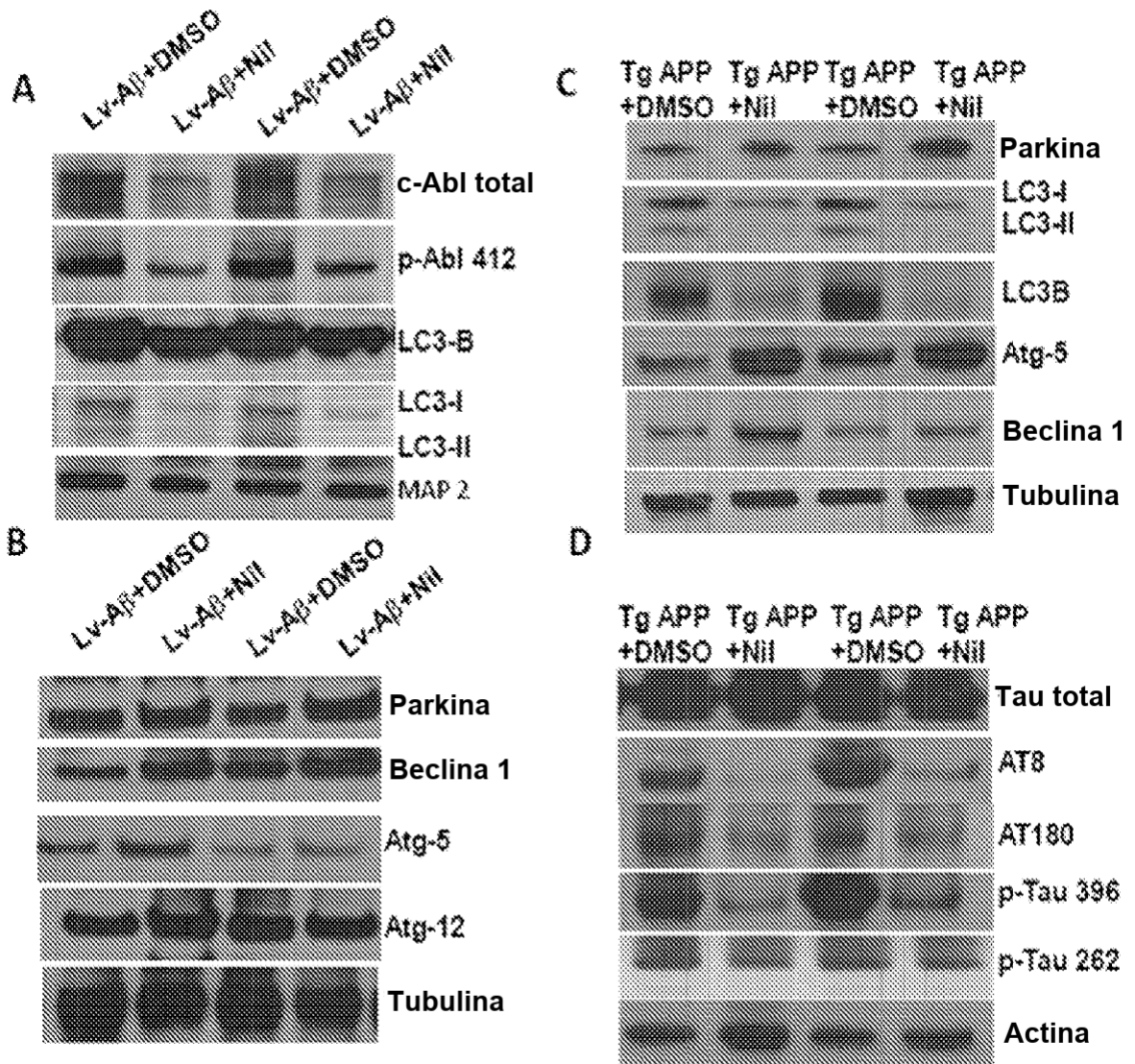


FIG. 62

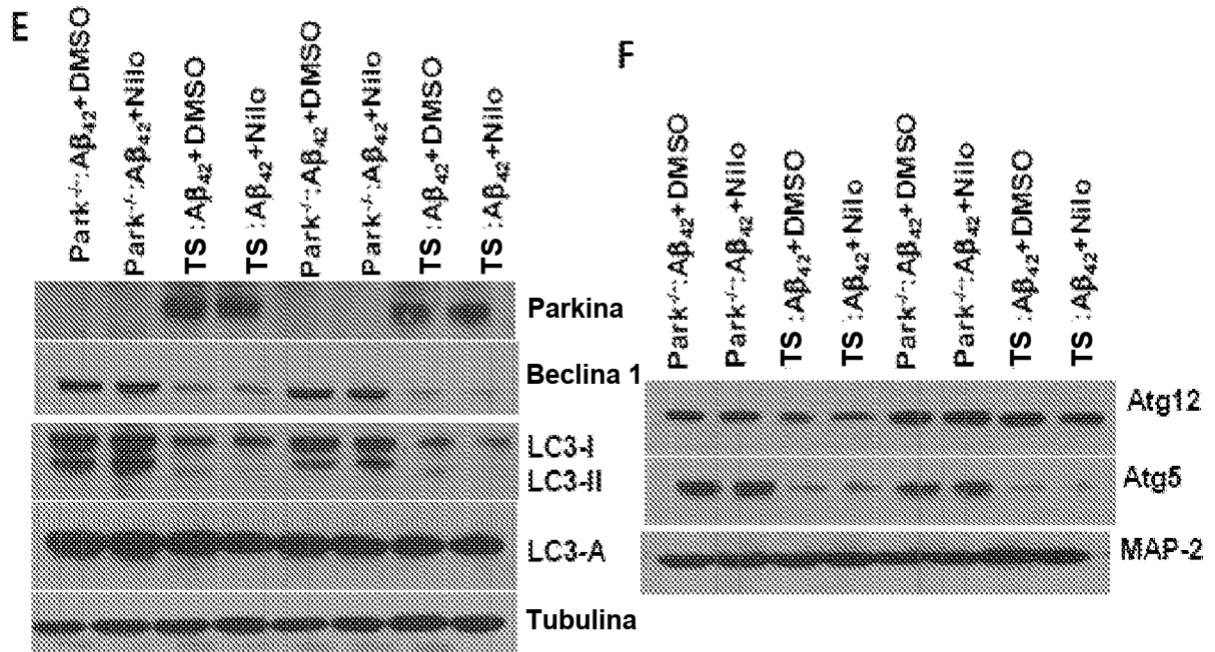


FIG. 62 (cont.)

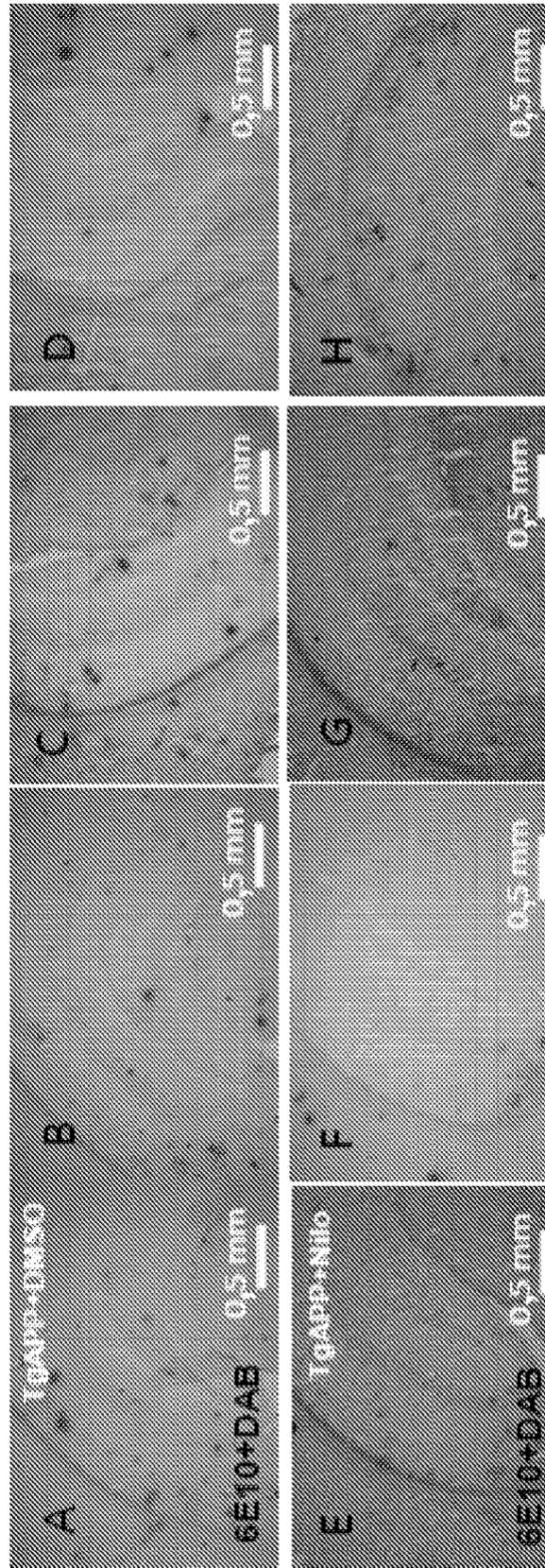


FIG. 63

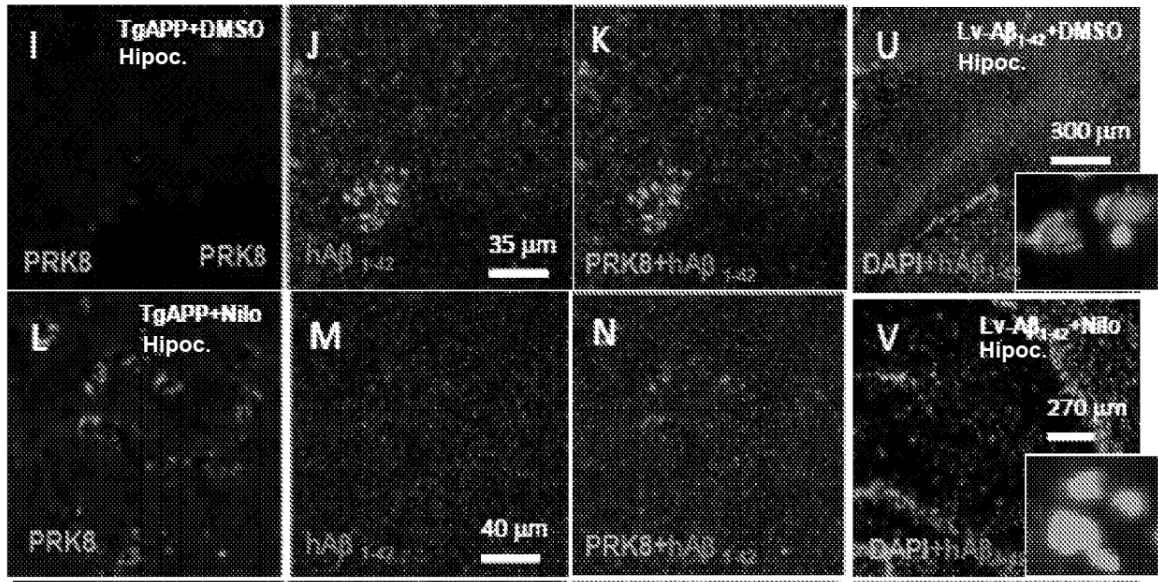


FIG. 63 (cont.)

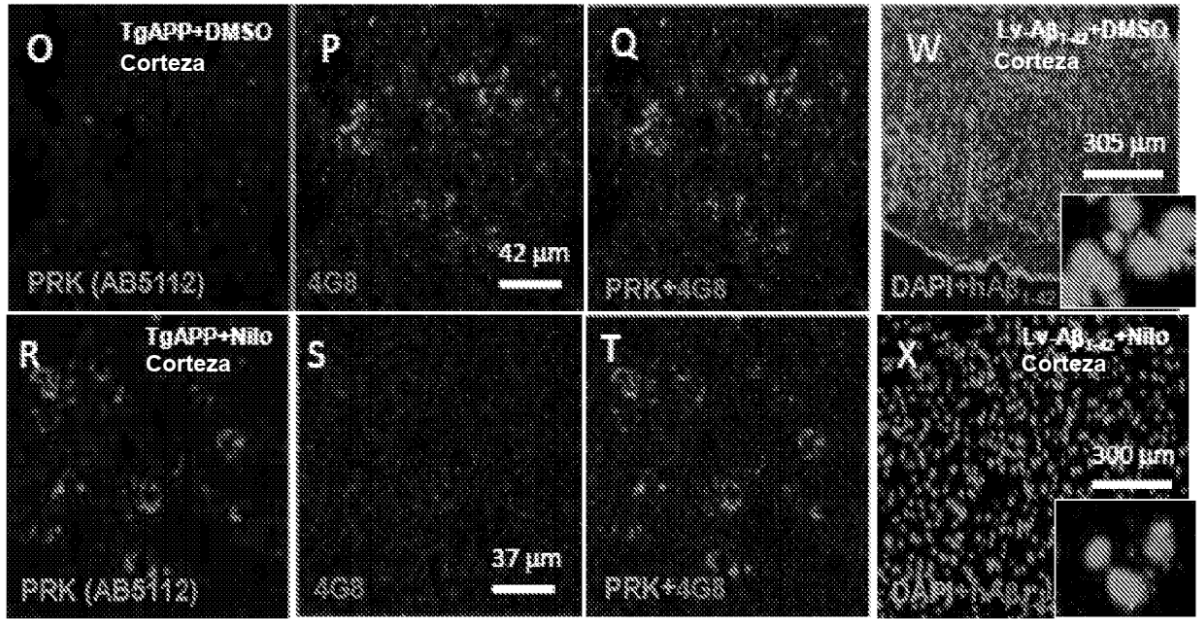


FIG. 63 (cont.)

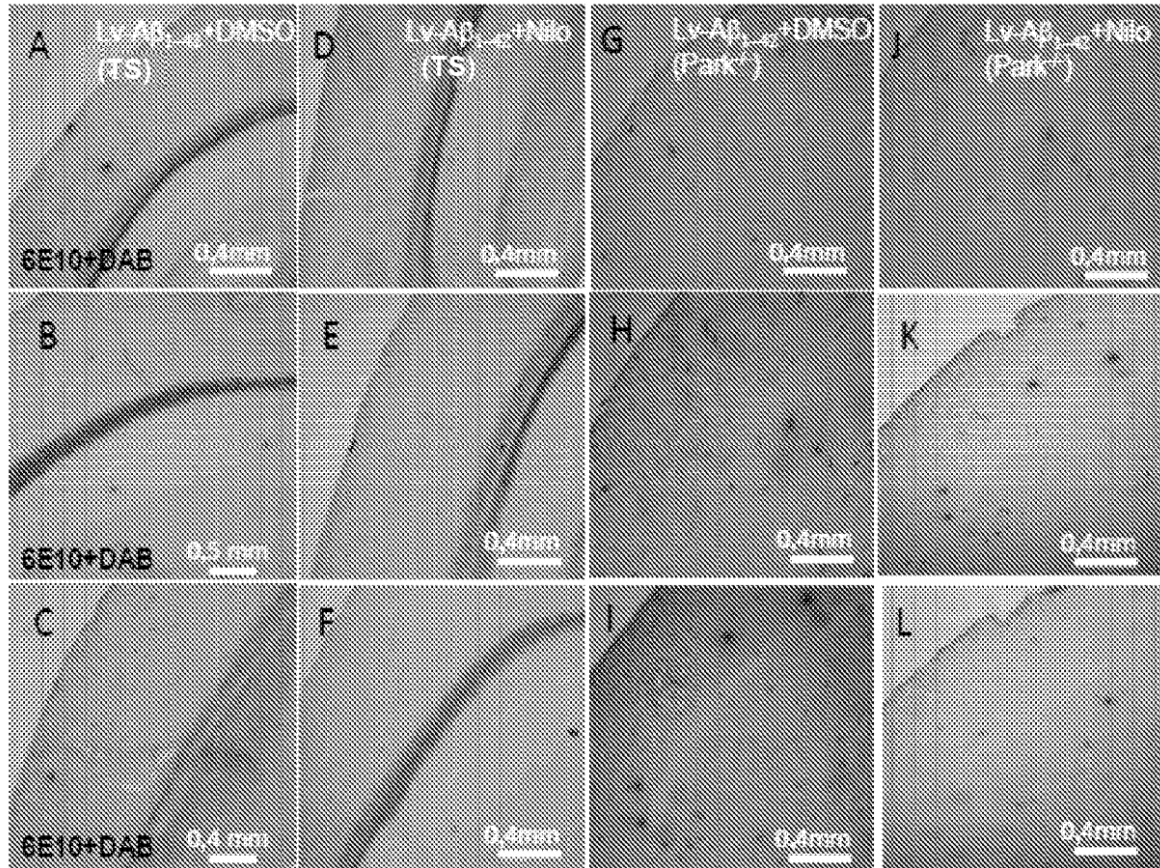


FIG. 64

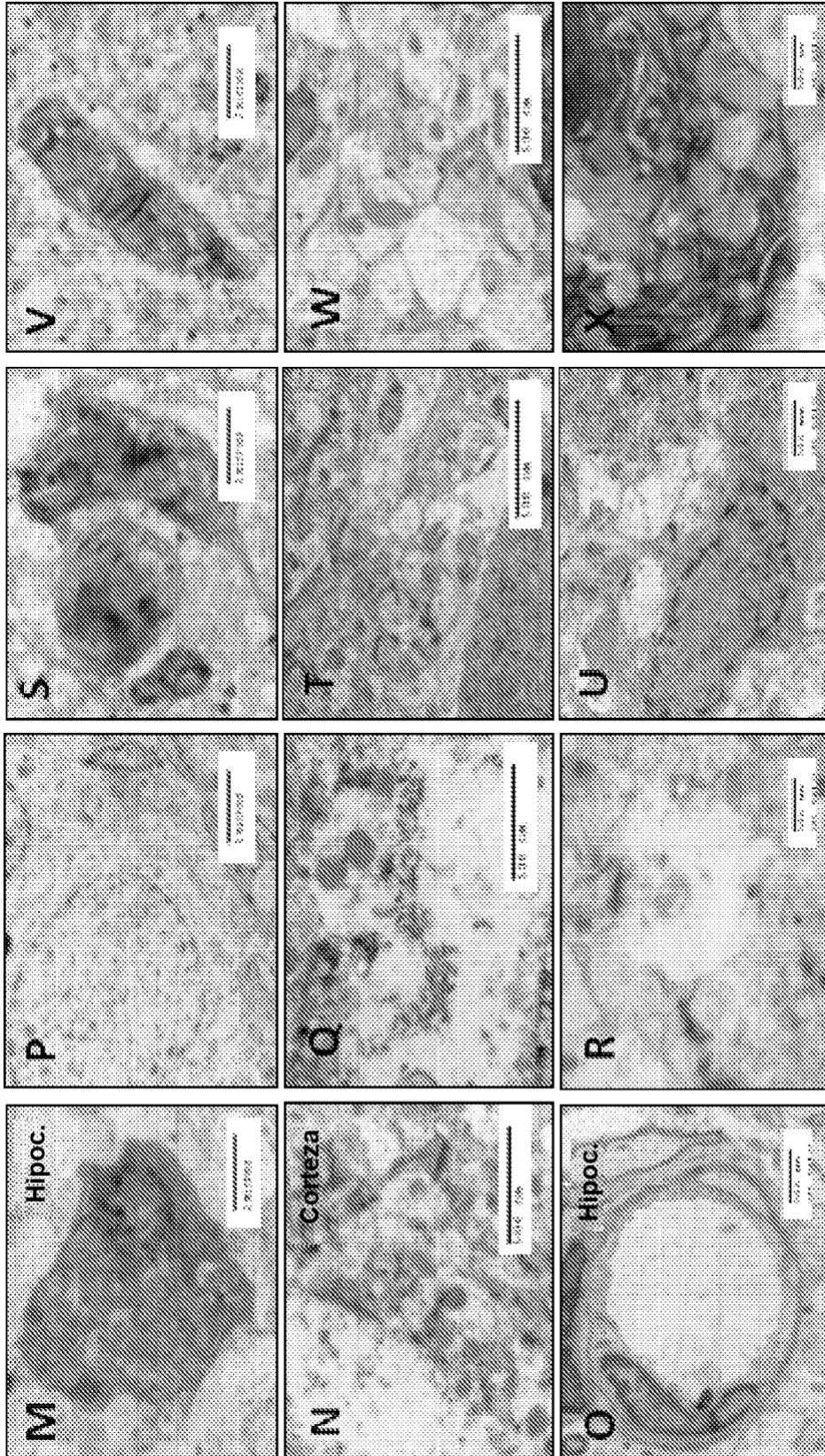
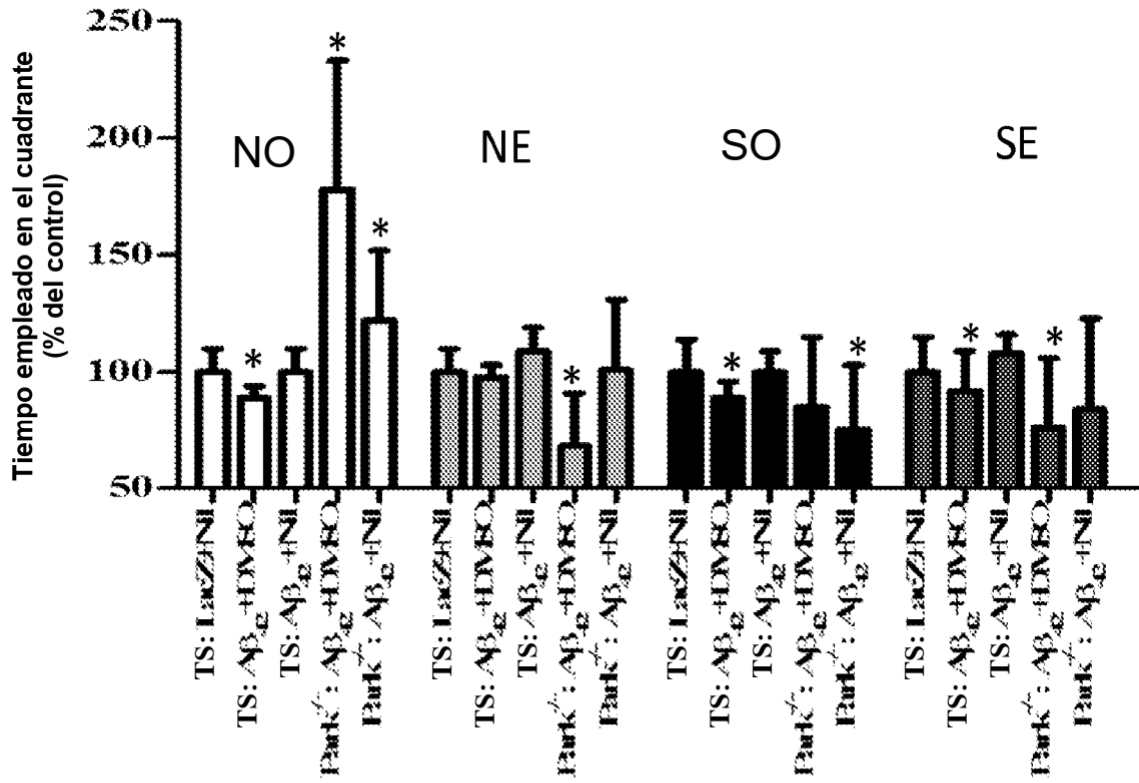


FIG. 64 (cont.)

FIG. 65A



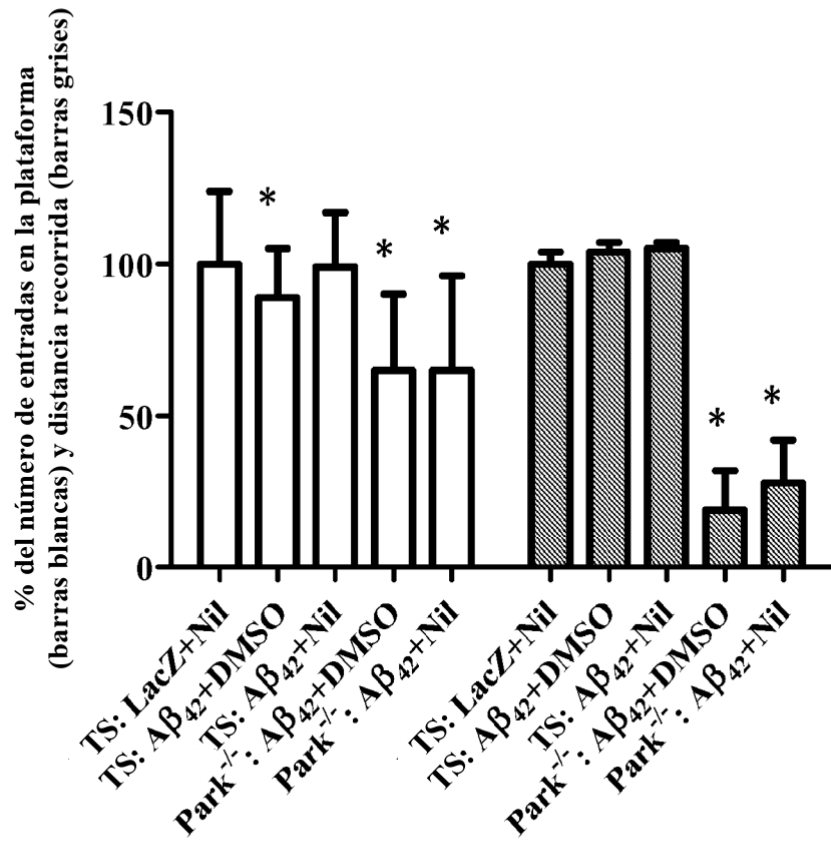


FIG. 65B

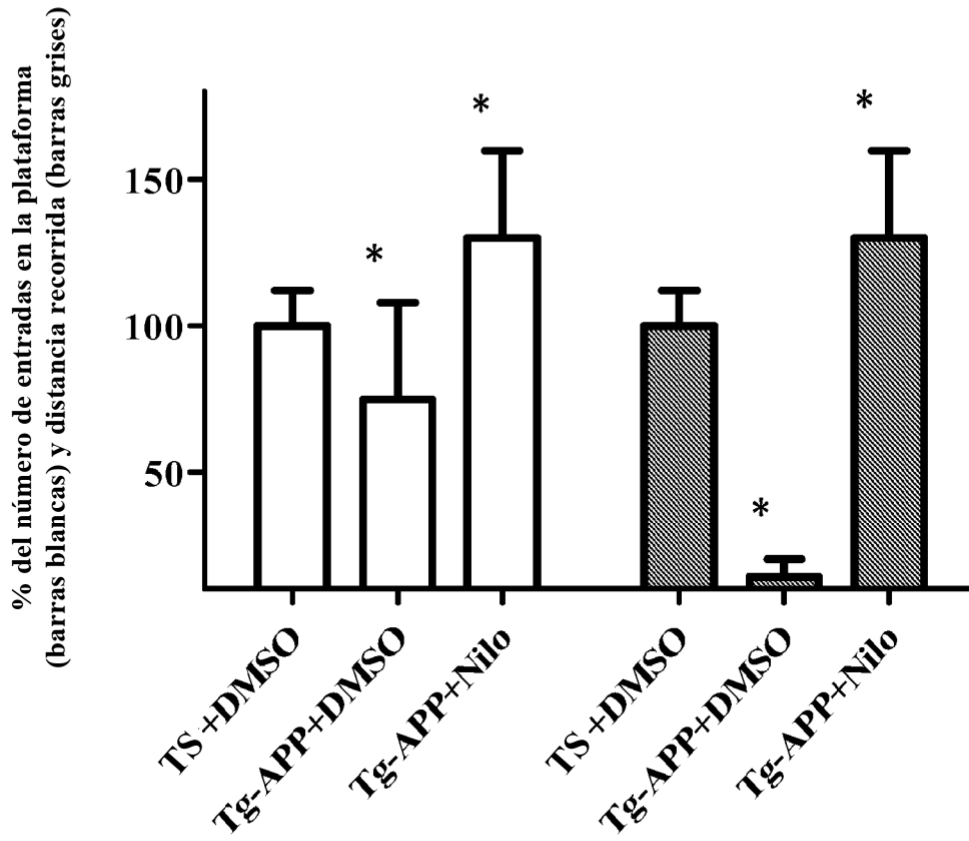


FIG. 65D

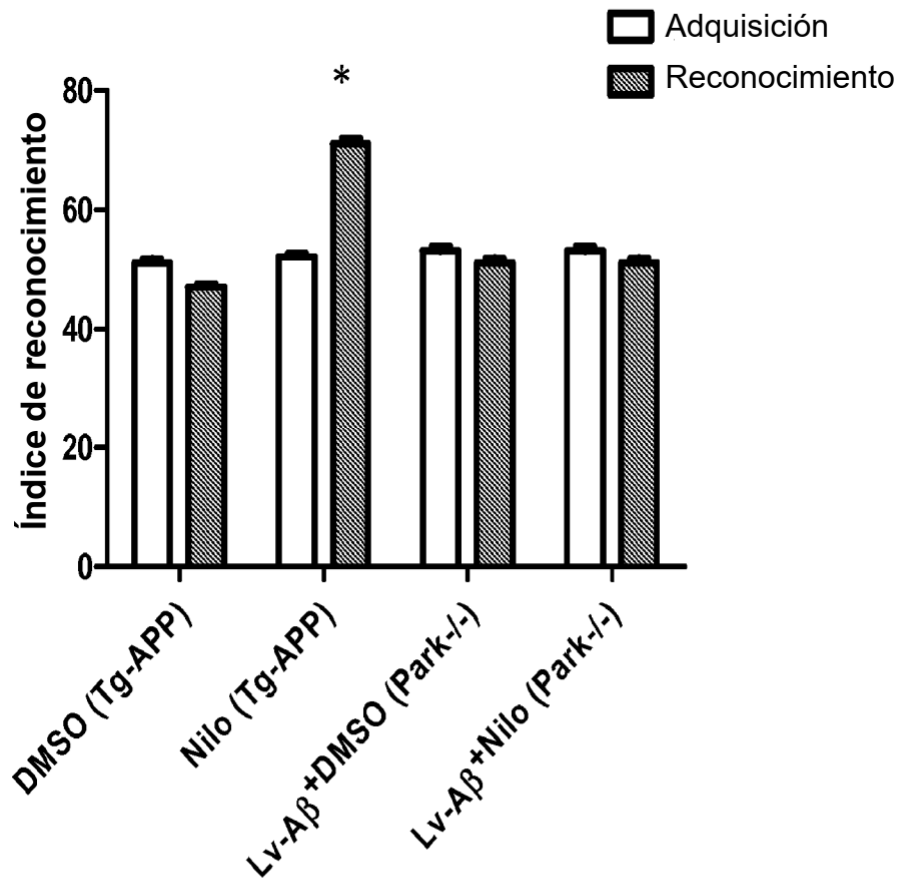


FIG. 65E

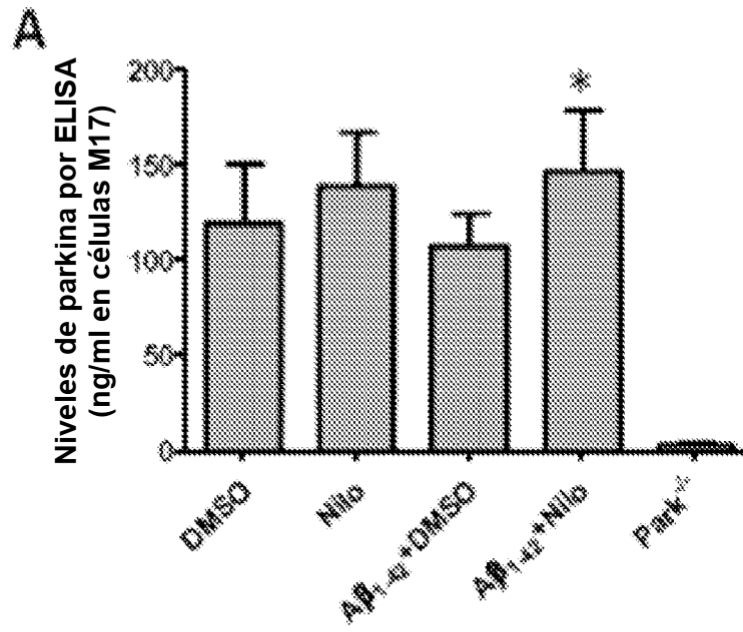


FIG. 66

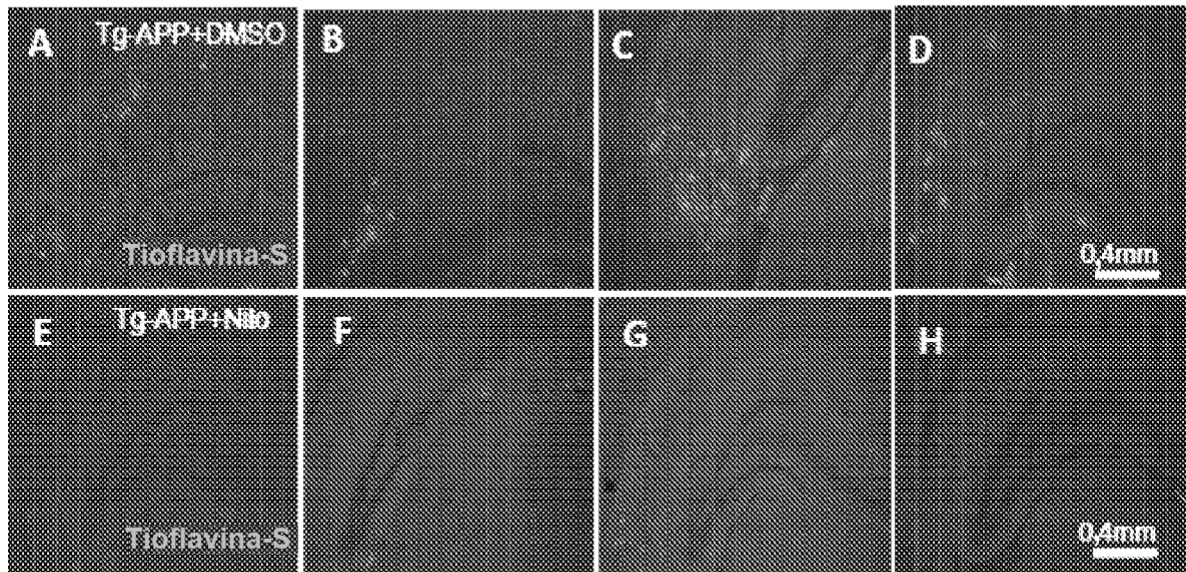


FIG. 67

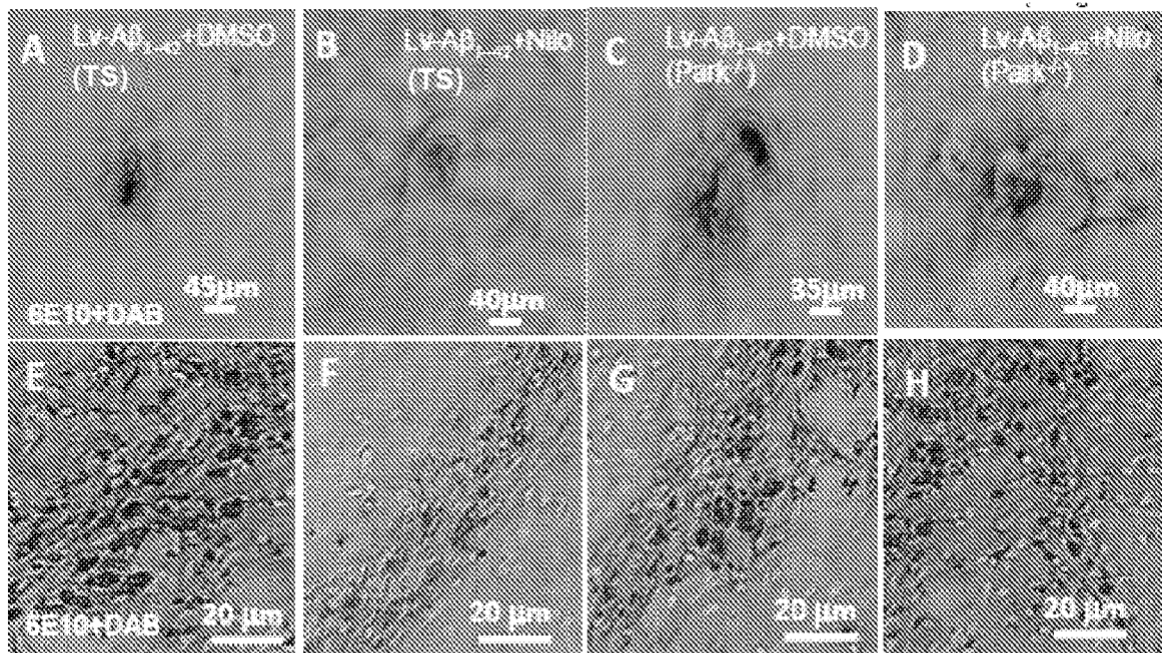


FIG. 68

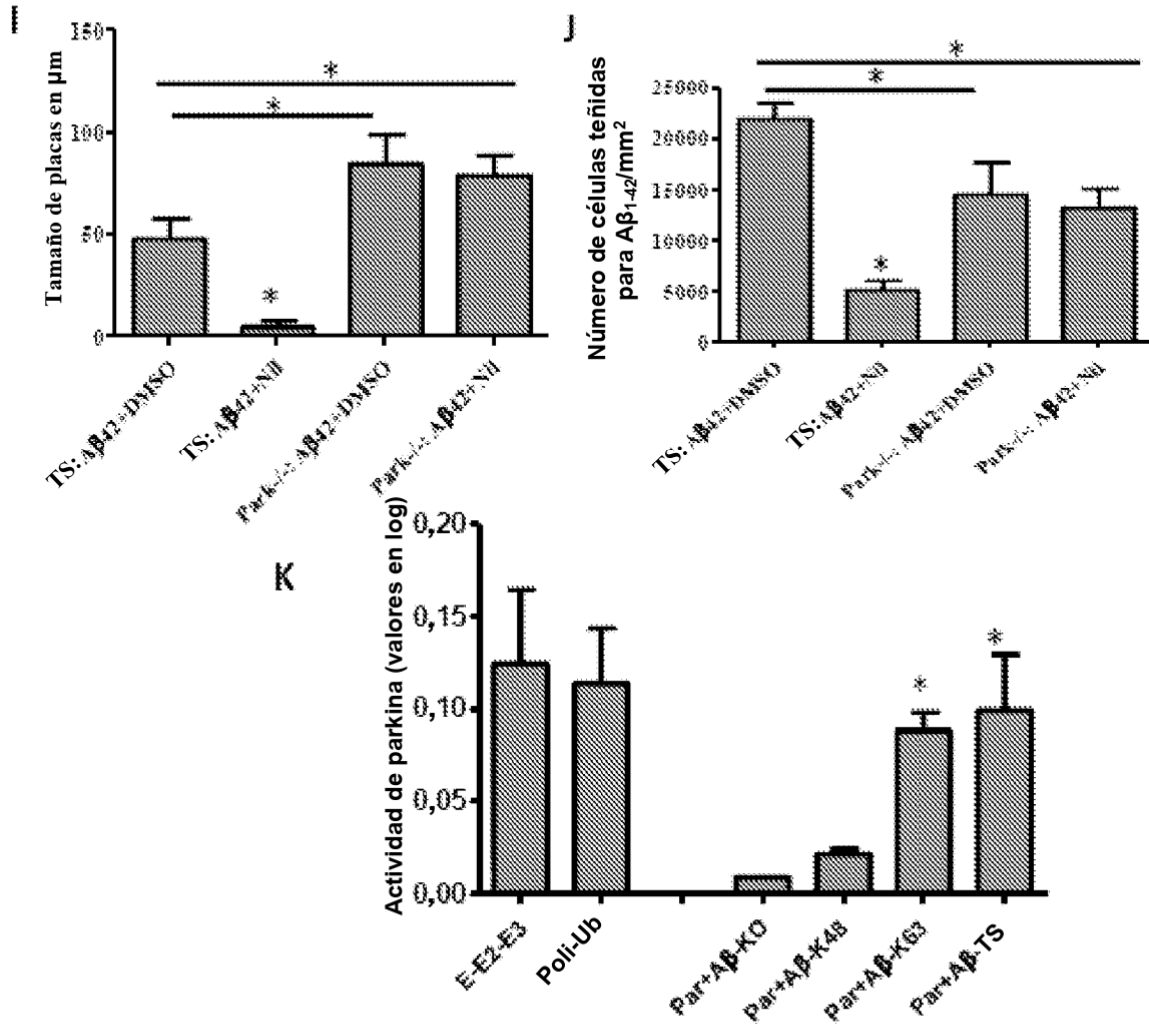


FIG. 68 (cont.)

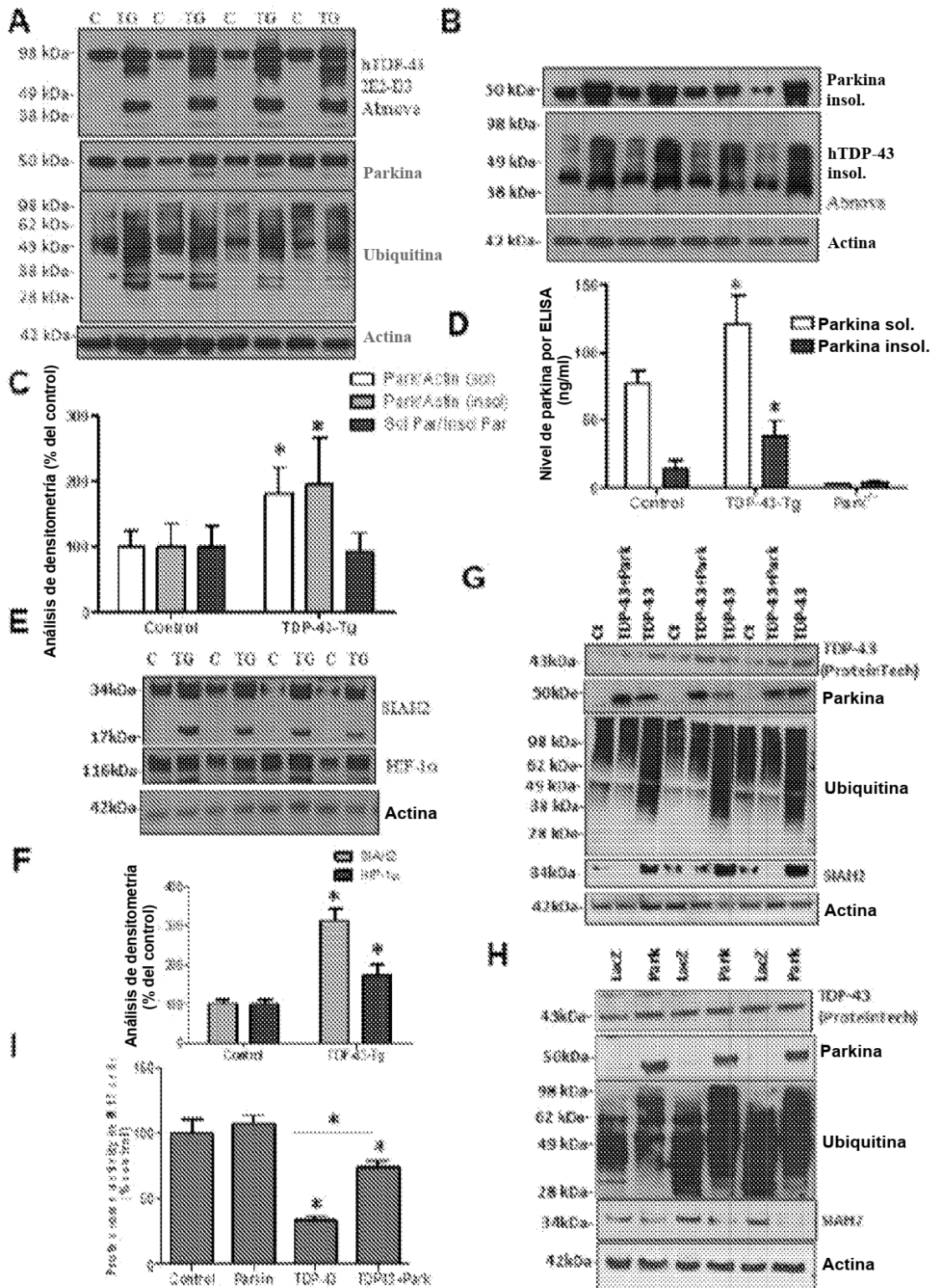


FIG. 69

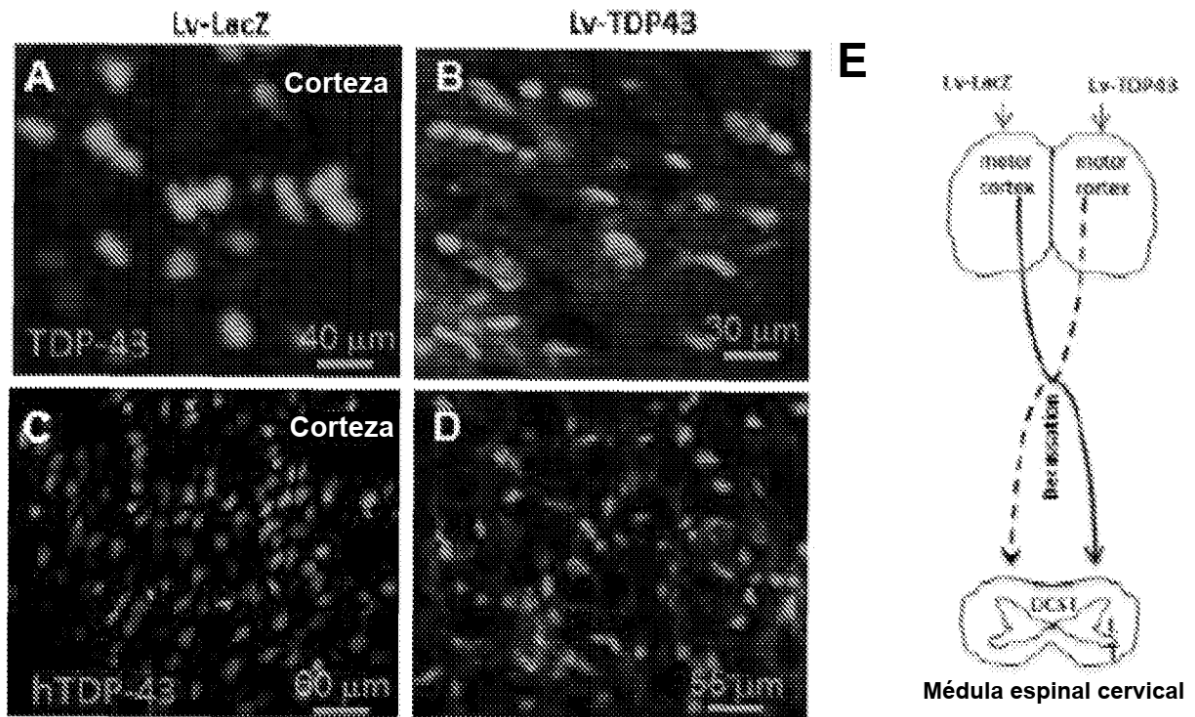


FIG. 70

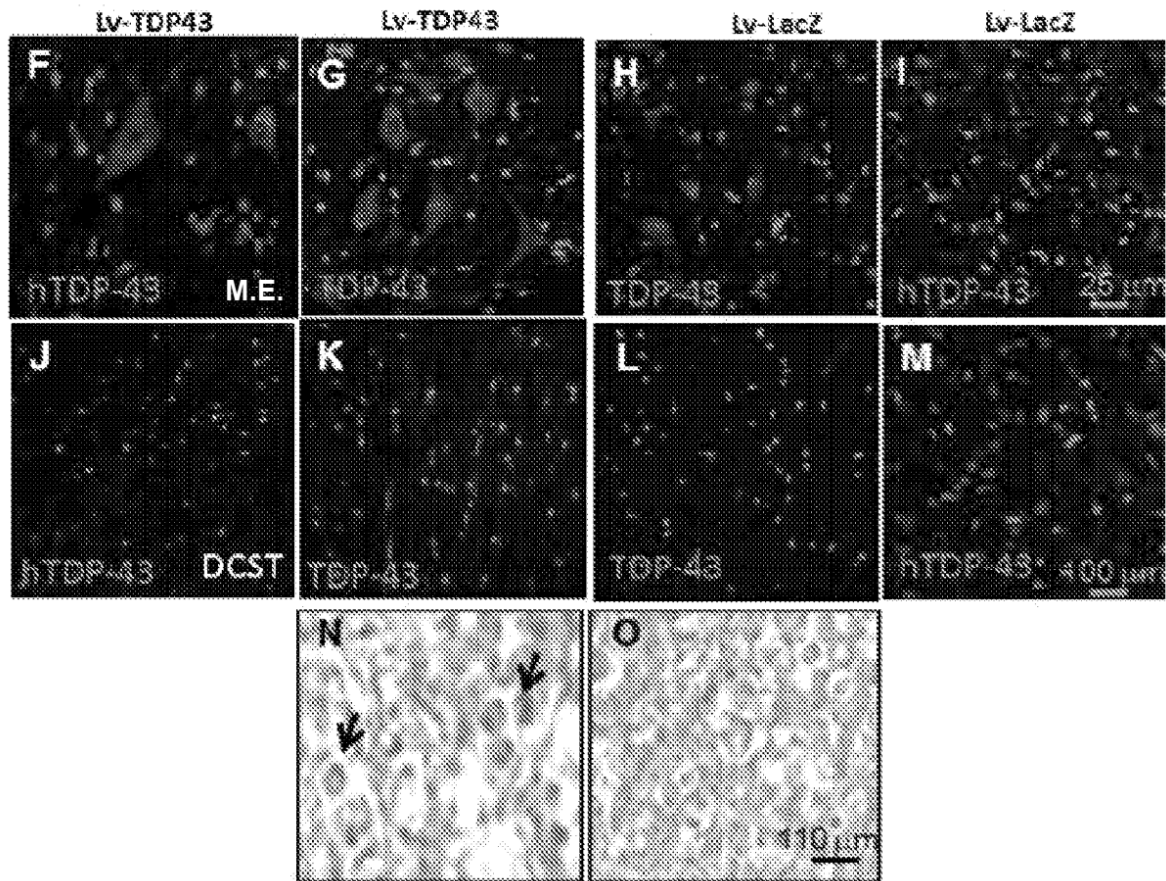


FIG. 70 (cont.)

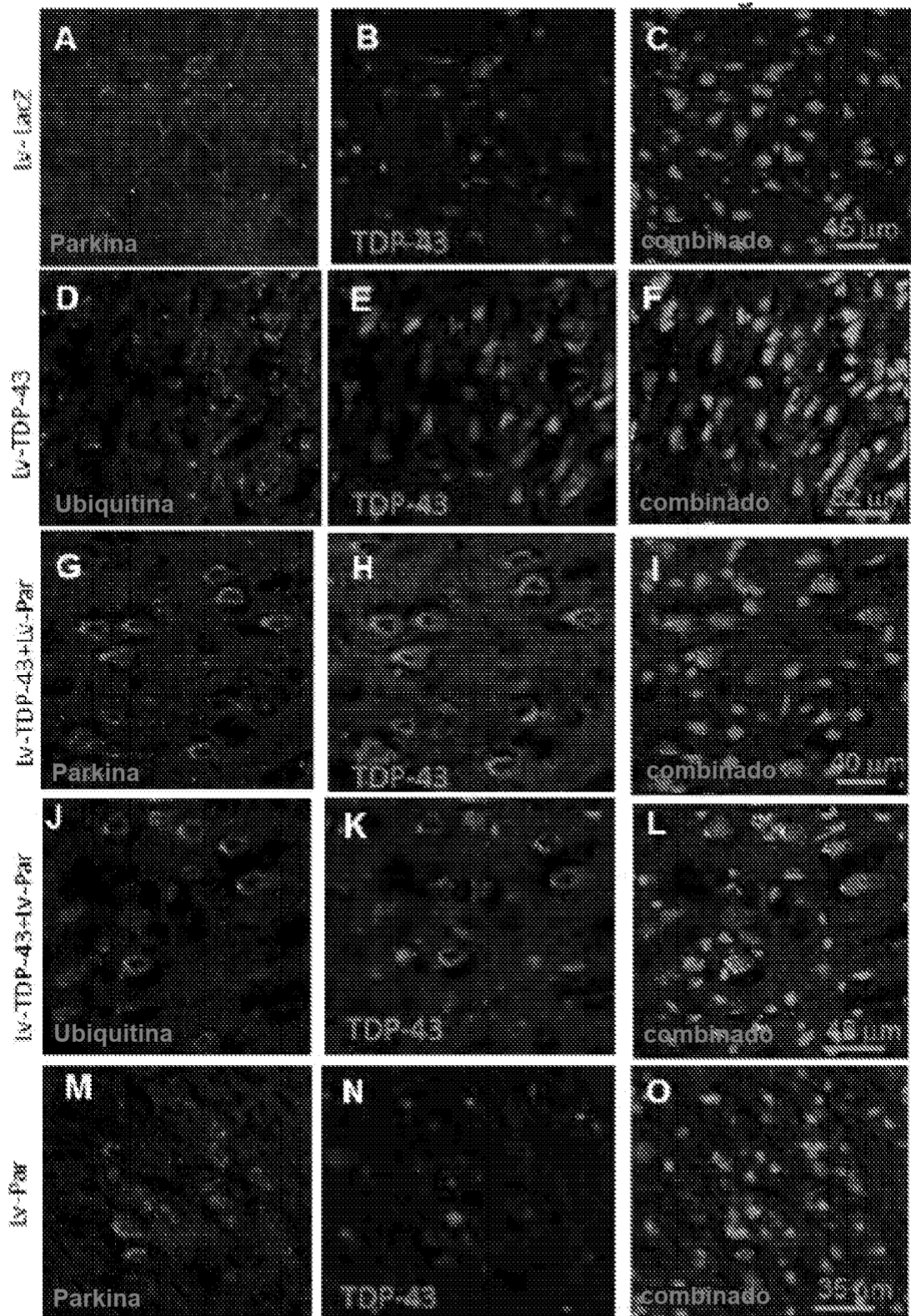


FIG. 71

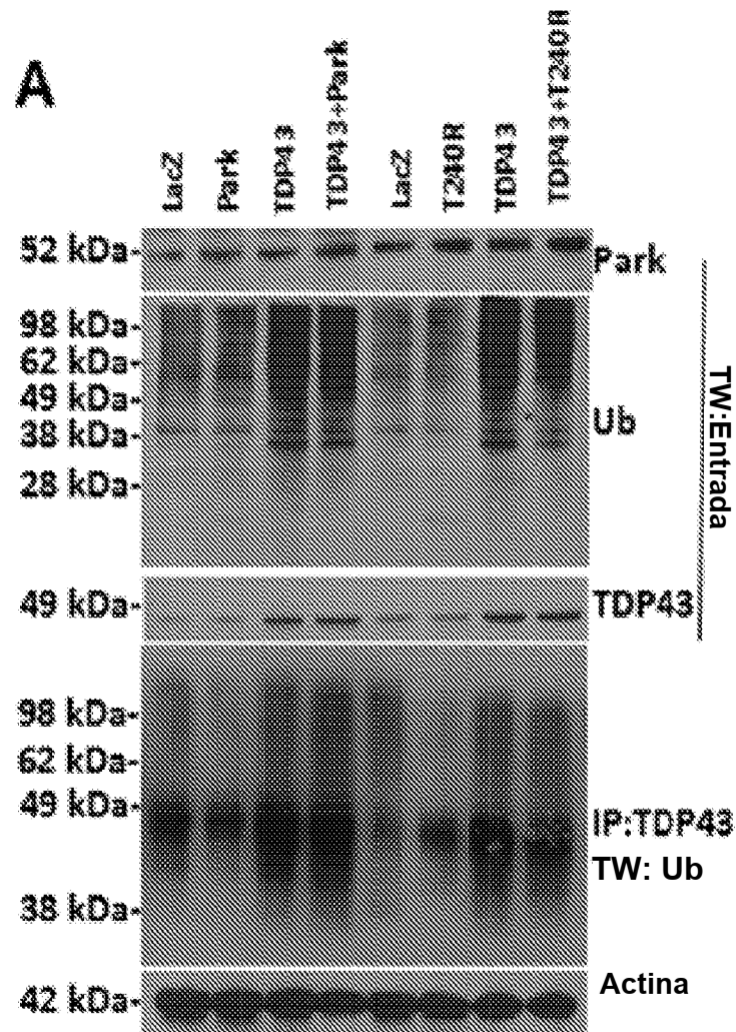
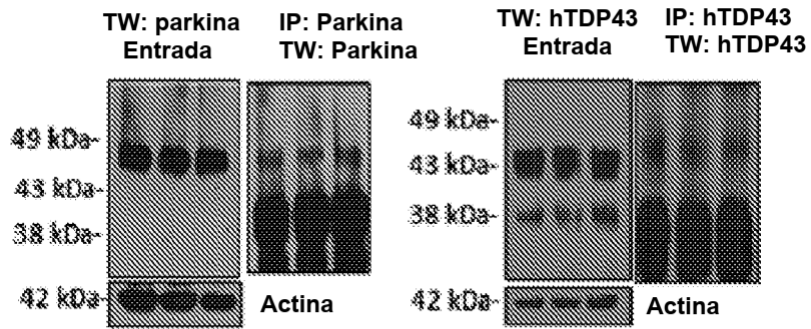


FIG. 72

B



C

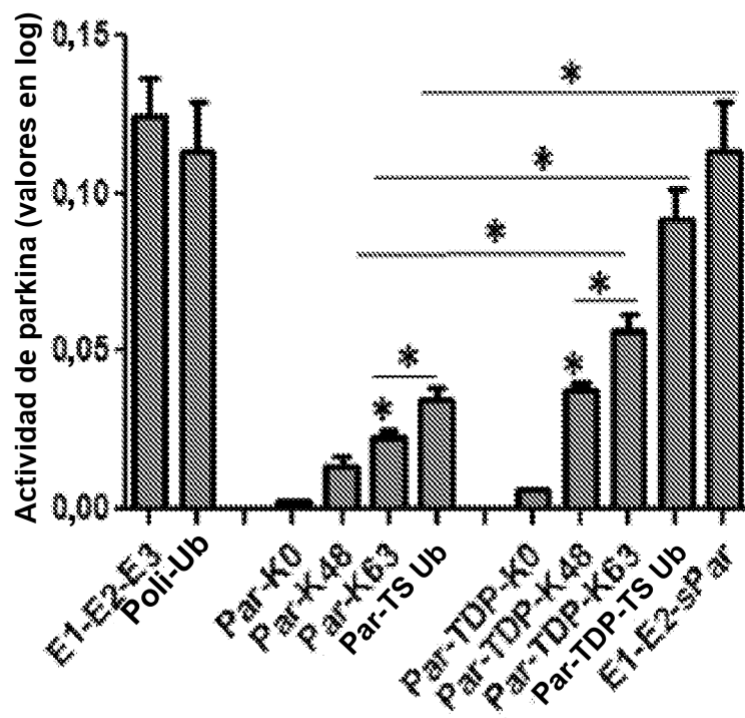


FIG. 72 (cont.)

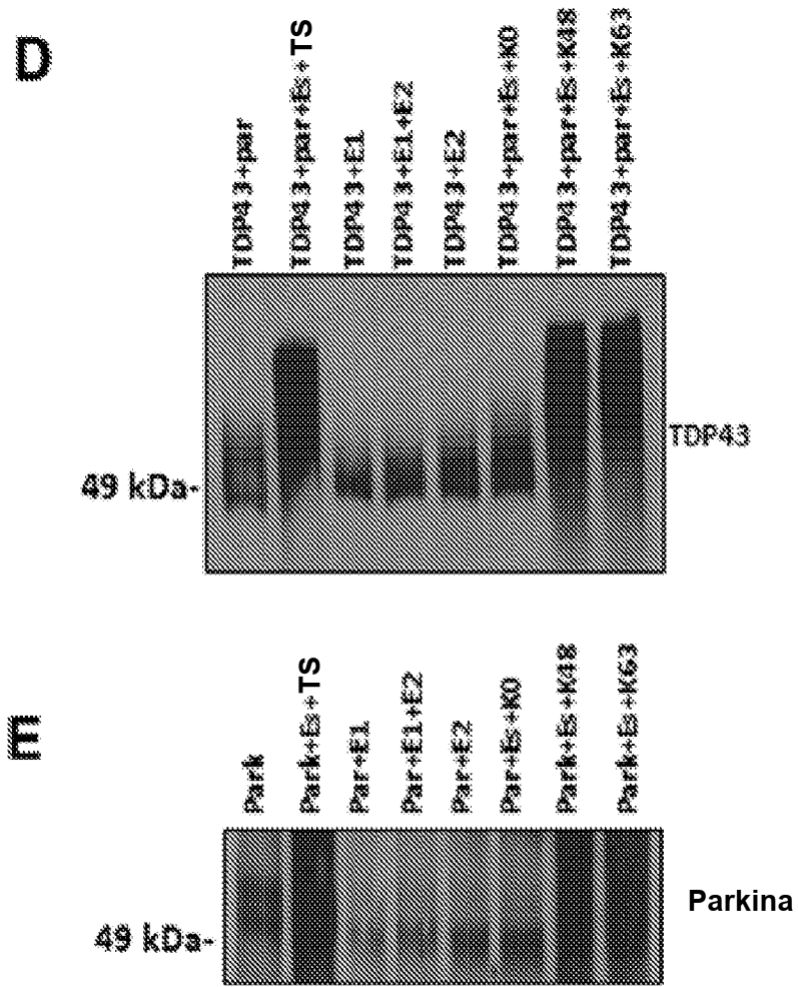


FIG. 72 (cont.)

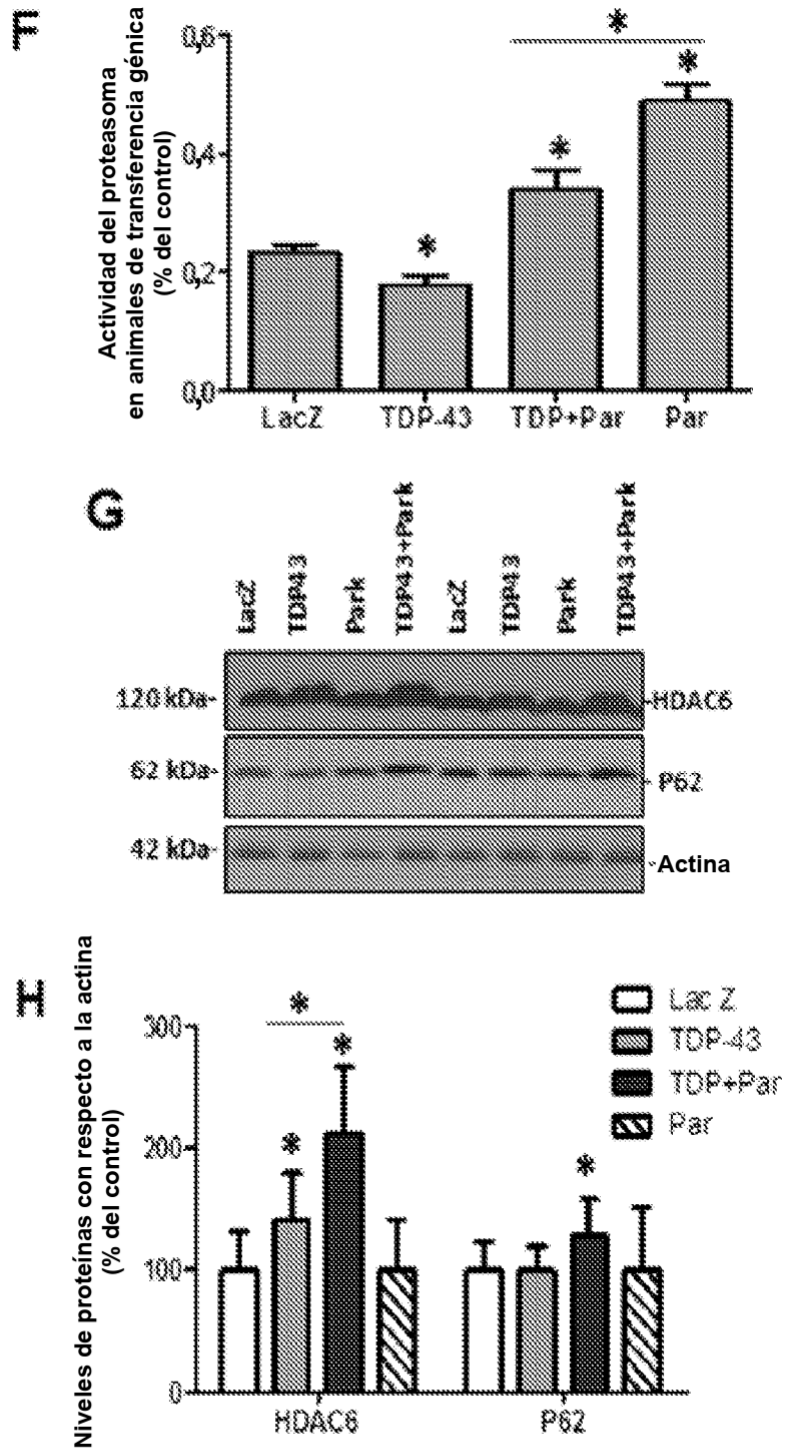


FIG. 72(cont.)

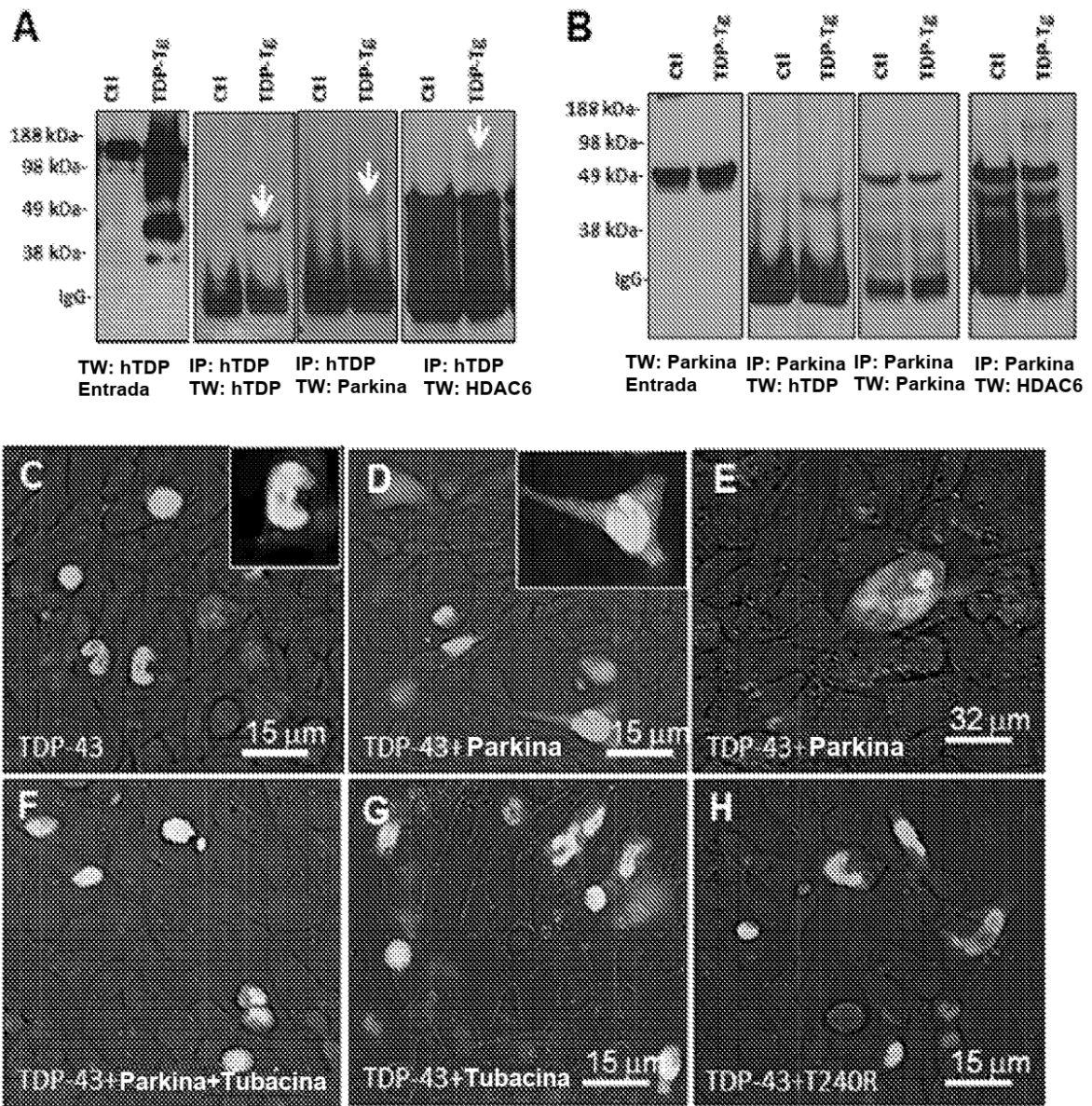


FIG. 73

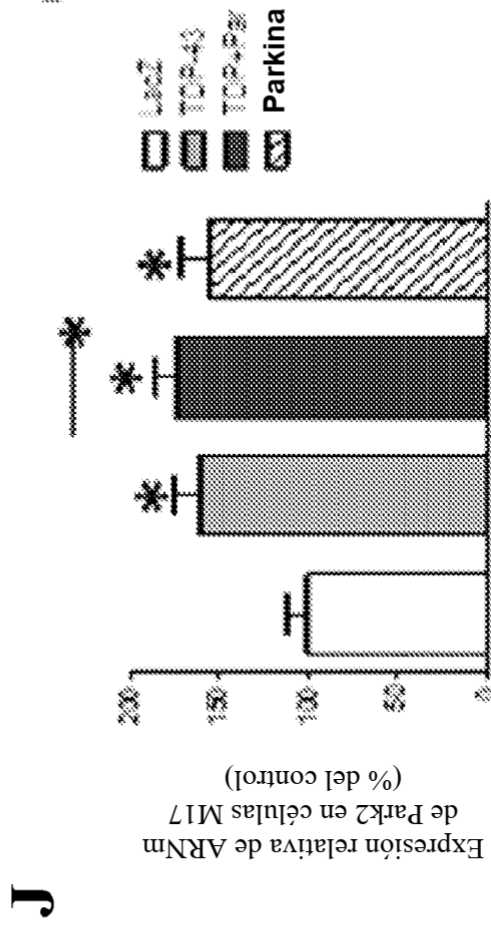
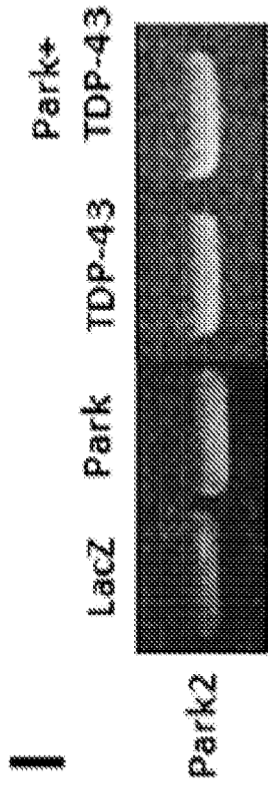


FIG. 73 (cont.)

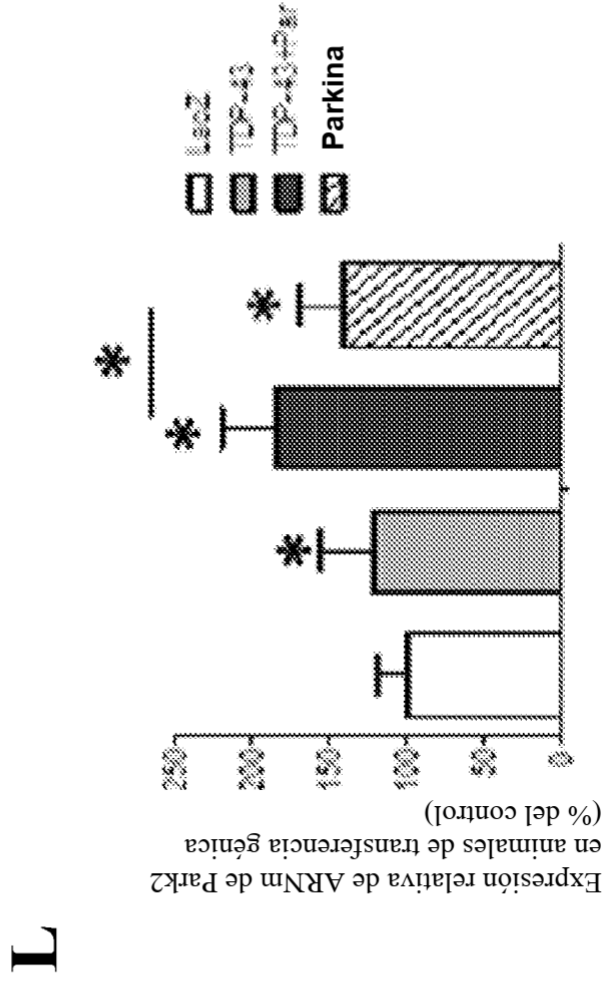
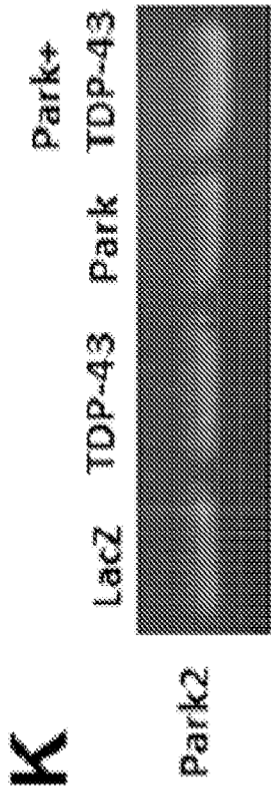


FIG. 73 (cont.)

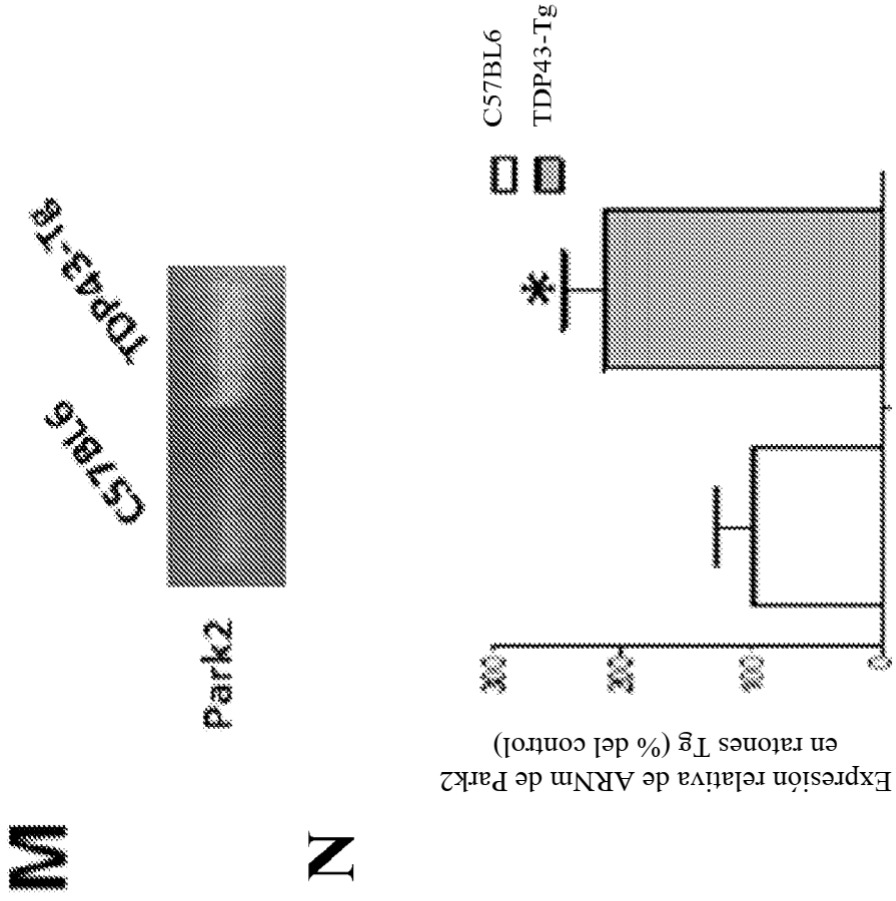


FIG. 73 (cont.)

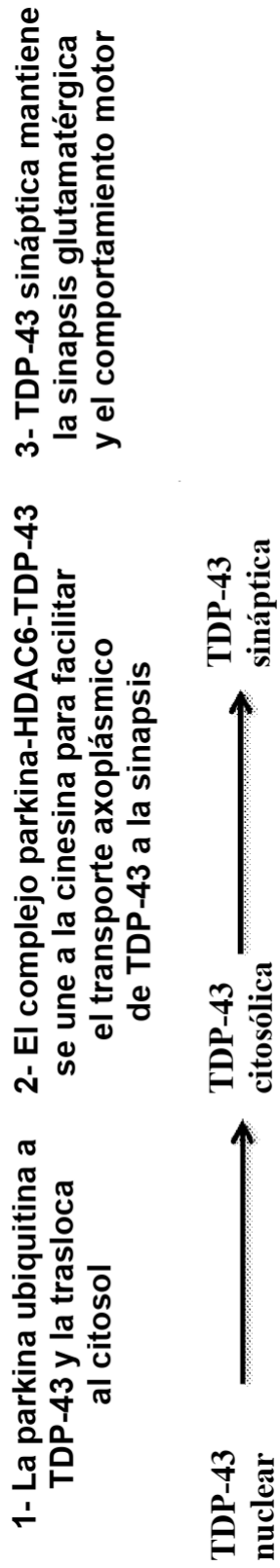


FIG. 74

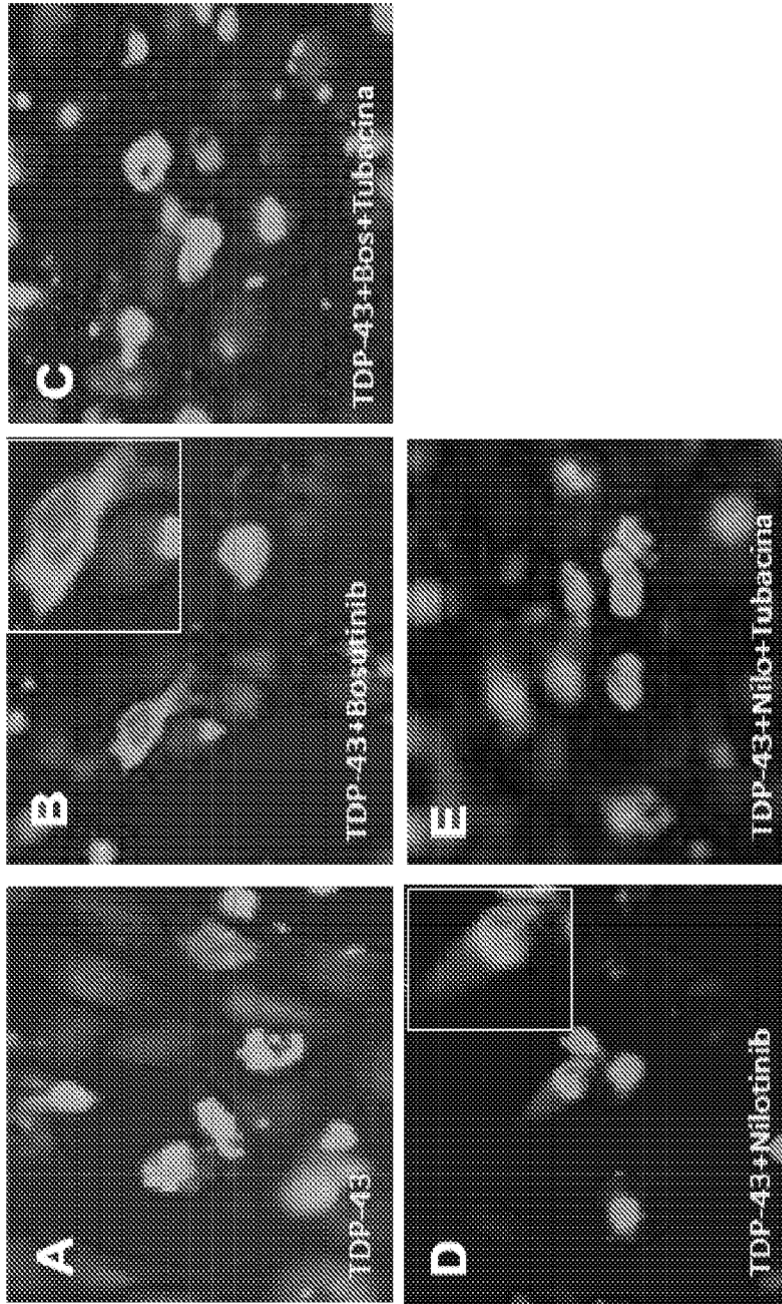


FIG. 75

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citadas por el solicitante es únicamente para la comodidad del lector. No forma parte del documento de la patente europea. A pesar del cuidado tenido en la recopilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO niega toda responsabilidad en este sentido.

Documentos de patentes citados en la descripción

- WO 2010017541 A [0003]

Literatura diferente de patentes citada en la descripción

- **SCHLOSSMACHER ; SHIMURA.** Parkinson's disease: assays for the ubiquitin ligase activity of neural Parkin. *Methods Mol. Biol.*, 2005, vol. 301, 351-69 [0017]
- **MORRISON et al.** A simple cell based assay to measure Parkin activity. *J. Neurochem.*, 2011, vol. 116 (3), 342-9 [0017]
- **BURNS et al.** *Hum. Mol. Genet.*, 2009, vol. 18, 3206-3216 [0017]
- Remington's Pharmaceutical Sciences. Lippincott, Williams & Wilkins, 2005 [0027]
- **BURNS et al.** *Human Molecular Genetics.*, 2009 [0042]
- **REBECK et al.** *J. Biol. Chem.*, 2010, vol. 285, 7440-7446 [0042] [0087]
- **BURNS et al.** *Hum. Mol. Genetics*, 2009, vol. 18, 3206-3216 [0069]
- **KHANDELWAL et al.** *Mol. Neurodegener.*, 2010, vol. 5, 47 [0069]
- **HERMAN; MOUSSA.** *Autophagy*, 2011, vol. 7, 919-921 [0069]