



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Rol de las proteínas α - y γ -sinucleína en la neurotransmisión dopaminérgica nigroestriatal y mesocortical: Implicación en enfermedades neurodegenerativas y trastornos neuropsiquiátricos

Rubén Pavia Collado

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

PROGRAMA DE DOCTORAT EN BIOMEDICINA

**ROL DE LAS PROTEÍNAS α - Y
 γ -SINUCLEÍNA EN LA REGULACIÓN DE LA
NEUROTRANSMISIÓN DOPAMINÉRGICA
NIGROESTRIATAL Y MESOCORTICAL**

**IMPLICACIÓN EN ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS
Y TRASTORNOS NEUROPSIQUIÁTRICOS**

Tesis doctoral presentada por **Rubén Pavia Collado**
para optar al título de doctor por la Universitat de Barcelona

Julio de 2020

Directora

Analía Bortolozzi Biassoni

Co-director

Francesc Artigas Pérez

Doctorando

Rubén Pavia Collado

Tutor

Josep Saura Martí

El presente trabajo ha sido realizado en el Departamento de Neuroquímica y Neurofarmacología del Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona (CSIC), con la financiación de los siguientes proyectos:

Sinucleínas, depresión y enfermedad de Parkinson. Nuevas estrategias terapéuticas basadas en ácidos nucleicos de interferencia (PI13/01390). Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS). Financiado por el Instituto de Salud Carlos III (Fondo de Investigación en Salud) y cofinanciado por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional.

Grup de Recerca Consolidat: Neuroquímica i Neurofarmacologia (2014SGR798). Financiación de la Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca (Generalitat de Catalunya).

Nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento de sinucleinopatías (RTC-2014-2812-1). Consorcio nLife Therapeutics, S.L. – IDIBAPS – Fundació Institut de Recerca Hospital Universitari Vall d'Hebron. Financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad y cofinanciado por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional.

Desarrollo de una terapia para el tratamiento de variantes genéticas de alfa-sinucleína en la enfermedad de Parkinson (RTC-2015-3309-1). Consorcio nLife Therapeutics, S.L. – Fundación Pública Andaluza Progreso y Salud – Fundación Pública Andaluza para la Gestión de la Investigación en Salud. Financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad y cofinanciado por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional.

Sinucleinopatías y oligonucleótidos inhibitorios: rol de alfa- y gamma-sinucleínas en la regulación de la función cognitiva (SAF2016-75797-R). Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer. Financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad y cofinanciado por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional.

Grup de Recerca Consolidat: Neuroquímica i Neurofarmacologia (2017SGR717). Financiación de la Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca (Generalitat de Catalunya).



**Las ideas no duran mucho.
Hay que hacer algo con ellas**

SANTIAGO RAMÓN Y CAJAL (1852-1934)

AGRAÏMENTS

Qui em conega sabrà que no soc una persona de moltes paraules. Però acabar un doctorat també comporta acabar un camí on creixes com a persona i com a científic, i en ambdós casos no pots caminar sol. A mi m'han acompanyat magnífiques persones, així que aprofitaré per a escriure unes quantes paraules més.

Abans que res, la dedicatòria; perquè aquesta tesi la vull dedicar a una persona per a qui no puc tindre suficients paraules, te la dedique a tu, **Eva**. El millor que m'ha pogut passar és l'oportunitat de compartir les nostres vides, recolzant-nos i estimant-nos. M'has donat l'energia i les ganes per acabar aquest projecte, i amb les mateixes ganes començarem junts tots els que ens proposem i arribarem a qualsevol meta que vulguem, perquè a l'horitzó no pot haver-hi millor futur que estar al teu costat.

També he d'agrair **als meus pares** que haja pogut arribar fins ací i els dedique tot aquest treball. Des d'aquell joc de química i aquell micros-copi em vau despertar l'interés per la ciència i per saber més de tot. Amb tots aquells llibres, amb la música, amb el suport perquè poguera estudiar el que m'agradava, amb els valors que m'heu transmés, amb tot això heu format a un fill que està feliç d'haver arribat on està i que sols pot tindre paraules d'orgull i agraïment per a vosaltres.

Continue amb **Analía**, qui m'ha guiat durant aquests anys. Des que em vas acceptar com a doctorand hem tingut molts moments, des del despatx fins als grans congressos, molts debats per un bon resultat i encara més quan no eixien els experiments. Però entre els dos hem fet endavant aquesta tesi, i també m'has ajudat a arribar on estic ara, en l'àmbit personal i professional. I el fet d'haver arribat al final d'aquest camí també li ho agraiïc a **Paco**, sempre compartint la teua experiència i el teu esperit científic, formant-nos i ajudant-nos a fer-nos lloc en el món de la recerca.

I repetisc, aquesta tesi no sols l'he feta jo. He tingut unes quantes mans darrere, sempre ajudant, en els experiments i en l'etapa del doctorat. La primera, **Esther**, per a mi i per a molts has sigut un engranatge principal del laboratori. Ensenyant-nos amb el teu saber fer, sempre preocupant-te per fer endavant la feina –encara que has vist de sobres com

puc liar-la-, fent que tots ens sentirem acollits i que el laboratori fos més que una feina. I també, gràcies a **Vero**, tu més que ningú fa que puguem funcionar, que els experiments puguem eixir com cal, donant-nos un cop de mà fins i tot quan ens costa demanar-lo. Espere que seguim compartint molt més la complicitat dels frikis, amb les xarrades interminables de qualsevol tema des de Star Wars al Japó.

Part d'aquest treball també li l'he d'atribuir a **Raquel**. Amb la teua ajuda he pogut fer endavant molta feina que no haguera pogut jo sol, i espere que hages disfrutat del teu pas amb nosaltres tant com ho he fet jo ensenyant-te. Si per a tot el que faces li poses la mateixa constància que amb els nostres experiments, et costarà molt menys que a mi traure-t'ho tot. I també he d'agrair a **Sharon** que m'haja donat l'oportunitat de treballar més temps i seguir desenvolupant idees. Sense la teua ajuda, deixant-me formar part d'un nou projecte, m'hauria costat molt més veure el final d'aquesta etapa.

Amb tota aquesta gent que m'ha ajudat, que m'han prestat les seues mans i ments, també està la gent que m'ha ensenyat. Al principi, **Mireia**, em vas transmetre tot el que sabies, però a més de les tècniques i les anàlisis ens has donat molt més de tu mateixa, sempre entregada a la resta. Després, **Albert**, has sigut un mentor per a quasi tots els que hem passat pel laboratori, infonent-nos l'energia que tant cal per a fer endavant els nostres doctorats. I també, **Diana**, hem passat molts moments treballant junts i jo aprenent de tu, més experiments i viatges a Mundet dels que podem contar, i al final sembla que les sinucleines ens han donat dues bones tesis als dos.

També vull agrair a la resta del laboratori que heu fet d'aquests anys molt més fàcils i acollidors. Primer, a **Maria i Leti**, amb la vostra feina sempre ens traieu preocupacions per a treballar en ciència, però amb el vostre ànim per ajudar ens feu la vida al laboratori molt més agradable. A **Lluís**, espere tindre't al teu costat a l'escriptori durant molt més i que no deixes mai les ganes per traure tots els resultats que calguen. A **Mireia**, tampoc deixes mai el teu humor i energia ni la teua disposició a recolzar-nos a tots, perquè això més que res t'obrirà totes les portes. A **Júlia**, encara que no hem coincidit molt en els experiments m'alegra haver compartit les nostres idees; potser encara hi haurà temps per compartir alguna manifestació. A **Valentín**, no vas estar molt de temps amb nosaltres però ens vas deixar totes les teues ganes per treballar i per fer-ho tot endavant. A **Neus**, si continues amb la constància i la bona feina que has tingut ací segur que aconseguiràs

qualsevol objectiu. A **Elena i Maurizio**, amb els vostres elèctrodes i el vostre bon humor, ens heu fet molt més amena la vida en el laboratori. A **Anna**, que també m'has ajudat a millorar la feina des de les Comissions i sempre que has tingut ocasió. I des de fora del laboratori, també vull agrair l'ensenyament d'**Elisenda, Anna i Maria**, des del microscopi confocal, i a **Lara**, amb tots els experiments conductuals.

Però hi ha vida fora del laboratori, i en el meu cas, he pogut tenir-ne molta. He tingut molts bons moments i vull viure molts més amb gent que encara he d'agrar. Primer que ningú, a **Samuel i Álvaro**, hem sigut quasi germans durant aquests anys, convivint i compartint-ho tot, donant-nos suport i fent-nos la vida més interessant, dins i fora del pis. Després, també vos agraiïc a **Laura i Libertad** que m'hàgeu fet la vida molt més acollidora, divertint-nos des de qualsevol cafeteria o festa de disfresses fins als carrers de Porto. I també, a tots els meus amics, que tot i que patim de distància sempre esteu ací per a quan ens necessitem, en especial a **Alba**, que espere no canviem mai i continuem units encara que ens veiem dos dies a l'any, i als meus col·legues de Cullera, que sempre traieu temps per a veure'ns, gaudir i respectar la pinta de rigor: **Carlos, Alfredo, Miguel, Juan, Diego, Adri i Sergio**.

Per últim, acabaré agraint a tota la gent que m'ha deixat formar part dels seus cercles, i que han fet i continuen fent de la meua vida en Barcelona una vida més acollidora i interessant: a l'Escola de Blues de Barcelona per permetre'm reconciliar-me amb la música i descobrir-ne molta més; a les associacions amb què he col·laborat, en especial *Scientists Dating Forum* i D-Recerca Precària, sempre en lluita per fer una ciència millor per al món i un món millor per a la ciència; també a la gent del Seminari d'Economia Crítica Taifa i d'Unitat contra el Feixisme i el Racisme, que m'heu ajudat a veure la societat amb altres ulls i aprendre a solucionar els seus problemes. I, sobretot, agraiïc formar part del Partit Socialista Unificat de Catalunya (PSUC-viu) i d'haver-me format amb la seua joventut; mai deixem de lluitar pel nostre present i per construir un futur millor.

ABSTRACT

Las sinucleínas son una familia de proteínas pequeñas y altamente conservadas en vertebrados, especialmente abundantes en las neuronas y típicamente enriquecidas en los terminales presinápticos, donde participan en la homeostasis y el mantenimiento de la función sináptica. Entre ellas, α - y γ -sinucleína (α -Syn y γ -Syn) se expresan de modo abundante en los núcleos monoaminérgicos del cerebro y modulan varios componentes de la neurotransmisión, por lo que constituyen dianas moleculares de alto interés en las enfermedades neuropsiquiátricas y neurodegenerativas. Gran cantidad de evidencias vinculan a la proteína α -Syn con la enfermedad de Parkinson (PD), incluyendo la presencia de agregados proteicos insolubles que contienen la forma fosforilada de α -Syn, así como mutaciones en el gen que codifica para α -Syn. Sin embargo, se conoce menos acerca de la γ -Syn, que también se ha visto implicada en la fisiopatología de enfermedades neurodegenerativas y varias sinucleinopatías.

La presente tesis se ha centrado en el estudio de la distribución y localización celular de γ -Syn en el cerebro de ratón, así como el papel fisiológico de la misma en la regulación de la neurotransmisión dopaminérgica (DA). Para ello se utilizaron dos modelos murinos diferentes, con: 1) sobreexpresión de γ -Syn en las neuronas DA de la *substantia nigra compacta* / área tegemental ventral (SNc/VTA) usando un vector adenoasociado con promotor de citomegalovirus (*AAV10-CMV-mouse- γ -Syn*), y 2) expresión reducida (*knockdown*) de γ -Syn en las neuronas DA de SNc/VTA, inducida por oligonucleótidos inhibitorios (siRNA y ASO). Además, también se examinó si la terapia no viral basada en un oligonucleótido antisentido contra α -Syn conjugado con indatralina (IND-1233-ASO), previamente evaluado en ratones normales y en monos envejecidos, es eficaz en modelos murinos transgénicos de PD portadores de formas mutadas del gen *SNCA* (α Syn**A30P***A53T*) y *LRRK2* (*LRRK2***G2019S*).

γ -Syn se ha caracterizado expresándose selectivamente en los núcleos monoaminérgicos del cerebro de ratón: SNc/VTA, núcleos del rafe (DR) y *locus coeruleus* (LC), así como en los núcleos de la habénula. Mediante la sobreexpresión por AAV10 se han conseguido duplicar de manera estable los niveles de γ -Syn en la SNc/VTA. El silenciamiento por la

aplicación local de un ASO conjugado con indatralina ha reducido un 20-25% la expresión de γ -Syn en la SNc/VTA, mientras que la administración intracerebroventricular ha reducido sus niveles un 40% en los núcleos monoaminérgicos. Mediante ambos modelos se ha demostrado que γ -Syn modula negativamente la liberación de DA y la función de recaptación del transportador de DA en la neurotransmisión nigroestriatal y mesocortical. Además, los ratones con sobreexpresión de γ -Syn mostraron alteraciones en la coordinación motora, la memoria a corto plazo y el aprendizaje.

Los ratones transgénicos α Syn*A30P*A53T mostraron incrementos de la forma humana de α -Syn en la SNc/VTA y el LC, con niveles 3-4 veces superiores a la α -Syn endógena. Paralelamente, los ratones presentaron una menor liberación sináptica de DA en el cuerpo estriado y un mayor aumento de DA frente a la infusión de amfetamina; además, los ratones transgénicos mostraron una menor actividad locomotora y un comportamiento de tipo ansioso. La administración intracerebroventricular de IND-1233-ASO durante 28 días redujo la expresión de la forma humana de α -Syn un 40%, dejando una mejoría en las alteraciones de la neurotransmisión DA, pero no sobre los déficits conductuales. En el modelo LRRK2*G2019S, los ratones presentaron un ligero aumento de la expresión de α -Syn en la SNc/VTA; además, también se detectó una mayor recaptación de DA estriatal y defectos en la memoria a corto plazo. La administración sostenida de IND-1233-ASO durante 28 días no fue capaz de disminuir la expresión de α -Syn en la SNc/VTA de los ratones LRRK2*G2019S.

En conjunto, los resultados de esta tesis han aportado una información muy relevante sobre la localización celular y papel fisiológico de γ -Syn en el cerebro. Concretamente, se ha caracterizado el rol de γ -Syn en la neurotransmisión DA nigroestriatal y mesocortical, y se han desarrollado dos modelos que resultan herramientas útiles para explorar en profundidad las funciones biológicas de γ -Syn y su implicación en las sinucleinopatías y otros trastornos del cerebro. Además, se han caracterizado otros dos modelos con mutaciones frecuentes en los casos familiares de PD, explorando en ellos el potencial terapéutico de los oligonucleótidos antisentido como tratamiento prometedor para la PD y otras sinucleinopatías.

Synucleins are a family of small and highly conserved proteins in vertebrates, especially abundant in neurons and typically enriched in presynaptic terminals, where they take part in homeostasis and maintenance of synaptic function. Among them, α - and γ -synuclein (α -Syn and γ -Syn) are abundantly expressed in monoaminergic nuclei of brain and modulate several components of neurotransmission, so they constitute high-interest molecular targets in neuropsychiatric and neurodegenerative diseases. A substantial amount of evidence links α -Syn protein with Parkinson's disease (PD), including insoluble protein aggregates containing the phosphorylated form of α -Syn, and mutations in the gene coding for α -Syn. However, less is known about γ -Syn, which has also been implicated in physiopathology of neurodegenerative diseases and several synucleinopathies.

The present thesis has focused on the study of the distribution and cellular localization of γ -Syn in the mouse brain, and its physiological role in the modulation of dopaminergic (DA) neurotransmission. For it, we used two different murine models, with 1) γ -Syn overexpression in DA neurons of *substantia nigra compacta*/ventral tegmental area (SNc/VTA), using an adenoassociated vector with cytomegalovirus promoter (*AAV10-CMV-mouse- γ -Syn*), and 2) γ -Syn knockdown in DA neurons of SNc/VTA, induced by inhibitory oligonucleotides (siRNA and ASO). Also, we examined whether non-viral therapy based on an antisense oligonucleotide against α -Syn conjugated with indatraline (IND-1233-ASO), previously tested in normal mice and aged monkeys, is efficient in transgenic murine models of PD carriers of mutated forms of *SNCA* gene (α Syn**A30P***A53T*) and *LRRK2* (*LRRK2***G2019S*).

γ -Syn has been characterized expressing selectively in monoaminergic nuclei of mouse brain: SNc/VTA, raphe nuclei (DR), and *locus coeruleus* (LC), as well as habenula nuclei. Through AAV10 overexpression we have stably duplicated γ -Syn expression levels in SNc/VTA. Silencing by local application of indatraline-conjugated ASO reduced by 20-25% the γ -Syn expression in SNc/VTA, while intracerebroventricular administration reduced its levels by 40% in monoaminergic nuclei. With both models, we have showed that γ -Syn negatively modulates DA release and reuptake function of DA transporter in nigrostriatal

and mesocortical neurotransmission. Furthermore, mice with γ -Syn overexpression showed alterations in motor coordination, short-term memory, and learning.

Transgenic mice α Syn**A30P***A53T* showed an increase of the human form of α -Syn in SNc/VTA and LC, with 3- to 4-fold higher levels in comparison with endogenous α -Syn. In parallel, mice showed a lesser DA synaptic release in the striatum, and higher DA increases after amphetamine-infusion; moreover, transgenic mice showed a lesser locomotor activity and an anxious-like behavior. Intracerebroventricular IND-1233-ASO administration during 28 days reduced the human form of α -Syn expression by 40%, inducing an improvement in DA neurotransmission alterations, but not on behavioral deficits. In the LRRK2**G2019S* model, mice showed a mild increase in α -Syn expression in SNc/VTA; also, we detected a higher striatal DA reuptake and an impairment in short-term memory. Sustained IND-1233-ASO administration during 28 days was not able to diminish α -Syn expression in SNc/VTA in LRRK2**G2019S* mice.

On the whole, the results of this thesis have offered very relevant information about cellular localization and the physiological role of γ -Syn in the brain. Specifically, the γ -Syn role in nigrostriatal and mesocortical neurotransmission has been characterized, and we have developed two models that prove to be useful tools to explore biological functions of γ -Syn and its implication in synucleinopathies and other cerebral disorders. Furthermore, we have characterized two more models with frequent mutations in familiar cases of PD, exploring the therapeutic potential of antisense oligonucleotides as a promising treatment for PD and other synucleinopathies.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	23
1. LAS SINUCLEÍNAS	25
a. Propiedades de la familia	25
i. Origen de las sinucleínas	25
ii. Estructura y características biofísicas	26
iii. Expresión y distribución	28
b. Funciones fisiológicas de las sinucleínas	30
i. Funciones sinápticas: las sinucleínas como chaperonas	30
ii. El papel de las sinucleínas en la neurotransmisión monoaminérgica	32
2. LAS SINUCLEINOPATÍAS	34
a. Las α -sinucleinopatías en la clínica	35
i. Enfermedad de Parkinson	35
ii. Demencia con cuerpos de Lewy	39
iii. Atrofia multisistémica	41
b. Etiología ambiental y genética de las sinucleinopatías	43
i. Mutaciones en el gen SNCA: implicación en las α -sinucleinopatías	44
ii. Factores genéticos indirectos	47
c. Aspectos neuropatológicos de las sinucleinopatías	52
i. Los circuitos monoaminérgicos	52
ii. La hipótesis de Braak	57
iii. Cuerpos de Lewy y alteraciones histopatológicas	59
iv. Efectos tóxicos de las sinucleínas	60
v. γ -Sinucleína como marcador tumoral	65
3. TRATAMIENTOS DE LAS SINUCLEINOPATÍAS	66
a. Tratamientos actuales	66
i. Terapia farmacológica	66
ii. Otros tipos de tratamiento	68
b. Terapias experimentales	69
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	73
a. Hipótesis	75
b. Objetivos	76
MATERIALES Y MÉTODOS	77
a. Animales	79
i. Modelos de ratones transgénicos	79
b. Modelo de sobreexpresión mediante vectores víricos	80
c. Modelo de silenciamiento mediante oligonucleótidos antisentido	81
d. Hibridación <i>in situ</i>	83
i. Hibridación radiactiva	84
ii. Cuantificación de los autorradiogramas	85

e. Inmunohistoquímica	86
f. <i>Western blot</i>	87
g. Fármacos y reactivos	89
h. Microdiálisis intracerebral	89
i. Pruebas conductuales	91
j. Análisis estadístico	94
RESULTADOS	95
TRABAJO 1 – MODULACIÓN DE LOS NIVELES ENDÓGENOS DE γ-SINUCLEÍNA EN MODELOS DE RATÓN	97
1. DISTRIBUCIÓN DE γ-SINUCLEÍNA EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL	97
2. MODELO DE SOBREEXPRESIÓN DE γ-SINUCLEÍNA EN NEURONAS DOPAMINÉRGICAS DE LA SNc/VTA INDUCIDO POR UN VECTOR VÍRICO ADENOASOCIADO	99
a. Sobreexpresión de γ -sinucleína en la SNc/VTA	100
b. Consecuencias de la sobreexpresión de γ -sinucleína sobre la neurotransmisión DA	105
c. Consecuencias conductuales de la sobreexpresión de γ -sinucleína	111
i. <i>Comportamiento motor</i>	111
ii. <i>Función cognitiva</i>	112
3. MODELO DE SILENCIAMIENTO DE γ-SINUCLEÍNA EN NEURONAS DOPAMINÉRGICAS DE LA SNc/VTA MEDIANTE OLIGONUCLEÓTIDOS ANTISENTIDO	117
a. Estudio preliminar: silenciamiento agudo de γ -sinucleína mediante RNAs pequeños de interferencia	117
b. Reducción de la expresión de γ -sinucleína en la SNc/VTA por la administración local de IND-1415-ASO	119
c. Consecuencias de la reducción de la proteína γ -sinucleína sobre la neurotransmisión DA	125
d. Estudio piloto: reducción sostenida de la expresión de γ -sinucleína en los núcleos monoaminérgicos por la administración intracerebroventricular de IND-1415-ASO	130
TRABAJO 2 – MODELOS TRANSGÉNICOS	134
αSyn*A30P*A53T Y LRRK2*G2019S	
1. CARACTERIZACIÓN DEL MODELO MURINO TRANSGÉNICO αSyn*A30P*A53T	134
a. Perfil de expresión de α -Syn endógena y humana y de γ -Syn	134
b. Evaluación de la neurotransmisión DA en el modelo murino α Syn* A30P* A53T	139
c. Caracterización conductual del modelo α Syn* A30P* A53T	142
2. EFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN INTRACEREBROVENTRICULAR DE IND-1233-ASO CONTRA α-SINUCLEÍNA EN EL MODELO αSyn*A30P*A53T	145
a. Reducción de la expresión de la forma humana de α -sinucleína en el modelo α Syn* A30P* A53T inducida por IND-1233-ASO	145
	149

b. El tratamiento con IND-1233-ASO modificó la neurotransmisión DA en el modelo α Syn*A30P*A53T	
c. El tratamiento con IND-1233-ASO no modificó el déficit motor ni el comportamiento de tipo ansioso en el modelo α Syn*A30P*A53T	152
3. CARACTERIZACIÓN DEL MODELO MURINO TRANSGÉNICO LRRK2*G2019S	153
a. Perfil de expresión de α -sinucleína	154
b. Evaluación de la neurotransmisión DA en el modelo LRRK2*G2019S	155
c. Caracterización conductual del modelo LRRK2*G2019S	158
d. Efectos del tratamiento sostenido con IND-1233-ASO contra α -sinucleína en el modelo LRRK2*G2019S	160
DISCUSIÓN	163
a. Consideraciones generales	165
b. Expresión preferencial de γ -sinucleína en los núcleos monoaminérgicos y en la habénula lateral de ratón	167
c. Modelo murino de sobreexpresión y de silenciamiento de γ -sinucleína en SNC/VTA	168
d. Regulación de la neurotransmisión DA nigroestriatal y mesocortical por γ -sinucleína	176
e. La sobreexpresión de γ -sinucleína en la SNC/VTA conduce a alteraciones motoras y cognitivas	181
f. Las mutaciones *A30P*A53T de α -sinucleína y G2019S de LRRK2 inducen alteraciones de la neurotransmisión DA y déficits del comportamiento en ratones	183
i. <i>Modelo αSyn*A30P*A53T</i>	184
ii. <i>Modelo LRRK2*G2019S</i>	188
g. La administración de IND-1233-ASO en el modelo murino α Syn*A30P*A53T revierte las alteraciones en la neurotransmisión DA, pero no el fenotipo conductual	191
CONCLUSIONES	195
REFERENCIAS	199
PUBLICACIONES Y PRESENTACIONES	201
BIBLIOGRAFÍA	204

ABREVIATURAS

α -Syn	α -Synuclein	α -Sinucleína
β -Syn	β -Synuclein	β -Sinucleína
γ -Syn	γ -Synuclein	γ -Sinucleína
5-HT	Serotonin / Serotoninergic	Serotonina / Serotoninérgico/a
AAV	Adeno-associated virus	Virus adenoasociado
ASO	Antisense oligonucleotide	Oligonucleótido antisentido
CMV	Cytomegalovirus	Citomegalovirus
CPu	Caudate putamen (striatum)	Caudado putamen (cuerpo estriado)
DA	Dopamine / Dopaminergic	Dopamina / Dopaminérgico/a
DAT	Dopamine transporter	Transportador de dopamina
DLB	Dementia with Lewy bodies	Demencia con cuerpos de Lewy
DOPAC	3,4-dihydroxyphenylacetic acid	Ácido 3,4-dihidroxifenilacético
DR	Dorsal raphe nucleus	Núcleo del rafe dorsal
GFP	Green fluorescent protein	Proteína fluorescente verde
(h)- α -Syn	Human α -Synuclein	α -Sinucleína humana
Hb	Habenula	Habénula
HPC	Hippocampus	Hipocampo
i.c.v.	Intracerebroventricular	Intracerebroventricular
IHC	Immunohistochemistry	Inmunohistoquímica
i.p.	Intraperitoneal	Intraperitoneal
IND	Indatraline	Indatralina
ISH	In situ hybridization	Hibridación <i>in situ</i>
LB	Lewy body	Cuerpo de Lewy
LC	Locus coeruleus	Locus cerúleo
LCR	-	Líquido cefalorraquídeo artificial
LRRK2	Leucine-rich repeat kinase 2	-
miRNA	MicroRNA	MicroRNA
MnR	Medial raphe nucleus	Núcleo del rafe medial
mPFC	Medial prefrontal cortex	Corteza prefrontal medial
MPTP	1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
MSA	Multisystemic atrophy	Atrofia multisistémica
NA	Noradrenaline / Noradrenergic	Noradrenalina / Noradrenérgico/a

NAC	<i>Non-Aβ-component</i>	Componente no amiloideo
NAT	<i>Noradrenaline transporter</i>	Transportador de noradrenalina
PD	<i>Parkinson's disease</i>	Enfermedad de Parkinson
SERT	<i>Serotonin transporter</i>	Transportador de serotonina
siRNA	<i>Small interference RNA</i>	RNA pequeño de interferencia
SNC	<i>Substantia nigra compacta</i>	Substantia nigra compacta
TH	<i>Tyrosine hydroxylase</i>	Tirosina hidroxilasa
VTA	<i>Ventral tegmental area</i>	Área tegmental ventral
WT	<i>Wild-type</i>	-

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Alineamiento de secuencias ortólogas de los tres miembros de la familia de las sinucleínas entre vertebrados	26
Figura 2. Vista axial de los residuos de α -Syn en interacción con membranas plasmáticas desde la conformación de α -hélice	27
Figura 3. Esquema de la función fisiológica de α -Syn sobre el complejo SNARE	31
Figura 4. Esquema propuesto para la regulación del tráfico sináptico por parte de α -Syn	33
Figura 5. Detección histoquímica de los cuerpos de Lewy en neuronas de la SN	36
Figura 6. Representación del curso temporal de la presencia de los síntomas no-motores y motores en la PD	38
Figura 7. Inmunorreactividad contra α -Syn en las principales sinucleinopatías	42
Figura 8. El sistema ubiquitina-proteasomal en la PD	48
Figura 9. Esquema de las principales vías dopaminérgicas en el cerebro humano	53
Figura 10. Circuito del movimiento en condiciones normales y patológicas	55
Figura 11. Denervación dopaminérgica y serotoninérgica en pacientes de PD	56
Figura 12. Estadios de Braak en la PD	58
Figura 13. Representación de la estructura de α -Syn	60
Figura 14. Propagación y agregación de α -Syn	64
Figura 15. Terapias experimentales para frenar la progresión de la patología de la PD	69
Figura 16. Patrón de expresión de γ -Syn y α -Syn en el cerebro de ratón	98
Figura 17. Patrón de expresión de β -Syn en los núcleos monoaminérgicos del cerebro de ratón.	99
Figura 18. Sobreexpresión del mRNA de γ -Syn endógena inducida por AAV10 en la SNc/VTA.	101
Figura 19. Expresión del transcrito de α -Syn en la SNc/VTA y del transcrito de γ -Syn en el DR y el LC en el modelo de sobreexpresión AAV10	103
Figura 20. Niveles de expresión de DAT en el modelo AAV10	103
Figura 21. Niveles de las proteínas γ -Syn y α -Syn en la SNc/VTA de ratones con sobreexpresión de γ -Syn endógena inducida por AAV10	104
Figura 22. Efectos sobre la neurotransmisión DA nigroestriatal y mesocortical en el modelo AAV10- γ -Syn a las 4 semanas post-inyección	106
Figura 23. Efectos sobre la neurotransmisión DA nigroestriatal y mesocortical en el modelo AAV10- γ -Syn a las 12 semanas post-inyección	108
Figura 24. Niveles extracelulares de DOPAC en CPu y mPFC en el modelo AAV10- γ -Syn	110
Figura 25. Cambios conductuales en el modelo AAV10- γ -Syn	114
Figura 26. Efectos de la inyección de un vector AAV10-CMV vacío en la SNc/VTA	116
Figura 27. Expresión de γ -Syn en las neuronas DA de la SNc/VTA tras la administración local de siRNAs	118
Figura 28. Silenciamiento de γ -Syn en las neuronas DA de la SNc/VTA inducido por IND-1415-ASO	120
Figura 29. Expresión del transcrito de α -Syn en la SNc/VTA y del transcrito de γ -Syn en el DR y el LC en el modelo de silenciamiento por IND-1415-ASO	121
Figura 30. Niveles de expresión de DAT en el modelo de silenciamiento por IND-1415-ASO	122
Figura 31. Efectos de la inyección de IND-1227-ASO en la SNc/VTA	123
Figura 32. Niveles de las proteínas γ -Syn y α -Syn en la SNc/VTA de ratones tratados con IND-1415-ASO	124
Figura 33. Efectos sobre la neurotransmisión DA nigroestriatal y mesocortical en el modelo de silenciamiento por IND-1415-ASO	127
Figura 34. Niveles extracelulares de DOPAC en CPu y mPFC en el modelo IND-1415-ASO	129
Figura 35. Silenciamiento de γ -Syn en los núcleos monoaminérgicos por la administración intracerebroventricular de IND-1415-ASO	131
Figura 36. Expresión de α - y β -Syn en los núcleos monoaminérgicos tras la administración intracerebroventricular de IND-1415-ASO	133
Figura 37. Expresión de la α -Syn endógena en el modelo murino α Syn* $A30P^*A53T$	135

Figura 38. Expresión de (h)- α -Syn en el modelo murino α Syn*A30P*A53T	136
Figura 39. Expresión de las formas endógena y transgénica de α -Syn en el modelo α Syn*A30P*A53T	137
Figura 40. Expresión de la γ -Syn endógena en el modelo murino α Syn*A30P*A53T	138
Figura 41. Cantidad de células TH ⁺ en la SNc/VTA del modelo murino α Syn*A30P*A53T	138
Figura 42. Efectos sobre la neurotransmisión DA nigroestriatal en el modelo α Syn*A30P*A53T	140
Figura 43. Niveles extracelulares de DOPAC en CPu en el modelo α Syn*A30P*A53T	141
Figura 44. Alteraciones motoras en el modelo α Syn*A30P*A53T	143
Figura 45. Alteraciones cognitivo-emocionales en el modelo α Syn*A30P*A53T	144
Figura 46. Efectos de la administración de IND-1233-ASO en el modelo α Syn*A30P*A53T	146
Figura 47. Reducción de la proteína (h)- α -Syn por la administración de IND-1233-ASO en el modelo α Syn*A30P*A53T	148
Figura 48. Efectos de la administración de IND-1233-ASO en la neurotransmisión DA nigroestriatal del modelo α Syn*A30P*A53T	150
Figura 49. Niveles extracelulares de DOPAC en CPu en los ratones α Syn*A30P*A53T tratados con IND-1233-ASO o vehículo	151
Figura 50. Efectos de la administración de IND-1233-ASO sobre el fenotipo conductual del modelo α Syn*A30P*A53T	153
Figura 51. Expresión de α -Syn en el modelo murino LRRK2*G2019S	154
Figura 52. Efectos sobre la neurotransmisión DA nigroestriatal en el modelo LRRK2*G2019S	156
Figura 53. Niveles extracelulares de DOPAC en CPu en el modelo LRRK2*G2019S	158
Figura 54. Alteraciones conductuales en el modelo LRRK2*G2019S	160
Figura 55. Efectos de la administración de IND-1233-ASO en el modelo LRRK2*G2019S	161
Tabla 1. Principales genes y proteínas identificadas como factores de riesgo genético de la PD	50
Tabla 2. Modelos experimentales empleados	80
Tabla 3. Secuencias de ASOs y siRNAs usadas	83
Tabla 4. Sondas antisentido de cDNA empleadas para los experimentos de hibridación <i>in situ</i>	84
Tabla 5. Anticuerpos primarios y secundarios empleados para la detección de proteínas por inmunohistoquímica y <i>Western blot</i>	88
Tabla 6. Niveles basales de DA extracelular en mPFC y CPu en el modelo de sobreexpresión por AAV10- γ -Syn	105
Tabla 7. Niveles basales de DOPAC extracelular en mPFC y CPu en el modelo de sobreexpresión por AAV10- γ -Syn	109
Tabla 8. Niveles basales de DA extracelular en mPFC y CPu en el modelo de silenciamiento por IND-1415-ASO	125
Tabla 9. Niveles basales de DOPAC extracelular en mPFC y CPu en el modelo de silenciamiento por IND-1415-ASO	128
Tabla 10. Niveles basales de DA extracelular en CPu en el modelo transgénico α Syn*A30P*A53T	139
Tabla 11. Niveles basales de DOPAC extracelular en CPu en el modelo transgénico α Syn*A30P*A53T	141
Tabla 12. Niveles basales de DA extracelular en CPu los ratones α Syn*A30P*A53T administrados con IND-1233-ASO y vehículo	149
Tabla 13. Niveles basales de DOPAC extracelular en CPu los ratones α Syn*A30P*A53T administrados con IND-1233-ASO y vehículo	151
Tabla 14. Niveles basales de DA extracelular en CPu en el modelo transgénico LRRK2*G2019S	155
Tabla 15. Niveles basales de DOPAC extracelular en CPu en el modelo transgénico LRRK2*G2019S	157

1. LAS SINUCLEÍNAS

A. PROPIEDADES DE LA FAMILIA

I. ORIGEN DE LAS SINUCLEÍNAS

Las sinucleínas son una familia de proteínas solubles, con 127-140 aminoácidos y alrededor de 14 kDa. La familia se compone de tres miembros: **α -sinucleína** (α -Syn), **β -sinucleína** (β -Syn) y **γ -sinucleína** (γ -Syn), que sólo están presentes en vertebrados. No tienen ningún precursor procariota, pese a que en regiones cortas de su secuencia presentan similitud con apolipoproteínas, la chaperona 14-3-3 o las proteínas *heat-shock* (Clayton & George, 1998; Ostrerova *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2004). Por esto, las sinucleínas pueden considerarse innovaciones moleculares en los organismos eucariotas, que probablemente se desarrollaron ante la necesidad de regular la función sináptica y la plasticidad del sistema nervioso.

Según el análisis filogenético de las tres proteínas, γ -Syn sería el ancestro común a α -Syn y β -Syn, y la menos conservada de las tres (Yuan & Zhao, 2013). Aunque las tres proteínas difieren muy poco entre especies, cerca del 15% de sus residuos han divergido durante la evolución (**Figura 1**). En humanos, los genes de las tres proteínas presentan 5 exones codificantes (Lavedan, 1998); el gen codificante para α -Syn (*SNCA*) se ha mapeado en el cromosoma 4q21.2-q22, el de β -Syn (*SNCB*) en el 5q35 y el de γ -Syn (*SNCG*) en el 10q23.2-q23.3 (Chen *et al.*, 1995; Spillantini *et al.*, 1995; Ninkina *et al.*, 1998).

En cuanto a la secuencia aminoacídica, las tres sinucleínas se caracterizan por una ausencia completa de cisteínas y triptófanos. Toda la familia presenta un dominio amino-terminal altamente conservado con repeticiones de 11 aminoácidos, seguido de una región central hidrofóbica y de un extremo carboxi-terminal con una mayor variabilidad, que podría explicar la divergencia de funciones en la familia y las distintas interacciones con otras proteínas (George, 2002; Sung & Eliezer, 2006).

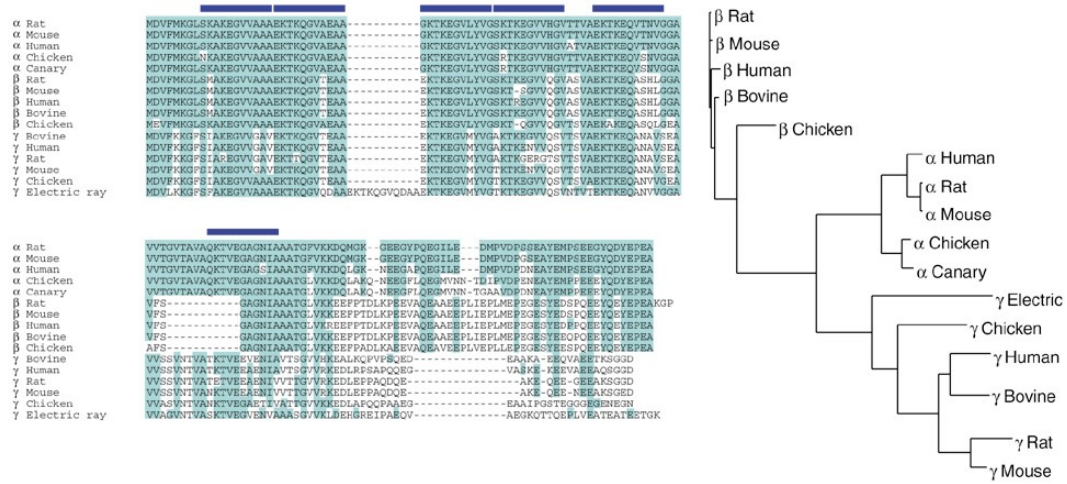


Figura 1. Alineamiento de secuencias ortólogas de los tres miembros de la familia de las sinucleínas entre vertebrados, indicando la identidad respecto a la secuencia de α -Syn en rata (sombreado azul) y las repeticiones de 11 residuos (barras azules). Como se observa en la relación filogenética, la divergencia entre las tres sinucleínas se produjo antes de la diversificación de los vertebrados. Obtenido de George, 2002.

II. ESTRUCTURA Y CARACTERÍSTICAS BIOFÍSICAS

En condiciones fisiológicas, las sinucleínas presentan una **conformación *random coil***, es decir, desplegada de manera natural e intrínsecamente desordenada, a causa de la repulsión electrostática entre sus cargas negativas y la baja hidrofobicidad de las proteínas (Uversky *et al.*, 2000; 2001). En concreto, β -Syn presenta dichas propiedades más evidentemente que α - y γ -Syn, que tienen una estructura algo más compacta y estable (Weinreb *et al.*, 1996; Uversky *et al.*, 2002). Estructuralmente, las tres sinucleínas comparten tres dominios proteínicos que les proveen de sus propiedades:

- **Región N-terminal** con alto contenido de residuos básicos, con repeticiones de 11 aminoácidos que contienen un núcleo conservado, KTKEGV. Este dominio permite que las sinucleínas puedan adoptar una forma de α -hélice anfipática cuando se unen a las superficies cargadas negativamente de las bicapas de fosfolípidos (**Figura 2**) (Perrin *et al.*, 2000; Chandra *et al.*, 2003; Ulmer & Bax, 2005; Ulmer *et al.*, 2005). Esto guarda similitud con algunas apolipoproteínas, asociadas con el transporte de lípidos (George *et al.*, 1995; Davidson *et al.*, 1998).

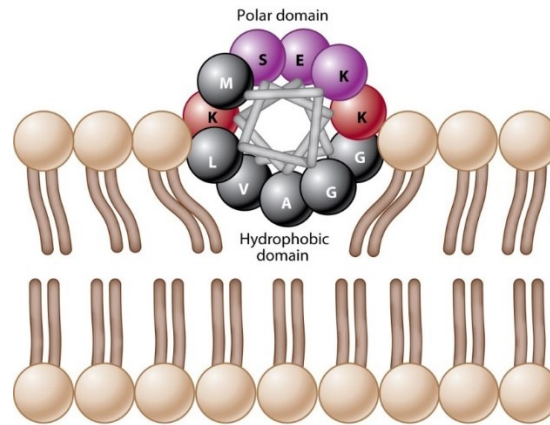


Figura 2. Vista axial de los residuos de α -Syn en interacción con membranas plasmáticas desde la conformación de α -hélice. Mientras que los residuos hidrofílicos (S, E, K) se sitúan hacia la cara citosólica, los hidrofóbicos se intercalan entre las cadenas lipídicas de la membrana, y los residuos de lisina cargados (K) separan ambos dominios e interactúan con la superficie aniónica de los fosfolípidos. Obtenido de Auluck *et al.*, 2010.

- **Región interna NAC (*non-A β -component*)**, dominio hidrofóbico y más variable, esencial para la agregación y la formación de fibrillas amiloides en el caso de α -Syn (Yoshimoto *et al.*, 1995; Giasson *et al.*, 2001a). En el caso de β -Syn, la ausencia de 11 aminoácidos en esta región impide que pueda fibrilarse (Kahle *et al.*, 2002).
- **Región C-terminal**, con un alto contenido de residuos acídicos como glutamato. Esto provoca que la región mantenga una conformación desestructurada, incluso en presencia de membranas (Jao *et al.*, 2004). De esta forma, puede actuar como sitio de unión de otras proteínas o algunos cationes (Ca^{2+} , Cu^{2+} , etc.), y regula los procesos de agregación amiloide (Eliezer *et al.*, 2001; Hoyer *et al.*, 2004).

Esta estructura provee a las sinucleínas de múltiples funciones e interacciones, tanto con membranas como con otras proteínas. En el caso de α -Syn, se ha comprobado que puede alterar la estructura bicapa de las membranas, afectando propiedades como su curvatura, su fluidez o el recambio de ácidos grasos, e incluso llegando a formar pequeñas vesículas (Castagnet *et al.*, 2005; Golovko *et al.*, 2005; Madine *et al.*, 2006). Cuando se une a vesículas con ácidos grasos poliinsaturados, α -Syn también puede multimerizar y adoptar estructuras de lámina β (Perrin *et al.*, 2001).

En ciertas situaciones, especialmente ante un estrés celular, la región NAC de las sinucleínas le confiere una alta propensión a fibrilar, sobre todo en el caso de α -Syn. En

comparación, γ -Syn requiere una mayor concentración y tiempo para la agregación, tal vez por la mayor propensión a la estructura de α -hélice que presenta γ -Syn en su región central (Uversky *et al.*, 2002). En el caso de β -Syn no se ha visto ninguna evidencia hacia la fibrilación, sino que se ha encontrado un efecto contrario, de modo que la presencia de moléculas de β -Syn junto a α -Syn inhibe la formación de fibrillas de α -Syn (Hashimoto *et al.*, 2001). En estados agregados, las sinucleínas todavía pueden interactuar con algunas proteínas o membranas; así, α -Syn y γ -Syn pueden provocar la permeabilización de las vesículas fosfolipídicas al unirse a ellas, y en los mismos agregados de α -Syn se aprecia la presencia de vesículas y otros tipos de proteínas (Nishimura *et al.*, 1994; Park & Lansbury, 2003; Soper *et al.*, 2008).

III. EXPRESIÓN Y DISTRIBUCIÓN

Las sinucleínas se localizan predominantemente en el sistema nervioso. En humanos, α - y β -Syn se encuentran sobre todo en el cerebro, con una expresión abundante en los núcleos monoaminérgicos (Abeliovich *et al.*, 2000). A nivel celular se localizan preferentemente en el **citósol y terminales presinápticos** de zonas como el neocórtex, hipocampo, cuerpo estriado, amígdala, tálamo o cerebelo (Nakajo *et al.*, 1994; George *et al.*, 1995; Iwai *et al.*, 1995; Withers *et al.*, 1997; Clayton & George, 1998; Murphy *et al.*, 2000). Por su parte, γ -Syn se expresa también en el cerebro, aunque en menor proporción, y en tejido nervioso periférico como las neuronas sensoriales primarias, las motoneuronas o los fotorreceptores de la retina. También se ha descrito la localización de γ -Syn en el epitelio respiratorio y en distintos tumores de estado avanzado (Ji *et al.*, 1997; Buchman *et al.*, 1998; Lavedan *et al.*, 1998; Duda *et al.*, 1999; Surgucheva & Surguchov, 2008). Además, tanto α -Syn como γ -Syn se han localizado en músculo esquelético y cardíaco, páncreas y riñón (Lavedan, 1998).

Durante el desarrollo embrionario se ha observado una translocación de las sinucleínas desde el soma neuronal hacia los terminales nerviosos, cuando ya se han formado las sinapsis funcionales (Withers *et al.*, 1997; Galvin *et al.*, 2001a). En roedores, los niveles de expresión alcanzan un nivel máximo en las primeras semanas postnatales, disminuyendo a lo largo de su vida (Kholodilov *et al.*, 1999; Petersen *et al.*, 1999). Esto concuerda con la

aparición evolutiva de las sinucleínas, y su implicación en funciones tales como la neurogénesis, la plasticidad sináptica o la regulación fina de la neurotransmisión. Sin embargo, en humanos y otros primates se ha visto un patrón contrario, de modo que los niveles de α -Syn aumentan de manera dependiente con la edad (Chu & Kordower, 2007).

En edad adulta, **los niveles de expresión en las células pueden variar en respuesta a estímulos o elementos regulatorios** que suelen actuar sobre el intrón 1 de las sinucleínas (Surguchov, 2008). En el caso de α -Syn, su expresión puede aumentar ante factores de crecimiento como NGF o bFGF o la presencia de dopamina (DA) (Gómez-Santos *et al.*, 2005; Clough & Stefanis, 2007). En el gen de γ -Syn, las secuencias cis-regulatorias en el intrón 1 y la metilación del exón 1 son especialmente importantes para su expresión en distintos tipos celulares, ya que su alteración puede llevar a la expresión aberrante como la que se encuentra en varios tipos de cáncer de mama (Lu *et al.*, 2001, 2002).

En condiciones normales, las sinucleínas son trasladadas del soma hacia el terminal sináptico por **transporte axonal** (Saha *et al.*, 2004). Hasta un 76% de la α -Syn es transportada por la vía lenta de transporte (8 mm/día), al igual que el resto de proteínas citosólicas, mientras que el resto se une a las membranas de vesículas, que circulan por la vía rápida (50-400 mm/día) (Jensen *et al.*, 1998, 1999; Utton *et al.*, 2005). Sin embargo, alteraciones de la α -Syn como la mutación A30P o una fosforilación excesiva pueden impedir este transporte, provocando una acumulación y la pérdida de su función biológica (Jensen *et al.*, 1998; Jo *et al.*, 2002).

Además de la localización citosólica, las sinucleínas también se han detectado en el **núcleo celular**, hacia donde pueden translocarse en respuesta a factores de estrés (Sangchot *et al.*, 2002; Surgucheva *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2006; Schneider *et al.*, 2007; Yu *et al.*, 2007). Los mecanismos subyacentes a la translocación nuclear aún se desconocen, pero una vez dentro del núcleo, en especial α -Syn puede desempeñar un papel en la regulación de la transcripción. Aunque todavía no existe un consenso claro, es posible que α -Syn interactúe directamente con el DNA o que regule diferentes factores claves en la transcripción. Por otro lado, las sinucleínas suelen considerarse proteínas intracelulares, pero se han podido encontrar moléculas de α -Syn en espacios externos como **líquido cefalorraquídeo y plasma**, y tanto α -Syn como γ -Syn en elementos como las plaquetas (Borghetti *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2002; El-Agnaf *et al.*, 2003).

B. FUNCIONES FISIOLÓGICAS DE LAS SINUCLEÍNAS

Desde que se describieron por primera vez, las sinucleínas se han visto implicadas en una gran variedad de procesos biológicos. Sin embargo, aunque se han estudiado principalmente por su relación con enfermedades neurodegenerativas, las funciones fisiológicas de las sinucleínas todavía son objeto de debate.

Debido a la alta concentración de sinucleínas en los terminales sinápticos, una de sus principales funciones en el sistema nervioso se relaciona con el mantenimiento de la homeostasis de la función sináptica (Murphy *et al.*, 2000; Cabin *et al.*, 2002; Chandra *et al.*, 2004). De hecho, diversas evidencias muestran que las sinucleínas participan en los procesos de endocitosis y exocitosis de las vesículas sinápticas, así como en el tráfico intracelular de las mismas, la liberación de neurotransmisores o la homeostasis de la neurotransmisión de monoaminas (Abeliovich *et al.*, 2000; Snyder *et al.*, 2005; Burré *et al.*, 2010; Nemani *et al.*, 2010; Oaks & Sidhu, 2011). De entre las diferentes sinucleínas, existe más información sobre el rol de α -Syn en el control de los procesos sinápticos, en comparación con β - y γ -Syn, por lo que uno de los objetivos principales de esta tesis ha sido entender el papel de γ -Syn sobre el control de la neurotransmisión DA.

I. FUNCIONES SINÁPTICAS: LAS SINUCLEÍNAS COMO CHAPERONAS

En el contexto de las funciones sinápticas, se ha detectado la participación de las sinucleínas como chaperonas moleculares. Dicha propiedad se observa tanto *in vitro* como *in vivo* (Souza *et al.*, 2000; Ahn *et al.*, 2006), y depende de la **región C-terminal**, ya que su delección elimina esta capacidad, aunque se mantienen las conformaciones desplegadas propias de las sinucleínas (Kim *et al.*, 2002; Park *et al.*, 2002a, 2002b, 2002c; Ahn *et al.*, 2006). Con esto, pueden modular la acción de otras proteínas o enzimas, o regular la arquitectura del citoesqueleto para actuar sobre el transporte de vesículas.

Las sinucleínas actúan como chaperonas en la formación de los **complejos SNARE** en el terminal presináptico (Bonini & Giasson, 2005; Chandra *et al.*, 2005). Se ha observado que α -Syn se puede unir simultáneamente a los fosfolípidos de la membrana plasmática desde su extremo N-terminal, y a la sinaptobrevina 2 desde el C-terminal formando complejos multiméricos que median la interacción de las vesículas sinápticas con el complejo SNARE (Burré *et al.*, 2010, 2014). Concretamente, α -Syn inhibe la reacción de *priming*, en la cual las vesículas ancladas pasan a un estado apto para la fusión (**Figura 3**) (Larsen *et al.*, 2006). Por otro lado, se ha comprobado que γ -Syn no puede interactuar con las proteínas del complejo SNARE (VAMP2, SNAP-25, sintaxina) desde su extremo C-terminal, sino que su función sináptica sólo pasa por la unión a las vesículas directamente en sus membranas (Lytkina *et al.*, 2014).

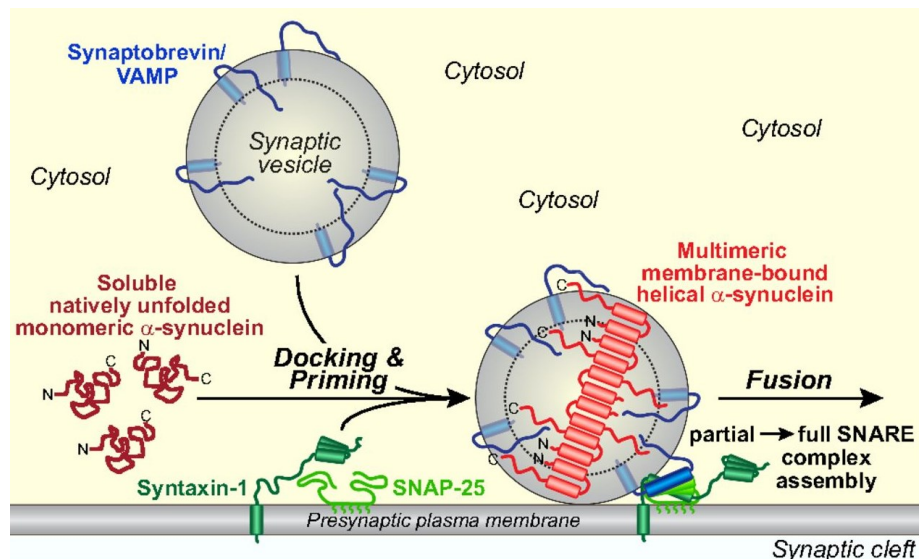


Figura 3. Esquema de la función fisiológica de α -Syn sobre el complejo SNARE. α -Syn en la forma soluble está desplegada y en forma monomérica. Al unirse con las vesículas sinápticas durante el proceso de anclaje y *priming* cambia su conformación y multimeriza formando α -hélices anfipáticas facilitando el ensamblaje del complejo SNARE con las vesículas sinápticas. Obtenido de Burré *et al.*, 2014.

Por otro lado, considerando las propiedades biofísicas de α -Syn y su interacción con las membranas lipídicas, éstas facilitarían el acoplamiento transitorio entre varias moléculas de α -Syn con una misma vesícula o con vesículas distintas. Esta unión entre α -Syn y las vesículas permite mantener la reserva distal de vesículas y regular el número de las mismas en la sinapsis (Auluck *et al.*, 2010).

II. EL PAPEL DE LAS SINUCLEÍNAS EN LA NEUROTRANSMISIÓN MONOAMINÉRGICA

Mediante la función de chaperona, las tres sinucleínas modulan diferentes elementos de la neurotransmisión monoaminérgica. Respecto a los **transportadores de monoaminas (DAT, SERT y NAT)**, las sinucleínas regulan el tráfico de los mismos hacia la superficie celular, la internalización y la función en la recaptación de las monoaminas (Sidhu *et al.*, 2004; Wersinger & Sidhu, 2005; Jeannotte *et al.*, 2009). Tanto α -Syn como γ -Syn forman complejos con los transportadores mediante su región hidrofóbica central, participando así en el movimiento de los transportadores a través del citoesqueleto y sus interacciones con otras proteínas (Wersinger & Sidhu, 2005; Jeannotte & Sidhu, 2007; Jeannotte *et al.*, 2008, 2009; Oaks & Sidhu, 2011). Además, las sinucleínas también regulan otros componentes de la neurotransmisión que afectan las funciones sinápticas. Entre ellas cabe destacar las siguientes:

- Los niveles de expresión de α -Syn afectan la actividad del **transportador vesicular de monoaminas (VMAT2)**, alterando la recarga de las vesículas sinápticas (Yamamoto *et al.*, 2006).
- En el sistema DA, tanto α -Syn como γ -Syn inhiben la actividad de la enzima **tirosina-hidroxilasa (TH)** (Pérez *et al.*, 2002). Además, se ha descrito que la expresión de la enzima TH aumenta en células fotorreceptoras doble *knock-out* para α -/ γ -Syn (Surgucheva *et al.*, 2005).
- α -Syn y β -Syn inhiben la actividad de la enzima **fosfolipasa D2**, con funciones en la reorganización del citoesqueleto y en la dinámica de las membranas y los procesos de endocitosis (Jenco *et al.*, 1998).
- α -Syn aumenta los niveles de expresión de **caveolina-1**, implicada en la dinámica de las membranas, de modo que reduce la actividad de la **vía de señalización ERK**, que tiene un papel central en varias funciones neuronales como la supervivencia, crecimiento, sinaptogénesis, plasticidad y potenciación a largo plazo (Hashimoto *et al.*, 2003).

Aparte de estas funciones sobre la neurotransmisión monoaminérgica, utilizando modelos animales de silenciamiento y sobreexpresión también se ha descrito que las sinucleínas son esenciales para una función monoaminérgica correcta (Chandra *et al.*, 2004; Senior *et*

al., 2008). La **delección de las tres sinucleínas** en ratones conduce a alteraciones de la estructura y función sináptica, así como a disfunción neuronal y menor supervivencia en edades avanzadas (Chandra *et al.*, 2005; Burré *et al.*, 2010; Greten-Harrison *et al.*, 2010). El estudio con estos modelos de delección triple se ha focalizado sólo en el sistema DA, donde la actividad de las neuronas se ve especialmente afectada con hasta un 40% menos de niveles de DA en el caudado putamen (CPu) dorsal (Anwar *et al.*, 2011).

En modelos de ratón **knock-out** y **knock-down** únicamente para α -Syn se observa un neurodesarrollo y arquitectura neuronal normales y no se ha descrito neurotoxicidad DA, pero presentan una liberación aumentada de DA en los terminales nigroestriatales, con la consecuente reducción de la reserva distal de vesículas (**Figura 4**) (Abeliovich *et al.*, 2000; Murphy *et al.*, 2000; Wislet-Gendebien *et al.*, 2006; Auluck *et al.*, 2010; Alarcón-Arís *et al.*, 2018).

Contrariamente, el aumento de la cantidad de α -Syn mediante la **sobreexpresión utilizando vectores víricos** conduce a defectos en el tráfico vesicular que provocan neurotoxicidad, especialmente en las neuronas DA (Cooper *et al.*, 2006). En este caso, las vesículas formadas en el retículo endoplasmático no son capaces de fusionarse con las membranas de Golgi para completar su proceso de liberación (Thayanidhi *et al.*, 2010).

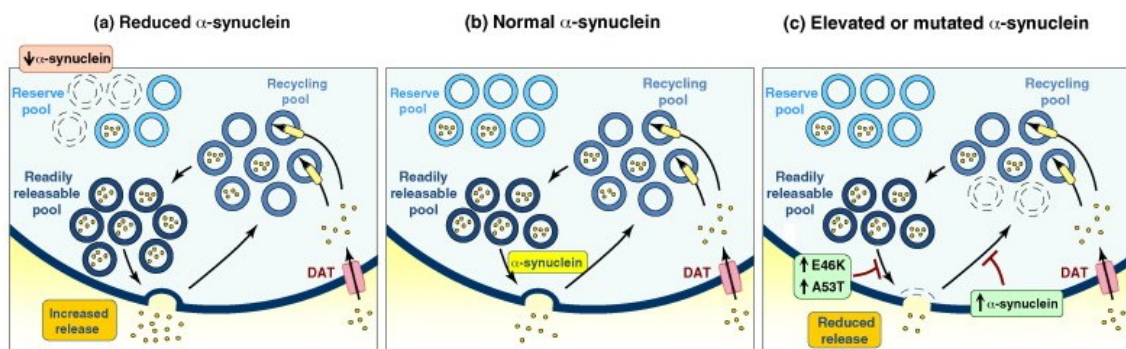


Figura 4. Esquema propuesto para la regulación del tráfico sináptico por parte de α -Syn. En condiciones normales (b), α -Syn modula la disponibilidad de las vesículas en diferentes reservas y en el proceso de anclaje y fusión. Frente a una reducción de sus niveles (a), disminuye la disponibilidad de vesículas de reserva y aumenta la cantidad que de vesículas listas para su liberación, mientras que si aumenta la cantidad de α -Syn o se altera su función (c) se produce una reducción en la liberación de DA, posiblemente por la afectación de la exocitosis o de la endocitosis hacia la reserva de vesículas recicladas. Obtenido de Venda *et al.*, 2010.

En ratones *knock-out* para β -Syn o γ -Syn también se han detectado mayores niveles de DA estriatal, lo cual indicaría cierta redundancia de funciones entre la familia (Greten-Harrison *et al.*, 2010; Anwar *et al.*, 2011). En el caso de γ -Syn, estudios en diferentes líneas celulares indican que modula de una manera similar a α -Syn la expresión y función de los transportadores DAT, NAT y SERT (Oaks & Sidhu, 2011). Además, α -Syn y γ -Syn tienen un papel importante en las **funciones cognitivas**; así, ratones *knock-out* para ambas proteínas muestran una mejora en el aprendizaje espacial y la memoria de trabajo (Kokhan *et al.*, 2012, 2013, 2018). Además, ambas proteínas están relacionadas con problemas de adicción, impulsividad o ansiedad, ya que se ha visto que su expresión puede verse alterada en roedores y humanos frente al consumo de sustancias como la cocaína, o en situaciones generadoras de estrés (Brenz-Verca *et al.*, 2003; Liang *et al.*, 2003; Mash *et al.*, 2003; Pinhasov *et al.*, 2005; Boyer & Dreyer, 2007; Peña-Oliver *et al.*, 2012). Incluso, en modelos animales con fenotipo depresivo se han encontrado aumentos en la expresión de γ -Syn, que se ve reducida tras el tratamiento con desipramina (Jeannotte *et al.*, 2009a, 2009b).

2. LAS SINUCLEINOPATÍAS

La **enfermedad de Parkinson** (PD) es el trastorno neurodegenerativo del movimiento más común, descrito clínicamente por James Parkinson en 1817. A nivel patológico se caracteriza por la pérdida de las neuronas DA en la *substantia nigra compacta* (SNc) y por la presencia de agregados proteicos conocidos como cuerpos de Lewy (LB) en distintas áreas cerebrales, descubiertos en 1912 por Friedrich H. Lewy (Goedert, 2001).

Pese al conocimiento clínico que se tenía sobre la PD, no fue hasta el año 1997 cuando se identificó una mutación en el gen *SNCA*, codificante de la proteína α -Syn, en varios casos familiares de la enfermedad (Polymeropoulos *et al.*, 1997). De esta forma se pudo detectar que esta proteína era el principal componente proteico del material anormal y filamentoso de los cuerpos de Lewy (Spillantini *et al.*, 1997, 1998).

Existen otras enfermedades neurodegenerativas con una manifestación clínica similar a la de la PD, conocidas como desórdenes parkinsonianos y que incluyen la parálisis supranuclear progresiva, la degeneración corticobasal, la demencia pugilística, etc., pero se ha comprobado que presentan patrones de degeneración distintos y patológicamente se caracterizan por la ausencia de los LB (Buée-Scherrer *et al.*, 1997; Josephs *et al.*, 2002). Sin embargo, también se han identificado otras enfermedades neurodegenerativas como la **demencia con cuerpos de Lewy (DLB)**, una patología común en edades avanzadas que puede aparecer individualmente o con la enfermedad de Alzheimer (Hansen *et al.*, 1990), y la **atrofia multisistémica (MSA)**, que comparten junto con la PD las inclusiones filamentosas de α -Syn y por tanto son conocidas como α -sinucleinopatías. Mientras que en la PD y DLB las inclusiones de α -Syn se encuentran principalmente en las neuronas, en la MSA éstas se localizan predominantemente en oligodendrocitos y células de Schwann (Mezey *et al.*, 1998; Spillantini *et al.*, 1998; Tu *et al.*, 1998; Wakabayashi *et al.*, 1998).

A. LAS α -SINUCLEINOPATÍAS EN LA CLÍNICA

I. ENFERMEDAD DE PARKINSON

Epidemiológicamente, la PD es el segundo trastorno neurodegenerativo más común después de la enfermedad de Alzheimer, con alrededor de 7 millones de personas afectadas en el mundo y con una estimación de que en 2040 la PD superará los 12 millones de pacientes (de Lau & Breteler, 2006). La edad media de manifestación se sitúa sobre los 60 años, aunque un 5-10% de los casos aparece de forma más temprana, y la prevalencia aumenta con la edad, desde un 1% después de los 60 años hasta el 4% a los 80 años (Samii *et al.*, 2004). Generalmente, la PD afecta más a hombres que a mujeres, en una relación 3:2 (Kalia & Lang, 2015). La esperanza de vida media después del diagnóstico está entre 7 y 15 años, con más de 100.000 muertes al año (Golbe & Leyton, 2018). Actualmente, el coste de la PD en Europa se acerca a los 11 billones de euros anuales, entre 2.000 y 12.000 € por paciente y año, incluyendo tanto los costes directos de hospitalización o medicación, como

los indirectos, especialmente altos por la reducción de productividad, la carga de trabajo de los cuidadores y la pérdida de calidad de vida (Findley, 2007; Maresova *et al.*, 2017).

Una de las principales características patológicas de la PD es la **degeneración de las neuronas DA mesencefálicas de la SNc**, un núcleo regulador clave en el circuito de los ganglios basales. Autopsias de cerebros *post-mortem* de pacientes con PD revelan pérdidas de hasta un 85% de las neuronas DA en esta área cerebral, mientras que las células restantes sufren distrofia y/o contienen LB (Iacono *et al.*, 2015). También se han detectado otras poblaciones de neuronas no DA proclives a degenerar y con presencia de LB, como las serotoninérgicas, noradrenérgicas, glutamatérgicas, colinérgicas o GABAérgicas, en áreas como el *locus coeruleus*, los núcleos autonómicos y la corteza. Además, también se han descrito incrementos de los astrocitos reactivos y de la microglía en la SNc (Booth *et al.*, 2017; Liddelow *et al.*, 2017; Joe *et al.*, 2018). En el punto 2C se describirán más profundamente algunas de las principales afectaciones en el sistema monoaminérgico.

Otra de las características histopatológicas de la PD es la presencia de los **cuerpos y neuritas de Lewy**, agregados proteicos ubiquitinados localizados en el citoplasma y la región yuxtannuclear de las neuronas. Aparecen como inclusiones esféricas con un núcleo eosinófilo denso compuesto de material filamentoso y granular, y un halo más claro con filamentos orientados radialmente de 10-20 nm de diámetro (**Figura 5**) (Forno, 1996). En fases tempranas de la PD, los LB se depositan en el tronco encefálico y el mesencéfalo, y con el tiempo se extienden por otras áreas cerebrales siguiendo el patrón descrito en los estadios de Braak (Braak *et al.*, 2003), que se describirán más adelante.

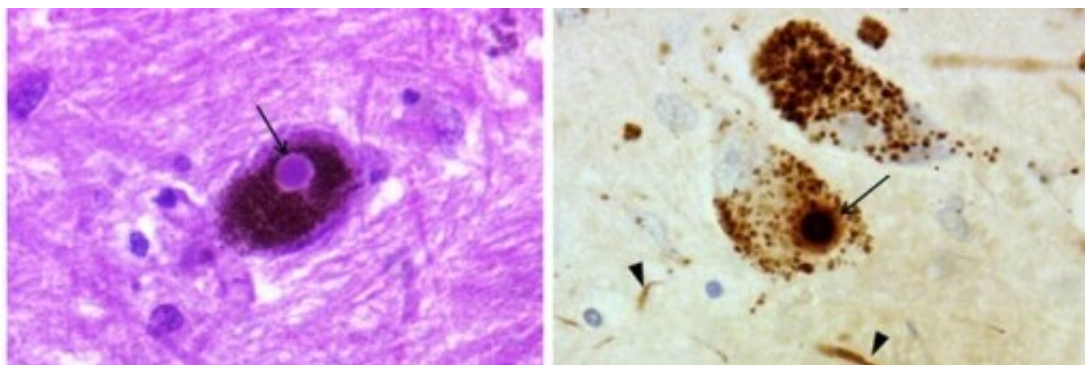


Figura 5. Detección histoquímica de los cuerpos de Lewy en neuronas de la SNc, mediante la tinción hematoxilina-eosina (izquierda) e inmunohistoquímica contra α -Syn (derecha). Obtenido de Taipa *et al.*, 2012.

La PD evoluciona a lo largo de varias fases que se pueden distinguir según los síntomas: una fase prodrómica sin síntomas motores, seguida de la fase temprana de la enfermedad tras su diagnóstico, y finalmente la fase tardía con complicaciones mayores (**Figura 6**). La evaluación clínica de la PD se realiza a partir de la presencia de los **síntomas motores**. Uno de los detectados en la mayoría de casos es una **bradicinesia** progresiva, un enlentecimiento del movimiento voluntario que evoluciona en dificultades para realizar las tareas cotidianas y puede terminar en parálisis total (Jankovic, 2008; Lees *et al.*, 2009; Jenner *et al.*, 2013; Postuma *et al.*, 2015). Otros síntomas motores detectados incluyen:

- **Temblores en reposo:** generalmente involuntario y unilateral, suele aparecer en una mano y progresivamente se va extendiendo por las extremidades hasta afectar al cuerpo entero.
- **Rigidez:** dificultad en iniciar movimientos amplios por un aumento del tono muscular que conduce a la desvinculación de los movimientos suaves, y que afecta progresivamente al cuerpo entero reduciendo la capacidad motora.
- **Inestabilidad postural:** la bradicinesia y el temblor conducen a dificultades en la estabilidad, el paso y el equilibrio en fases tardías de la enfermedad, por lo que los pacientes tienden a adoptar posturas encorvadas y pueden sufrir caídas frecuentemente.

Otras características importantes para su definición clínica incluyen la respuesta a la levodopa o la asimetría en la aparición de síntomas, y entre un 75-95% de los casos se confirma en la autopsia por la detección de la neurodegeneración y los LB (Jankovic, 2008). Se estima que en el momento del diagnóstico los pacientes ya presentan cuerpos y neuritas de Lewy, así como una pérdida de hasta el 30% de las neuronas DA de la SNc y del 50-60% de sus proyecciones nigroestriatales (Beach *et al.*, 2008; Dickson *et al.*, 2008; Cheng *et al.*, 2010). Por ello, cada vez existe un mayor consenso por la investigación durante la **fase prodrómica** no motora de la enfermedad, tanto para la identificación de marcadores de diagnóstico temprano y progresión de la enfermedad como para el descubrimiento de nuevas dianas de acción terapéutica modificadora de la enfermedad (Berg *et al.*, 2015; Ghiglieri *et al.*, 2018; Sardi *et al.*, 2018).

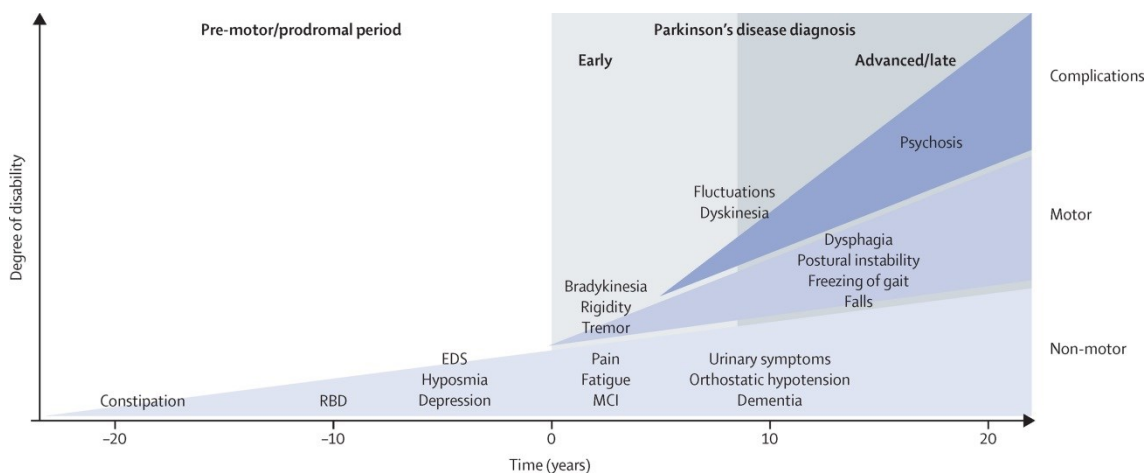


Figura 6. Representación del curso temporal de la presencia de los síntomas no motores y motores en la PD. El diagnóstico suele darse con la aparición de los problemas motores, pero puede estar precedido por una fase prodrómica de 20 o más años, con síntomas no motores. Además, después del diagnóstico continúa el desarrollo de los problemas no motores que agravan la discapacidad clínica. En estados avanzados aparecen síntomas motores mayores como la inestabilidad postural, así como las complicaciones por la terapia dopaminérgica como las fluctuaciones, disquinesia o psicosis. Obtenido de Kalia & Lang, 2015.

Los principales síntomas no motores de la PD se resumen a continuación:

- **Disfunciones ejecutivas:** problemas en la planificación, la flexibilidad cognitiva, el pensamiento abstracto, la inhibición de acciones, la memoria de trabajo, el control de la atención o dificultades visuo-espaciales, entre otros (Parker et al., 2013).
- **Desórdenes emocionales:** los más frecuentes son depresión, apatía y ansiedad, que contribuyen a empeorar la calidad de vida y la gravedad de los síntomas motores. Se ha reportado que entre un 30-40% de los pacientes con PD presentan ansiedad y depresión, y estos llegan a manifestarse varios años antes del diagnóstico de la enfermedad (Jankovic, 2008; Politis *et al.*, 2012; Chuquilín-Arista *et al.*, 2019; Wilson *et al.*, 2019).
- **Alucinaciones:** aproximadamente el 50% de los pacientes pueden manifestar alucinaciones en distinto grado, normalmente de tipo visual, que pueden evolucionar en psicosis o demencia, y suelen asociarse con el tratamiento con levodopa (Diederich *et al.*, 2009; Friedman, 2010).

- **Demencia:** los pacientes de PD presentan entre 2 y 6 veces más riesgo de desarrollar demencia. La prevalencia aumenta con la edad y la duración de la enfermedad, estimándose que un 78% de los pacientes acaban desarrollándola (Aarsland *et al.*, 2005; Vieira *et al.*, 2013; Garcia-Ptacek & Kramberger, 2016; Gomperts, 2016).

Además de los síntomas neuropsiquiátricos, se han descrito otras alteraciones que pueden aparecer años antes del diagnóstico de la PD, como desórdenes del sueño (somnolencia, insomnio o alteraciones de la fase REM) o disfunciones autonómicas como hipotensión ortostática, sudoración, incontinencia, disfunción sexual, pérdida del olfato, problemas gastrointestinales, cambios sensoriales o parestesia (Jankovic, 2008).

II. DEMENCIA CON CUERPOS DE LEWY

La DLB es un tipo de demencia neurodegenerativa con alteraciones conductuales, cognitivas y de movimiento, que se caracteriza por la **presencia difusa de cuerpos y neuritas de Lewy en el sistema nervioso**. Entre las áreas más afectadas destaca la corteza cerebral (temporal, frontal, parietal, insular, entorrinal y cingulada), especialmente sus neuronas piramidales de las capas V y VI, pero también se detectan LB en otras regiones como el hipocampo, el mesencéfalo –incluyendo la SNc–, el tronco encefálico, el hipotálamo e incluso la médula espinal y el sistema nervioso periférico (Halliday *et al.*, 2008; Greffard *et al.*, 2010; Boot, 2015; Walker *et al.*, 2015; McKeith *et al.*, 2017).

Al igual que en la PD, los LB provocan la degeneración de las neuronas de estas áreas cerebrales, pero su extensión lleva a la afección de múltiples funciones cognitivas que hacen que la DLB sea una enfermedad mucho más compleja y de progresión más rápida, en comparación con otras demencias como la enfermedad de Alzheimer o la demencia vascular. La condición de demencia o la pérdida de memoria no siempre aparecen en etapas tempranas de la DLB, sino que su desarrollo es más probable conforme progresa la enfermedad, ya que las estructuras frontales se ven afectadas antes que las temporoparietales (Karantzoulis & Galvin, 2011; St Louis & Boeve, 2017). Por esto, para distinguirla de otros tipos de demencia, se han designado criterios diferenciales para su diagnóstico:

- **Alteración en las funciones de atención, ejecutiva y visuo-espacial**, manifestada en estados de distracción o de alteración de la conciencia, junto a dificultades en organizar pensamientos y tareas.
- **Desorden de la conducta en la fase REM**, presente en hasta un 80% de pacientes, por el que se pierde la atonía muscular y se tienen movimientos o vocalizaciones anormales y violentas. Más del 90% de los pacientes con trastornos de la fase REM son diagnosticados *post-mortem* con sinucleinopatías, tanto DLB como PD.
- **Parkinsonismo**, en más del 85% de pacientes y con los síntomas típicos de la PD. Sin embargo, su manifestación es más variable y suele ser simétrica y menos grave (Tousi *et al.*, 2017).
- **Alucinaciones visuales** recurrentes y frecuentes, típicamente en fases tempranas de la enfermedad. Normalmente se relacionan con problemas visuales, y los pacientes que las sufren suelen presentar deterioro cognitivo más grave (Pezzoli *et al.*, 2017).

Además de los síntomas principales también se suelen tener en cuenta características secundarias como una marcada sensibilidad a los antipsicóticos, disfunción autonómica, alucinaciones relacionadas con otros sentidos, y trastornos neuropsiquiátricos como apatía, ansiedad o depresión (McKeith *et al.*, 2017).

Entre las demencias, la DLB es el segundo tipo más común, que constituye hasta el 20% de los casos, aunque se estima que puede haber más casos de los diagnosticados ya que en sus fases tempranas suele confundirse con la enfermedad de Alzheimer (Vann Jones & O'Brien, 2014; Walker *et al.*, 2015; Kosaka *et al.*, 2017). De hecho, en estudios histopatológicos *post-mortem* se observa que alrededor del 50% de pacientes con enfermedad de Alzheimer presentan también LB, y viceversa, pacientes con DLB muestran la presencia de placas amiloides (Veyaludhan *et al.*, 2017). Además, la coincidencia de síntomas con otras sinucleinopatías (PD, MSA) y demencias (fronto-temporal, vascular) aumenta la necesidad de más biomarcadores diagnósticos a partir de neuroimagen y electroencefalografía, para aumentar la precisión del diagnóstico y evitar el riesgo que suponen los fármacos antipsicóticos en los pacientes de DLB (Boot, 2015; Gomperts, 2016; Weil *et al.*, 2017).

La DLB se puede manifestar entre los 50 y los 80 años, y alrededor del 0.4% de la población mayor de 65 años se encuentra afectada, sin diferencias de género significativas (Levin *et al.*, 2016). Tras el diagnóstico, la esperanza de vida media se sitúa en los 8 años, y en estados avanzados los pacientes no suelen poder cuidar de sí mismos.

III. ATROFIA MULTISISTÉMICA

La MSA es un trastorno neurodegenerativo que agrupa distintos casos clínicos clasificados como atrofia olivopontocerebelar, síndrome de Shy-Drageer y degeneración estriatonigral. Al igual que las sinucleinopatías ya descritas, se caracteriza por la disfunción y degeneración de los ganglios basales, que conducen a parkinsonismo, ataxia cerebelar, disfunción autonómica o demencia.

Sin embargo, a diferencia de las anteriores, la característica definitoria de la MSA es la presencia de **inclusiones filamentosas de α -Syn en células gliales**, especialmente en el citoplasma de oligodendrocitos (Papp *et al.*, 1989; Arima *et al.*, 1998). Junto a esto, se detectan astrogliosis y neurodegeneración especialmente agresivas en áreas cerebrales implicadas en el movimiento y el control de funciones autonómicas, como el cuerpo estriado, la SNc, el puente troncoencefálico, el núcleo olivar inferior o el cerebelo (**Figura 7**) (Wenning *et al.*, 2004).

En sus primeras manifestaciones, la MSA se caracteriza por un síndrome de aquinesia similar a la PD, y en algunos casos por problemas en el equilibrio (Gilman *et al.*, 2008). Debido a esto, muchas veces se confunde en el diagnóstico con la PD y no se puede determinar con precisión hasta el análisis histológico, con la detección de las inclusiones citoplasmáticas gliales. Actualmente se suelen distinguir dos variantes de la MSA, según los síntomas predominantes (Fanciulli & Wenning, 2015):

- **MSA con parkinsonismo predominante** (anteriormente denominada degeneración estriatonigral), donde destacan las características extrapiramidales, normalmente con un peor pronóstico.

- **MSA con características cerebelares** (anteriormente denominada atrofia olivopontocerebelar esporádica), donde predomina la ataxia cerebelar progresiva con disartria y afeción en el paso y los brazos.

Se estima que la MSA afecta a 5 de cada 100.000 personas, aunque la incidencia podría ser mayor ya que muchos pacientes diagnosticados con PD presentan MSA en la autopsia. Los primeros síntomas de la enfermedad aparecen entre los 50 y los 60 años, y no se aprecian diferencias de género en la afeción.

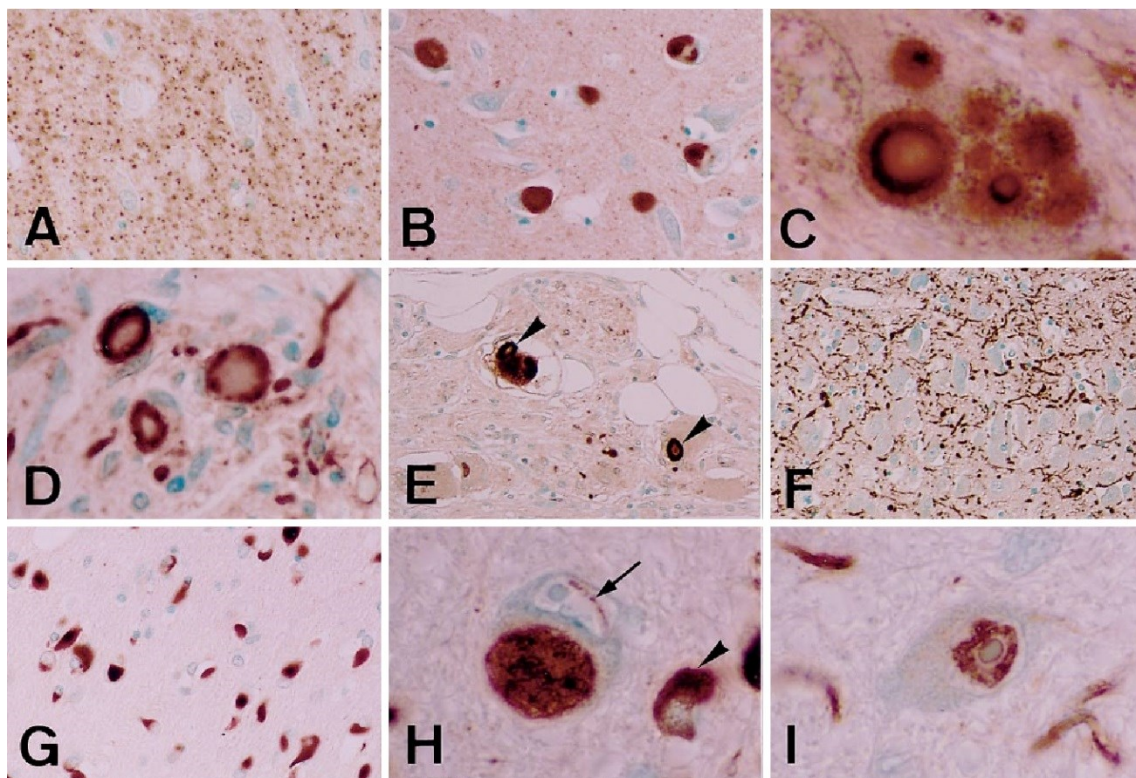


Figura 7. Inmunorreactividad contra α -Syn en las principales sinucleinopatías.

A, cerebro sano. B-F, imágenes de agregados proteicos positivos para α -Syn en PD y DLB: giro hipocampal (B), *substantia nigra compacta* (C), ganglios simpáticos (D), plexo mientérico (E), región hipocampal CA2/3 (F). H-I, imágenes de agregados proteicos de α -Syn en MSA: inclusión glial en la sustancia blanca frontal (G), inclusiones neuronales en el núcleo pontino (H, I). Obtenido de Wakabayashi *et al.*, 1998.

B. ETIOLOGÍA AMBIENTAL Y GENÉTICA DE LAS SINUCLEINOPATÍAS

Actualmente, la/s causa/s de la PD y otras sinucleinopatías continúan siendo desconocidas. Diferentes factores como la exposición a toxinas, infecciones, efectos secundarios de fármacos, trastornos metabólicos o lesiones cerebrales pueden precipitar la aparición de las sinucleinopatías, pero en la mayoría de casos se trata de enfermedades idiopáticas y esporádicas. A continuación se expondrán fundamentalmente aquellos factores que predisponen al desarrollo de la PD, ya que se dispone de más información en comparación con otras α -sinucleinopatías.

Se han identificado distintos factores ambientales y genéticos que contribuyen a los mecanismos patológicos, con una compleja interacción entre ellos (Kalia & Lang, 2015). Sin embargo, ninguno de ellos por sí solo ha demostrado una causalidad concluyente, y su papel se reduce a un aumento o disminución del riesgo a desarrollar una sinucleinopatía (de Lau & Breteler, 2006; Elbaz & Moisan, 2008). De este modo, el análisis de estos factores y sus complejos mecanismos de acción ha contribuido a clasificar a las sinucleinopatías, y particularmente a la PD, como patologías complejas y multifacéticas, con una vulnerabilidad preferencial de las neuronas DA y la implicación de los LB (Obeso *et al.*, 2010).

A nivel genético, un 5-10% de los pacientes de PD portan mutaciones en genes específicos, y alrededor del 15-20% presentan una historia familiar previa (Samii *et al.*, 2004; Lesage & Brice, 2009). Sin embargo, el hecho de portar mutaciones en genes específicos identificadas de riesgo para desarrollar la PD no implica necesariamente la aparición de la enfermedad. La combinación con otros factores de riesgo puede desencadenar la PD, en cuyo caso el pronóstico es más precoz y grave en comparación con variantes no genéticas. El estudio de estas mutaciones y de la función celular de las proteínas afectadas ha permitido avanzar en la comprensión de los mecanismos responsables de la disfunción neuronal y la neurodegeneración en la PD. Entre ellos, destacan los mecanismos responsables de la formación y acumulación de formas reactivas tóxicas de las sinucleínas, los sistemas de reciclaje de las células, la función mitocondrial o el metabolismo de lípidos, entre otros (Obeso *et al.*, 2010).

I. MUTACIONES EN EL GEN SNCA: IMPLICACIÓN EN LAS α -SINUCLEINOPATÍAS

El caso más evidente del mal plegamiento y agregación de proteínas en las sinucleinopatías es el de la misma α -Syn. La identificación de la mutación A53T en el gen SNCA de varias familias ítalo-americanas y griegas permitió situar a esta proteína como esencial en la patología (Polymeropoulos *et al.*, 1997; Spillantini *et al.*, 1997, 1998a). Desde entonces se han identificado mutaciones en el gen SNCA que se han asociado con más casos familiares de PD y DLB, de herencia dominante y relacionadas con una aparición más temprana de la enfermedad (Chartier-Harlin *et al.*, 2004). En general, estas mutaciones provocan alteraciones de la secuencia y estructura de la proteína α -Syn que conducen a la oligomerización de la misma y a la formación de agregados fibrilares, perdiendo de este modo su función biológica

Hasta el momento se han descrito 6 **mutaciones puntuales** en el gen SNCA relacionadas con casos familiares de PD, y todas en el dominio N-terminal: A30P, E46K, H50Q, G51D, A53T y A53E (Kruger *et al.*, 1998; Zarranz *et al.*, 2004; Appel *et al.*, 2013; Proukakis *et al.*, 2013; Kiely *et al.*, 2013; Lesage *et al.*, 2013; Pasanen *et al.*, 2014). Estas modificaciones conducen a cambios importantes en el plegamiento y las funciones de α -Syn, bien desestabilizando su estructura y volviéndolas más propensas a oligomerizar, o bien alterando sus interacciones con otros elementos de la célula (Conway *et al.*, 1998; Giasson *et al.*, 1999; Biere *et al.*, 2000; Rospigliosi *et al.*, 2009; Yonetani *et al.*, 2009). Ambos casos también llevan a la pérdida de algunas funciones beneficiosas de la α -Syn como la protección contra la disfunción mitocondrial o la apoptosis (Alves da Costa *et al.*, 2000; *et al.*, 2002; Jensen *et al.*, 2003).

Entre las mutaciones destacan A53T y A30P, que afectan la estructura de α -Syn alterando su interacción anfipática con lípidos. Esto sugiere una relación antagónica entre la unión de α -Syn a lípidos y su agregación en especies citotóxicas (Cremades *et al.*, 2012; Burré *et al.*, 2015; Iljina *et al.*, 2016):

- **A53T:** se relaciona con un desarrollo temprano de la PD, mostrando un fenotipo más grave, y neurodegeneración y gliosis en zonas corticales y en el hipocampo (Spira *et al.*, 2001). La mutación A53T conduce a un ratio de agregación de α -Syn mucho mayor que la forma *wild-type*, con diferentes dinámicas de oligomerización (Conway *et al.*, 2000a, 2000b; Serpell *et al.*, 2000; Choi *et al.*, 2004; Greenbaum *et al.*, 2005; Harada *et al.*, 2009; Rospigliosi *et al.*, 2009; Ghosh *et al.*, 2013). Además, los agregados de α -Syn con la mutación A53T no pueden translocarse a los lisosomas ya que su unión al receptor lisosomal LAMP2 bloquea la internalización, inhibiendo a su vez la degradación de otras proteínas alteradas (Cuervo *et al.*, 2004). En modelos animales, la introducción de α -Syn con esta mutación conduce a una patología similar a las sinucleinopatías humanas, con pérdida de neuronas DA, además de la denervación de las uniones neuromusculares y la degeneración de axones motores (van der Putten *et al.*, 2000).
- **A30P:** los pacientes con la mutación A30P presentan un fenotipo similar a la PD esporádica, con demencia moderada. Esta forma mutada de α -Syn tiene ratios de agregación similares a la forma *wild-type*, pero pierde la capacidad de interactuar con fosfolípidos (Narhi *et al.*, 1999; Serpell *et al.*, 2000; Chandra *et al.*, 2003; Fares *et al.*, 2014; Ghosh *et al.*, 2014; Rutherford *et al.*, 2014; Ysselstein *et al.*, 2015). Por tanto, tiene menor capacidad de unirse a vesículas sinápticas y a otras proteínas del complejo SNARE, lo que dificulta la regulación del transporte axonal conduciendo a un déficit en la neurotransmisión (Jensen *et al.*, 1998; Saha *et al.*, 2004; Sousa *et al.*, 2009). La introducción de la forma de α -Syn con la mutación A30P en modelos murinos conduce a algunas características típicas de la DLB, como resistencia a la proteínasa K o patología neurítica (Neumann *et al.*, 2002).

Durante el desarrollo de esta tesis se ha utilizado un modelo de ratón transgénico con la doble mutación A53T-A30P, para abordar el rol de la misma en el control de la neurotransmisión DA.

Respecto a la mutación E46K, se ha visto que afecta a la repetición de la secuencia consenso KTKEGV en la estructura primaria de α -Syn, de modo que se altera su plegamiento y presenta propiedades tóxicas similares a las de la mutación A53T. Particularmente, la mutación E46K también se ha encontrado relacionada con casos

familiares de DLB. Por otro lado, individuos con las mutaciones G51D o A53E presentan características neuropatológicas de la PD y MSA, lo cual apoya la visión de que las etiologías de las sinucleinopatías se encuentran relacionadas (Kiely *et al.*, 2013; Whittaker *et al.*, 2017).

Además de estas mutaciones, también se han relacionado **duplicaciones y triplicaciones** del gen *SNCA* con casos familiares de PD (Singleton *et al.*, 2003), así como variaciones alélicas en la región promotora y la región terminal del gen (Ross *et al.*, 2007; Pankratz *et al.*, 2009). La cantidad de sinucleínas que se expresan en la célula tiene un efecto marcado en sus mecanismos; en modelos de levaduras, la duplicación de la expresión de α -Syn es suficiente para causar su cambio de localización y la formación de inclusiones citotóxicas (Outeiro & Lindquist, 2003). En humanos con duplicaciones de *SNCA*, los individuos asintomáticos presentan problemas de aprendizaje y pueden desarrollar la PD de forma precoz y con demencia (Chartier-Harlin *et al.*, 2004; Ibáñez *et al.*, 2004; Nishioka *et al.*, 2006; Keri *et al.*, 2010). Con la triplicación hay un desarrollo incluso más precoz y agresivo de la PD, en el que se detecta un aumento de la α -Syn en sangre, y los pacientes suelen presentar una patología extranigral más típica de la DLB (Singleton *et al.*, 2003; Bradbury, 2003; Farrer *et al.*, 2004; Miller *et al.*, 2004). Esta correlación entre la dosis génica y la patología sugiere que la manipulación de la expresión de α -Syn puede constituir una estrategia terapéutica o preventiva.

Por último, además de mutaciones concretas cuya correlación con las sinucleinopatías resulta más clara, se han identificado otros **factores de riesgo genético** que aumentan la predisposición a desarrollar la patología de forma idiopática (Lee *et al.*, 2009). Algunos estudios de asociación genómica han relacionado varios polimorfismos en el gen *SNCA* con un mayor riesgo de desarrollar la sinucleinopatía (**Tabla 1**) (Davie, 2008; Simon-Sanchez *et al.*, 2008; Latourelle *et al.*, 2009; Satake *et al.*, 2009; Wider *et al.*, 2010).

II. FACTORES GENÉTICOS INDIRECTOS

SÍNTESIS Y RECICLADO DE PROTEÍNAS

Otros genes involucrados en la PD codifican para proteínas relacionadas con los procesos de reciclado y mantenimiento de la homeostasis proteica, encargados de degradar proteínas celulares dañadas o mal plegadas que se encuentran en el citoplasma celular, en el núcleo o en el retículo endoplasmático; por ejemplo, la disfunción del mecanismo ubiquitina-proteosomal puede conducir a la acumulación de α -Syn y a la patología de LB (**Figura 8**). Estudios preclínicos mostraron que la administración de inhibidores del complejo proteosomal en ratas provocan anormalidades conductuales, pérdida del contenido de DA estriatal y neurodegeneración DA, con inclusiones similares a los LB con α -Syn (McNaught *et al.*, 2004). Además, se ha reportado la existencia de formas aberrantes de proteínas ubiquitinadas colocalizando con subunidades proteosómicas en los LB en cerebros *post-mortem* de pacientes con PD (McNaught *et al.*, 2001; Pan *et al.*, 2008).

En este contexto, se han identificado mutaciones en el gen *PARK2* que codifica para la ubiquitina-ligasa **parkina**, que conducen a la agregación de formas tóxicas de diferentes proteínas, incluyendo la α -Syn (Kitada *et al.*, 1998; Mori *et al.*, 1998; Shimura *et al.*, 1999, 2000; Farrer *et al.*, 2001; Pramstaller *et al.*, 2005). Ratones *knock-out* para dicha proteína muestran una reducción de la neurotransmisión DA en el sistema nigroestriatal y déficits de la actividad motora (Goldberg *et al.*, 2003; Itier *et al.*, 2003).

Otra proteína asociada a casos familiares de herencia dominante es **UCH-L1** (*ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1*), implicada en la des-ubiquitinación de proteínas en el sistema nervioso y que se ha identificado también colocalizando en los LB (Lowe *et al.*, 1990; Leroy *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 2002). Se ha descrito que la mutación I93M reduce la función de UCH-L1 conduciendo a la acumulación de proteínas ubiquitinadas en la célula. Utilizando modelos de ratones se ha observado que la expresión de la forma mutada conduce a la pérdida de función y a la muerte de las neuronas DA (Setsuie *et al.*, 2007). Incluso, la mutación del sitio catalítico de UCH-L1 ha permitido generar un modelo murino con distrofia axonal, ataxia sensorial y déficits motores, con inclusiones de β -amiloide y sinucleínas (Yamazaki *et al.*, 1988; Saigoh *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2004).

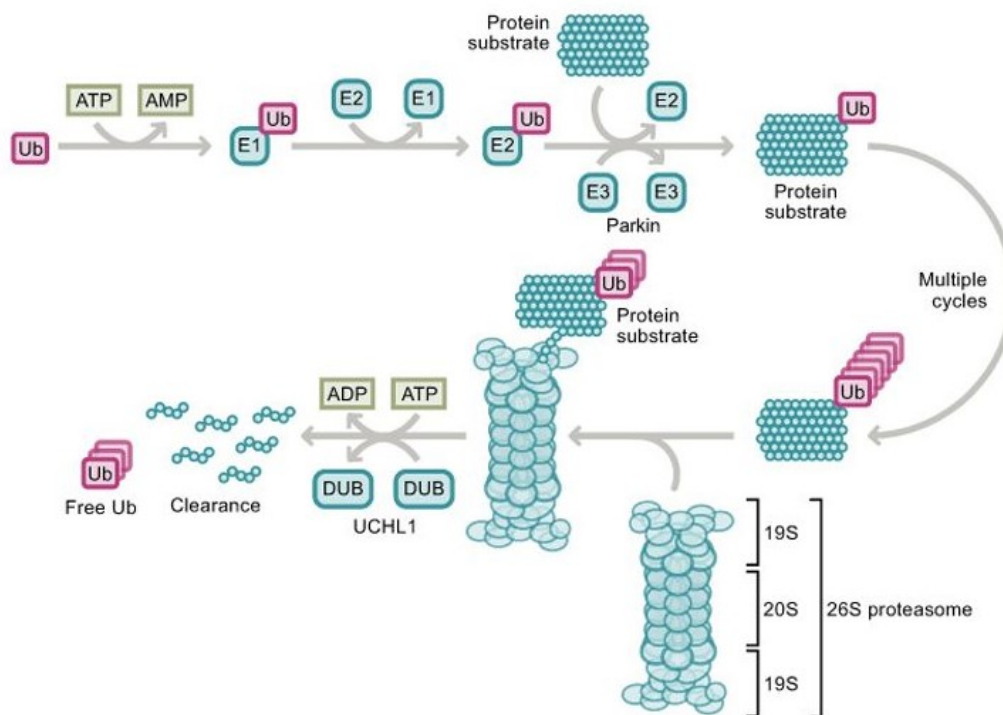


Figura 8. El sistema ubiquitina-proteasomal en la PD. En condiciones normales, las proteínas destinadas a ser degradadas se marcan con ubiquitinas, a través de ligasas como la parkina, y se des-ubiquitinan con des-ubiquitinasas como la UCHL1. Mediante condiciones de estrés, alteraciones en la producción de energía o mutaciones en estas proteínas se puede perturbar el sistema, lo cual conduce a la acumulación de agregados de proteínas anormales y tóxicas para la supervivencia neuronal. Obtenido de Lim & Tan, 2007.

Uno de los mecanismos que desempeña un papel clave en el control del plegamiento adecuado de las proteínas es la respuesta que se activa frente a las proteínas mal plegadas en el retículo endoplasmático y el tráfico reticular, a través de la **vía de señalización UPR** (*unfolded protein response*) (Soto *et al.*, 2003). Esta respuesta constituye un sistema de control adaptativo de la célula para evitar la acumulación de proteínas anómalas, de modo que se mantenga la homeostasis celular o se activen los mecanismos de apoptosis (Cooper *et al.*, 2006; Ron *et al.*, 2007). Así, en la patogénesis de la PD se ha descrito la activación de la vía UPR, tanto en muestras *post-mortem* de pacientes como en modelos animales citotóxicos de PD. En estos casos, se observan niveles incrementados de proteínas que forman parte de esta vía de señalización como BIP, IRE1, ATF6 o PERK, algunas de ellas incluso colocalizando con agregados de α -Syn (Hoozemans *et al.*, 2007; Selvaraj *et al.*, 2012; Mercado *et al.*, 2016; Colla, 2019).

Además del mecanismo ubiquitina-proteasomal, también se han relacionado alteraciones de la autofagia con la PD. La autofagia es un proceso catabólico que dirige orgánulos disfuncionales o proteínas mal plegadas hacia el lisosoma para su degradación, que incluye micro-autofagia, macro-autofagia y autofagia mediada por chaperonas. Varias evidencias indican que una disfunción en la vía de la autofagia lisosomal desempeña un papel importante en la patogénesis de la PD. En concreto, deficiencias de la hidrolasa lisosómica **glucocerebrosidasa** (GBA), codificada por el gen *GBA1*, conduce al trastorno del almacenamiento lisosómico más común conocido como la enfermedad de Gaucher. Se ha descrito que mutaciones en la GBA aumentan la susceptibilidad a la patogénesis de la PD y que alrededor de un 7-10% de pacientes con PD y un 7-15% de pacientes con DLB presentan mutaciones en el gen *GBA* (Stoker *et al.*, 2018; Blandini *et al.*, 2019). En individuos heterocigotos para la mutación, que no desarrollan enfermedad de Gaucher, hay entre 20 y 30 veces más riesgo de desarrollo de PD, con sus características típicas y acumulación de LB, aunque con una aparición más temprana y un declive motor y cognitivo más agudo (Neumann *et al.*, 2009; Pulkes *et al.*, 2014).

FUNCIÓN MITOCONDRIAL

Las mitocondrias son orgánulos muy dinámicos y su homeostasis está preservada por diferentes procesos, entre los que destacan la biogénesis mitocondrial, fusión, fisión y mitofagia (Park *et al.*, 2018). Se han identificado varias mutaciones en genes codificantes para proteínas involucradas en la función mitocondrial asociadas con la patología de la PD. Entre ellas destacan las proteínas **PINK1** (*PTEN-induced kinase 1*), que contribuye en los procesos de fisión y fusión mitocondrial, y **DJ1**, que además de regular la dinámica del Ca²⁺, también modula el complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial (Gómez-Suaga *et al.*, 2018; Strobbe *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2019).

Además, otra de las mutaciones se encuentra en el gen *LRRK2* (*leucine-rich repeat kinase 2*) que codifica la proteína kinasa **LRRK2**, capaz de unirse a la membrana externa de las mitocondrias y participar en los procesos de fusión y fisión (Chen & Wu, 2018). Hasta un 5% de los pacientes con historia familiar presentan mutaciones en este gen, aunque también se encuentran en un 3% de casos esporádicos (Paisan-Ruiz *et al.*, 2004; Zimprich *et*

al., 2004; Kachergus *et al.*, 2005). El papel fisiológico y en la neurodegeneración de esta kinasa es poco conocido, pero se le atribuye una función de proteína-kinasa dependiente de GTP por sus dominios de interacción ricos en leucina, un dominio GTPasa y una región MAPK (Anand & Braithwaite, 2009). Las mutaciones más comúnmente encontradas en el gen *LRRK2* son G2019S y R1441C que afectarían la actividad kinasa de la proteína conduciendo a la acumulación de α -Syn (Greggio *et al.*, 2006; Smith *et al.*, 2006). La mutación hace al portador proclive a desarrollar la enfermedad pero no es suficiente para causarla, lo cual explica la variabilidad en la expresividad y penetrancia de la mutación en una familia. Esta característica explicaría por qué en los estudios neuropatológicos de pacientes con esta mutación no todos presentan patología de LB (Di Fonzo *et al.*, 2005).

Por su parte, en estudios preclínicos con ratones con sobreexpresión de *LRRK2* se ha descrito un aumento en la liberación de DA estriatal, con el consecuente comportamiento hiperactivo, mientras que ratones *knock-out* no presentan cambios en la neurotransmisión pero sí se detecta una acumulación de α -Syn en los riñones de los animales (Andrés-Mateos *et al.*, 2009; Tong *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2010). En concreto, cuando se introduce la forma de *LRRK2* con la mutación G2019S también se ha observado una mayor vulnerabilidad de los ratones frente a la neuropatología producida por la sobreexpresión de α -Syn o por tóxicos como MPTP, de modo que los ratones presentan mayores déficits motores, pérdida de neuronas DA y astrogliosis (Volta & Melrose, 2017; Benson *et al.*, 2018; Novello *et al.*, 2018; Arbez *et al.*, 2020). Considerando la importancia de *LRRK2*, en esta tesis se ha decidido incluir un modelo ratón con la forma humana del gen *LRRK2* con la mutación G2019S, para el estudio de sus efectos en la función DA.

Tabla 1. Principales genes y proteínas identificadas como factores de riesgo genético de la PD, con su localización en el genoma humano.

LOCUS	LOCALIZACIÓN	PROTEÍNA IMPLICADA	HERENCIA
PARK1/4	4q21	α -sinucleína	Dominante
PARK2	6q25.2-q27	Parkina	Recesiva
PARK5	4p14	UCH-L1	Dominante
PARK6	1p36	PINK1	Recesiva
PARK7	1p36.23	DJ1	Recesiva
PARK8	12q12	LRRK2	Dominante
GBA	1q21	GBA	Susceptibilidad

Por último, en el caso de pacientes con DLB no se han encontrado causas genéticas y la enfermedad no parece tener un componente hereditario. Sin embargo, hay cierto solapamiento en el factor genético de la DLB con otras sinucleinopatías y con la enfermedad de Alzheimer. Así, el riesgo de desarrollar DLB es más elevado con el alelo E4 del gen *APOE* (apolipoproteína E), y se ha asociado con mutaciones en los genes *PARK11* y *GBA* (Velayudhan *et al.*, 2017; Weil *et al.*, 2017). En cuanto a la MSA, los polimorfismos en genes como *LRRK2*, *SNCA*, *GAK* (*cyclin G-associated kinase*) o *MAPT* (*microtubule-associated protein tau*) se han identificado como factores de riesgo (Scholz *et al.*, 2009; Vilarino-Güell *et al.*, 2011).

FACTORES AMBIENTALES

Estudios epidemiológicos han descrito que la exposición a compuestos citotóxicos como insecticidas o herbicidas puede predisponer al desarrollo de PD (Frigerio *et al.*, 2006; Dick *et al.*, 2007; Tanner *et al.*, 2009). Así, la administración crónica de **rotenona** o **paraquat** conduce a la pérdida de neuronas DA de la SNc y sus conexiones nigroestriatales en ratones, dando lugar a un fenotipo neurodegenerativo similar a la PD que incluye la acumulación de α -Syn (Brooks *et al.*, 1999; Betarbet *et al.*, 2000; Sherer *et al.*, 2003). Además, otros compuestos como la **1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina** (MPTP), un análogo narcótico de la meperidina, causa un síndrome parkinsoniano en humanos, mientras que en modelos animales murinos y primates produce pérdida de neuronas DA y deficiencias en la neurotransmisión (Davis *et al.*, 1979; Langston *et al.*, 1983; Vila *et al.*, 2000; Jackson-Lewis *et al.*, 2012).

Tanto los pesticidas como el metabolito del MPTP (MPP⁺) son captados por las neuronas DA de la SNc a través del transportador de DA (DAT). Estos compuestos alteran la función del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial, afectando la fosforilación oxidativa y la producción de energía. En este contexto, se generan **especies reactivas de oxígeno** que resultan tóxicas para las neuronas al inducir estrés oxidativo, que conduce a procesos apoptóticos (Dinis-Oliveira *et al.*, 2006; Ayala *et al.*, 2007). Además, hay otros elementos que pueden generar y aumentar este estrés, como los metales pesados presentes en las

inclusiones proteicas o los metabolitos derivados de la síntesis y degradación de la DA (Hirsch, 2009; Meiser *et al.*, 2013).

FACTORES EPIGENÉTICOS

En los últimos años se ha sugerido que los factores epigenéticos podrían tener un papel clave en las formas esporádicas de PD (Feng *et al.*, 2015; Surguchov *et al.*, 2017). Un ejemplo de ello es la metilación de las dos islas CpG en el gen *SNCA* (exón 1 e intrón 1) y en el gen *SNCG* (intrón 1), que impide la unión de factores de transcripción que modulan su expresión (Iwata *et al.*, 2001; Surgucheva & Surguchov, 2008). Los patrones de metilación en estos genes son diferentes en pacientes de PD y en individuos sanos, pero también se han identificado diferencias epigenéticas en otros genes, como la hipometilación del promotor del gen del factor TNF α o la hipermetilación de regiones CpG de la sinfilina 1, la syntaxina 1B o la glicoproteína GPNMB (Yang *et al.*, 2017).

C. ASPECTOS NEUROPATOLÓGICOS DE LAS SINUCLEINOPATÍAS

I. LOS CIRCUITOS MONOAMINÉRGICOS

En el cerebro, el sistema dopaminérgico se organiza en cuatro circuitos principales de proyección (**Figura 9**) (Malenka *et al.*, 2009; Ikemoto, 2010; Hong, 2013):

- **Nigroestriatal:** desde la *substantia nigra compacta* al núcleo caudado y el putamen, en el cuerpo estriado dorsal. Se encarga de la regulación de las funciones motoras en el circuito de los ganglios basales cuerpo estriado, e influye en procesos cognitivos como el aprendizaje asociativo. También se ha descrito la proyección de la SNc hacia el núcleo subtalámico (Cragg *et al.*, 2004).

- **Mesolímbico:** desde el área tegmental ventral (VTA) al cuerpo estriado ventral, incluyendo el núcleo *accumbens* y el tubérculo olfativo. Regula los procesos cognitivos con componente emocional, como aquellos basados en recompensas (incentivos, placer, refuerzo positivo) o en la aversión. Esta vía también incluye proyecciones menores hacia la amígdala, el hipocampo, el bulbo olfatorio y la corteza cingulada.
- **Mesocortical:** desde la VTA a la corteza prefrontal, influyendo en algunas funciones ejecutivas. La desregulación de las vías mesocorticolímbicas se ha relacionado con algunos trastornos de adicción, desorden de déficit de atención e hiperactividad y esquizofrenia (Blum *et al.*, 2017; Volkow *et al.*, 2017).
- **Tuberoinfundibular:** desde el núcleo arcuato del hipotálamo a la eminencia mediana de la glándula pituitaria, a través del sistema porta hipofisario. Principalmente este sistema regula la liberación de prolactina de la adenohipófisis, y la disfunción del mismo conduce a hiperprolactinemia.

La actividad eléctrica de las neuronas DA se caracteriza por descargas tónicas (1-10 Hz) interrumpidas por descargas fásicas en formas de ráfagas cortas de alta frecuencia (80 Hz) (Marinelli & McCutcheon, 2014; Paladini & Roeper, 2014). Esta actividad está modulada principalmente por las características de la conductancia de la membrana y la regulación glutamatergica y GABAérgica, así como por el autorreceptor DA D2 y el transportador DAT, entre otros (Durante *et al.*, 2004; Shi 2009).

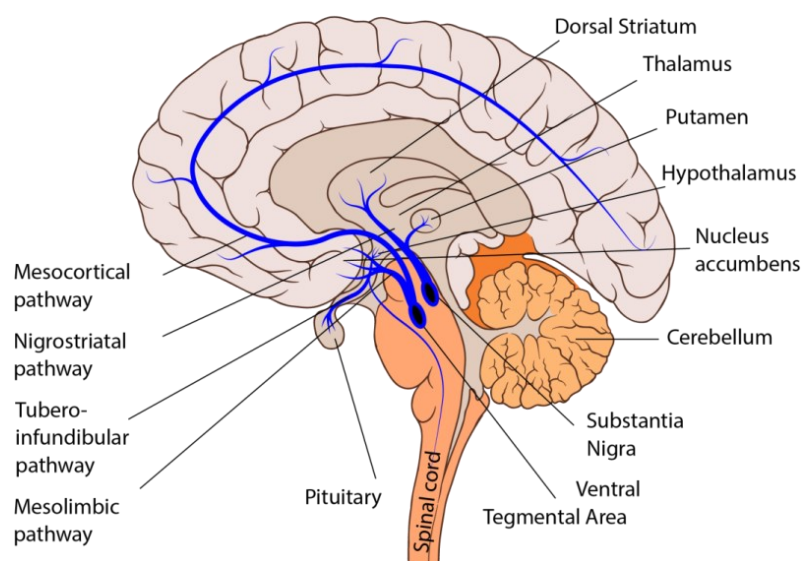


Figura 9. Esquema de las principales vías dopaminérgicas en el cerebro humano: vía nigroestriatal, implicada en el control de la función motora; vías mesolímbica y mesocortical, implicadas en la regulación de la función del circuito emocional y cognitivo; y vía tuberoinfundibular implicada en la regulación de la función neuroendocrina (CC BY-SA 4.0).

En la PD y otras sinucleinopatías se ha observado que las neuronas DA de la vía nigroestriatal son más susceptibles a la degeneración y toxicidad de los LB que otras neuronas DA, aunque las causas continúan siendo objeto de debate (Dragicevic *et al.*, 2015). Se ha descrito que frente a estrés celular crónico la pérdida de las neuronas DA de la SNc es mayor, detectándose una depleción de DA en el CPu (Mizoguchi *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 2008; Rasheed *et al.*, 2010). Algunos factores diferenciales y que caracterizan las neuronas DA de la SNc incluyen: 1) la expresión de **canales de calcio Ca_v1.3**, que provocan variaciones rápidas en las concentraciones de Ca²⁺ potenciando el estrés oxidativo (Surmeier *et al.*, 2011), y 2) la mayor densidad de **canales de potasio K_{ATP}**, que activan descargas transitorias de alta frecuencia, aumentando la demanda metabólica y el estrés de las neuronas DA (Schiemann *et al.*, 2012).

La pérdida de neuronas DA en la PD lleva a que los ganglios basales desarrollen una actividad sincronizada anormal, lo que resulta en una función motora deteriorada. En pacientes con PD, los niveles de DA dorso-estriatal pueden verse reducidos hasta un 70-95% a causa de la afección de la vía nigroestriatal, un circuito esencial para el control del movimiento voluntario (Scherman *et al.*, 1989). La SNc se encarga liberar DA hacia el cuerpo estriado dorsal para modular las vías de activación del movimiento (directa e indirecta) (Kandel *et al.*, 2000). Por tanto, la presencia de los síntomas motores de la PD está relacionada con la disminución de la estimulación del cuerpo estriado (CPu) desde la SNc. Secuencialmente, esto conduce a la **desinhibición de la vía indirecta** del núcleo subtalámico, que reduce la actividad de la actividad talamocortical y por ello se inhibe excesivamente el circuito corticoespinal, manifestándose con ello los síntomas motores característicos (**Figura 10**) (Kandel *et al.*, 2000; Obeso *et al.*, 2008a). Además, la disminución de la neurotransmisión DA también afecta al resto de las vías sobre las que actúa este sistema, como la óculo-motora, asociativa, límbica y orbitofrontal (Obeso *et al.*, 2008b).

Además de los síntomas motores, también se han descrito síntomas no motores relacionados con la función DA. Así, la **disfunción de la función ejecutiva** se correlaciona negativamente con los niveles del autorreceptor D2 en la región asociativa del CPU (Christopher *et al.*, 2014), y el tratamiento con levodopa puede mejorar la neurotransmisión DA hacia regiones como el hipocampo y enlentecer la **pérdida de memoria** (Costa *et al.*, 2012; Calabresi *et al.*, 2013). Los síntomas de **depresión** se atribuyen principalmente a la disfunción de las neuronas serotoninérgicas, pero también se pueden relacionar con el deterioro del circuito DA mesolímbico que contribuiría a agravar las alteraciones emocionales preclínicas (Salamone *et al.*, 2012; Munhoz *et al.*, 2015).

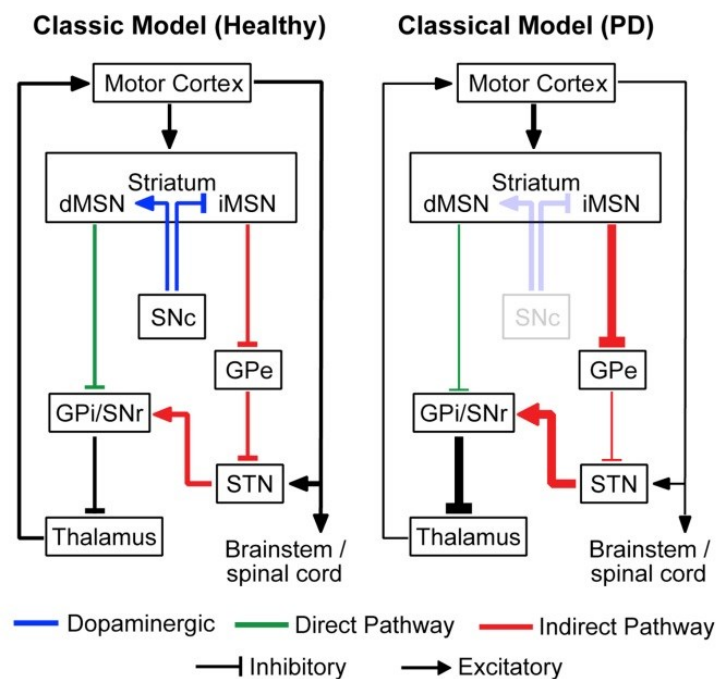


Figura 10. Circuito del movimiento en condiciones normales y patológicas. En individuos sanos, la DA de la SNc activa la vía directa e inhibe la vía indirecta en el CPU al actuar sobre sus neuronas espinosas medianas. Esto disminuye la actividad del globo pálido interno para reducir la inhibición del tálamo y la corteza, promoviendo el movimiento. En condiciones patológicas, la pérdida de la DA desde la SNc lleva a la hipoactividad de la vía directa y la hiperactividad de la indirecta, por lo que aumenta la inhibición que ejerce el globo pálido interno y se altera el movimiento. Adaptado de McGregor & Nelson, 2019.

Como se comentó previamente, la patología de los LB afecta también a neuronas no DA, como glutamatérgicas, GABAérgicas, noradrenérgicas o serotoninérgicas (Damier, 1999; Gesi *et al.*, 2000; Bosboom *et al.*, 2004; Guttman *et al.*, 2007). Entre estos sistemas, es

importante mencionar la pérdida de la función **del sistema serotoninérgico** por su vinculación directa con la sintomatología depresiva que se observa en los pacientes con PD. En estados tempranos de la PD se aprecia una disminución de fibras serotoninérgicas SERT-positivas en el núcleo caudado, el tálamo, el hipotálamo y la corteza cingulada anterior, mientras que en estados más avanzados también se detecta la pérdida de fibras SERT-positivas en el putamen, la ínsula, la corteza cingulada posterior y la prefrontal (Kerenyi *et al.*, 2003; Kish, 2003; Guttman *et al.*, 2007; Albin *et al.*, 2008; Kish, 2008; Politis *et al.*, 2010; Politis *et al.*, 2011a) (**Figura 11**). De acuerdo con estos datos, estudios recientes también mostraron que pacientes con PD portadores de mutaciones en genes como *SNCA* o *LRRK2* presentan una pérdida de fibras SERT-positivas antes de la pérdida de las fibras DA estriatales, lo cual aumenta la importancia del papel temprano de la patología serotoninérgica en la progresión de la PD (Wile *et al.*, 2017; Wilson *et al.*, 2019). De este modo, estos hallazgos sugieren que evaluar la integridad de la función serotoninérgica podría ser una herramienta *in vivo* útil para identificar individuos en riesgo de desarrollar la PD, antes de la evidencia de un déficit DA y precediendo el inicio de la enfermedad por muchos años. Aunque no se relaciona directamente con los objetivos de la presente tesis, durante el desarrollo de la misma también se ha trabajado en la caracterización de un modelo murino de PD con comorbidad con depresión (ver *Referencias*).

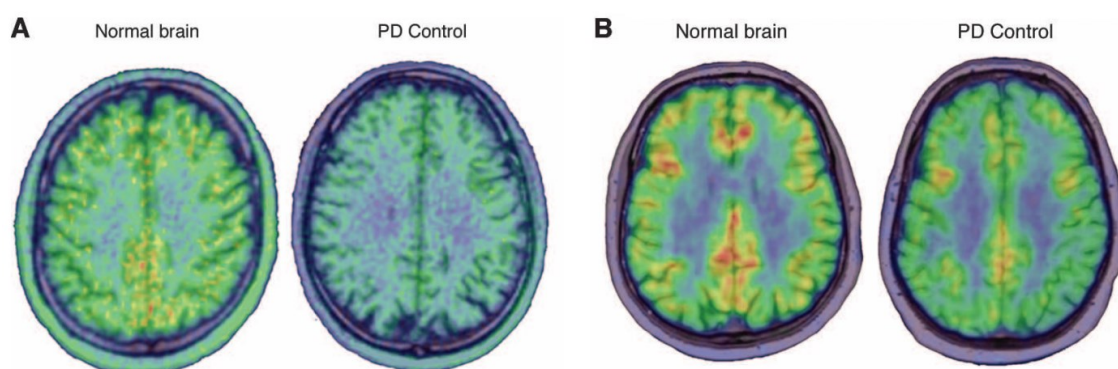


Figura 11. Denervación dopaminérgica y serotoninérgica en pacientes de PD.

Imágenes de *PET-scan* con ^{18}F -dopa (**A**) o $[^{11}\text{C}]\text{DASB}$ (**B**) para la identificación de DAT y SERT, respectivamente, mostrando la denervación dopaminérgica y serotoninérgica en estructuras corticales y subcorticales de individuos sanos y pacientes de PD con 8 años de progresión. Obtenido de Politis *et al.*, 2012.

II. LA HIPÓTESIS DE BRAAK

Utilizando anticuerpos contra α -Syn, Heiko Braak y colaboradores describieron un patrón de distribución de LB que comienza en los bulbos olfatorios y en zonas inferiores al tronco cerebral, y avanza de forma progresiva ascendente hacia distintas regiones subcorticales y corticales del cerebro (**Figura 12**). Además, también lograron correlacionar el patrón de distribución de los LB con la aparición de los síntomas no motores y motores de la enfermedad (Braak *et al.*, 2003, 2006, 2007; Schapira & Tolosa, 2010; Adler & Beach, 2016). Esta progresión se conoce como la **hipótesis de Braak**, y está dividida en 6 estadios (Jellinger 2009; Visanji *et al.*, 2013). De este modo, según la hipótesis de Braak, la patología de las sinucleinopatías podría iniciarse en los extremos de los nervios olfativos o de los plexos de Meissner en el sistema gástrico relacionándose con las alteraciones gastrointestinales y la pérdida del sentido del olfato que se observan en estadios tempranos de la enfermedad, atribuyendo un carácter priónico al inicio de la PD (Pfeiffer, 2011; Doty, 2012). Los estadios de la hipótesis de Braak serían los siguientes:

- **Estadio 1:** la enfermedad empieza en las zonas inferiores del tronco encefálico (núcleo motor dorsal del nervio vago) y del sistema olfativo (núcleo olfativo anterior), donde son más frecuentes las neuritas que los cuerpos de Lewy.
- **Estadio 2:** aparecen lesiones en los núcleos del rafe y el núcleo reticular gigantocelular, y los LB se empiezan a extender por el tronco encefálico desde las estructuras medulares hacia el *locus coeruleus*.
- **Estadio 3:** la patología se empieza a detectar en la SNc, donde ya se acumulan LB. Posteriormente progresa a las neuronas colinérgicas del núcleo basal de Meynert.
- **Estadio 4:** se detecta una pérdida grave de neuronas DA en la SNc y empiezan a afectarse la corteza límbica, paralímbica y olfativa, y sobre todo la amígdala y los núcleos subtalámicos. También se detectan astrocitos inmunorreactivos para α -Syn (Arai *et al.*, 1999; Braak *et al.*, 2007).
- **Estadio 5:** la patología alcanza el neocórtex y se expande por los lóbulos temporal, parietal y frontal, mientras se observa muerte neuronal en varios de los núcleos afectados en estadios anteriores como los del rafe o el *locus coeruleus*.
- **Estadio 6:** la enfermedad alcanza su máxima gravedad, afectando las áreas motoras y sensoriales del neocórtex.

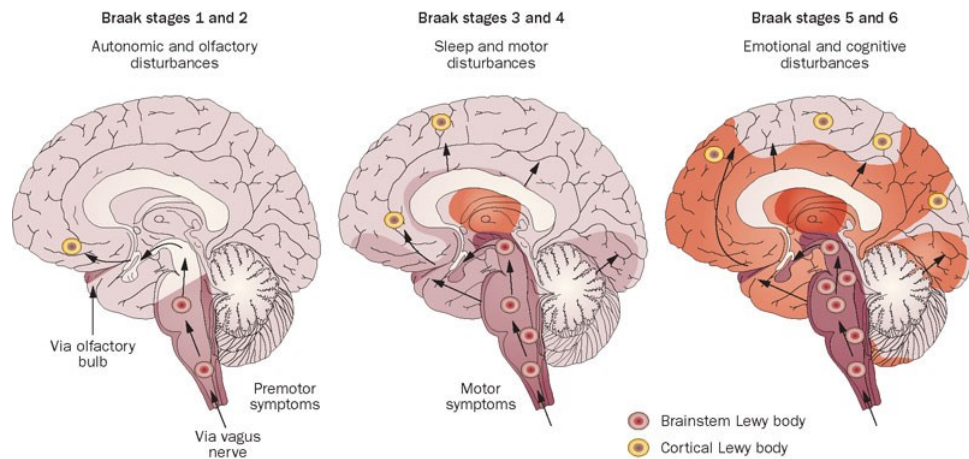


Figura 12. Estadios de Braak en la PD, mostrando los sitios de inicio en el bulbo olfativo y el bulbo raquídeo y la posterior propagación de los LB por las regiones corticales. La patología de la α -Syn podría iniciarse en el sistema nervioso periférico desde el epitelio olfativo o los terminales del nervio vago, tal vez por la acción de agentes externos. Obtenido de Doty *et al.*, 2012.

A pesar del apoyo de estudios *in vitro*, *in vivo* y clínicos para la hipótesis de Braak, también hay dudas sobre si describe con precisión el desarrollo de la PD en todos los pacientes (Rietdijk *et al.*, 2017). Un gran subconjunto de los pacientes de PD (51–83%) sigue la estadificación de Braak, mientras que un subconjunto más pequeño del 7–11% no tiene LB en el núcleo dorsal del nervio vago, pero sus regiones cerebrales superiores sí se ven afectadas (Jellinger, 2003; Kalaitzakis *et al.*, 2008; Attems & Jellinger, 2008; Parkkinen *et al.*, 2008; Zaccai *et al.*, 2008; Beach *et al.*, 2009). Además, las personas con enfermedad de LB incidental parecen tener una distribución similar pero una expresión más leve de patología de Lewy en comparación con pacientes de PD, y pueden mostrar patología en la SNc y otras áreas del cerebro sin alteraciones o pérdida neuronal en el nervio vago; esto apuntaría a múltiples sitios de origen para la patología de los LB en lugar de una propagación desde el sistema nervioso entérico (Parkkinen *et al.*, 2003; Jellinger *et al.*, 2004; Bloch *et al.*, 2006; Dickson *et al.*, 2008; Beach *et al.*, 2009). Además, la hipótesis de Braak no explica cómo o por qué los nervios simpáticos cardíacos se ven afectados en fases tempranas de la PD (Orimo *et al.*, 2007). Recientes estudios en primates no humanos también apoyan el origen multifactorial de las sinucleinopatías, mostrando que distintos mecanismos patológicos y vías de propagación conducen a una degeneración y manifestación clínica similar (Bourdenx *et al.*, 2020). Por tanto, se puede concluir que no todos los pacientes de PD se adhieren al patrón específico de propagación de los LB

propuesto por Braak. Aun así, la hipótesis inicial de Braak ha permitido poner en evidencia las fases tempranas de la enfermedad y la propagación de α -Syn.

III. CUERPOS DE LEWY Y ALTERACIONES HISTOPATOLÓGICAS

La principal característica histopatológica de las sinucleinopatías es la formación y acumulación de los cuerpos y neuritas de Lewy en varias áreas cerebrales interconectadas, como se ha descrito anteriormente. Los agregados se observan en neuronas de pacientes de PD o DLB y en células gliales en la MSA (Arima *et al.*, 1998; Kruger *et al.*, 1998; Mezey *et al.*, 1998; Spillantini *et al.*, 1998; Wakabayashi *et al.*, 1998), pero también se detectan en gran parte de casos de otras enfermedades neurodegenerativas como la de Alzheimer (Hamilton 2000, Mukaetova-Ladinska *et al.*, 2000). Los LB se distinguen por un cuerpo eosinófilo rodeado de un halo pálido, pero varían en su frecuencia, tamaño, forma y estructura según las áreas cerebrales (Gibb *et al.*, 1991). Están **formados principalmente por α -Syn**, que se encuentra hiperfosforilada y en una estructura fibrilar insoluble (Lotharius *et al.*, 2002; Iwatsubo, 2003; Dickson *et al.*, 2009).

Además, hay otras proteínas colocalizando con α -Syn en los agregados insolubles. Entre ellas se ha detectado γ -Syn, lo cual apoya evidencias en modelos *in vitro* que demuestran que **γ -Syn** puede desencadenar el proceso de agregación de α -Syn actuando como nucleador (Surgucheva *et al.*, 2012, 2014). Además, también se han encontrado otras proteínas como **parkina**, **sinfilina-1** y **ubiquitinas** formando parte de los agregados; considerando la función de estas proteínas, esto apuntaría a que los agregados de α -Syn están siendo marcados para su reciclaje proteasomal (Kawamata *et al.*, 2001; Sharma *et al.*, 2001). Por otra parte, los LB también contienen chaperonas como HSP27, HSP70 o HSP90, o apolipoproteínas, que por su estructura intrínsecamente desplegada también pueden formar agregados amiloides (Spillantini *et al.*, 1997; Hatters & Howlett, 2002; Outeiro *et al.*, 2006). Recientemente también se ha descrito un alto contenido lipídico en los LB, confirmando la presencia de membranas y orgánulos colocalizando α -Syn que apoyan la hipótesis de un tráfico de orgánulos deteriorado como elemento conductor de la patogénesis de la PD y otras sinucleinopatías (Shahmoradian *et al.*, 2019).

IV. EFECTOS TÓXICOS DE LAS SINUCLEÍNAS

Actualmente se barajan dos hipótesis principales acerca del papel tóxico de α -Syn en la PD: la **ganancia de una función tóxica** por la acumulación de α -Syn, o la **pérdida de una función protectora** (Kanaan & Manfredsson, 2012; Collier *et al.*, 2016; Oikawa *et al.*, 2016; Wong & Krainc, 2017).

Existen varias causas que desencadenan la toxicidad de α -Syn, como el aumento de su concentración en la célula o la alteración de su estructura por mutaciones, modificaciones post-traduccionales, etc. que aumentan su propensión a agregarse. Entre estas modificaciones destaca la **fosforilación de α -Syn**, en especial en su residuo Ser129, que en condiciones fisiológicas regula la función de α -Syn reduciendo su afinidad por otras proteínas y vesículas (Pronin *et al.*, 2000; Ishii *et al.*, 2007; Mbefo *et al.*, 2010; Visanji *et al.*, 2011; Oueslati, 2016). Sin embargo, la fosforilación excesiva puede promover la oligomerización de las sinucleínas (Cavallarin *et al.*, 2010; Sato *et al.*, 2013; Samuel *et al.*, 2015; Ma *et al.*, 2016). En humanos sanos sólo está fosforilado el 4% del total de α -Syn en el cerebro, pero en los agregados detectados en cerebros *post-mortem* de pacientes las formas fosforiladas de α -Syn llegan hasta el 90% del total (Fujiwara *et al.*, 2002; Saito *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2012; Stewart *et al.*, 2015).

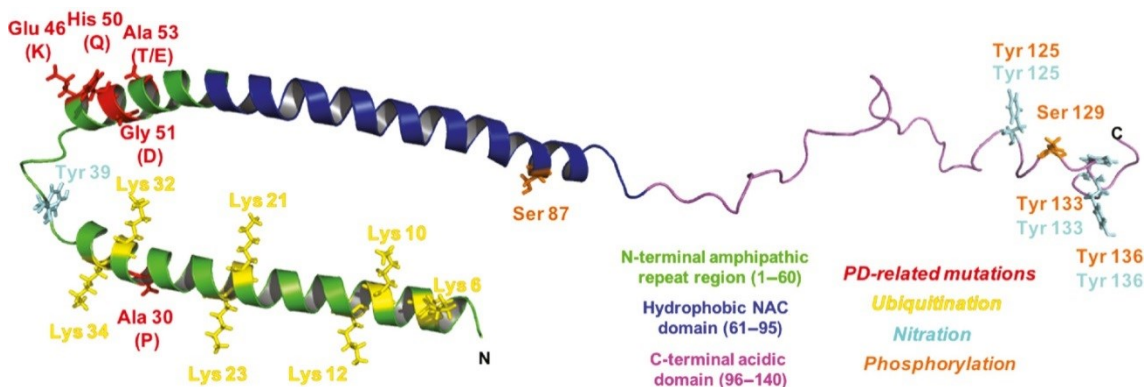


Figura 13. Representación de la estructura de α -Syn: dominio N-terminal (verde) con las repeticiones KTKEGV y la localización de las mutaciones relacionadas con las sinucleinopatías, dominio hidrofóbico central (azul) y dominio ácido C-terminal (violeta). Se indican algunas de las modificaciones post-traduccionales que pueden afectar a la función o estructura de α -Syn. Obtenido de Ottolini *et al.*, 2017.

La conversión de α -Syn de moléculas monoméricas solubles a formas agregadas insolubles es otro elemento clave en la patogénesis de las sinucleinopatías. Experimentos *in vitro* y en modelos celulares han demostrado que las moléculas de α -Syn son propensas a formar oligómeros uniéndose a través de su dominio central hidrofóbico (**Figura 13**) (Bengoia-Vergniory *et al.*, 2017; Alam *et al.*, 2019). En el inicio del proceso de agregación, α -Syn forma **especies oligoméricas** metaestables y relativamente solubles, que pueden autoensamblarse en estructuras fibrilares de mayor tamaño e insolubles (Fink *et al.*, 2006; Uversky, 2007; Breydo *et al.*, 2012).

Las **especies oligoméricas y protofibrillas** de α -Syn son altamente tóxicas para la célula, ya que afectan a funciones como la producción de energía, el tráfico retículo-Golgi, el reciclaje de proteínas o la transmisión sináptica (Winner *et al.*, 2011; Lashuel *et al.*, 2013). Además, los oligómeros también son capaces de unirse a membranas plasmáticas formando poros en ellas, lo cual conduce a una perturbación del equilibrio iónico y la señalización intracelular (Lashuel *et al.*, 2002; Furukawa *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2009; Tsigelny *et al.*, 2012). Por el contrario, en modelos animales y celulares se ha comprobado que las fibrillas maduras y los agregados amiloides de mayor tamaño no serían tan tóxicos como las especies intermedias y los oligómeros de pequeño tamaño (Takeda *et al.*, 2006; Emadi *et al.*, 2007; Winner *et al.*, 2011; Roberts & Brown, 2015; Cascella *et al.*, 2019).

En el caso específico de las **neuronas DA** se ha comprobado que son especialmente vulnerables a la toxicidad de las sinucleínas. Por un lado, algunos procesos del metabolismo de la dopamina aumentan la propensión de α -Syn para formar especies oligoméricas y fibrilares. La misma DA o algunos de sus metabolitos como dopamina-quinona o DOPAL pueden estabilizar las formas protofibrilares de α -Syn, impedir su degradación e incluso aumentar la probabilidad de oligomerización (Conway *et al.*, 2001; Burke *et al.*, 2003; Bisaglia *et al.*, 2007; Martínez-Vicente *et al.*, 2008; Leong *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2011). Por otra parte, la mayor vulnerabilidad de las neuronas DA también se debe a que α -Syn modula varios de sus elementos presinápticos:

- **Síntesis de DA:** α -Syn modula negativamente la actividad de la enzima TH, por lo que la pérdida de función de α -Syn altera la síntesis y homeostasis de la DA (Pérez *et al.*, 2002; Peng *et al.*, 2005; Alerte *et al.*, 2008; Lou *et al.*, 2010).

- **Almacenamiento en vesículas:** en modelos celulares, la sobreexpresión de α -Syn altera el gradiente de protones vesicular, lo cual inhibe el almacenamiento de los neurotransmisores y aumenta el nivel de catecolaminas citosólicas, causando un mayor estrés oxidativo (Lotharius *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2002; Larsen *et al.*, 2006; Mosharov *et al.*, 2006). Además, el aumento de los niveles de α -Syn también modula negativamente el tráfico del transportador VMAT2 desde el sistema de Golgi a las vesículas, provocando un aumento de la DA citosólica y del estrés celular (Cooper *et al.*, 2006; Ogburn & Figueiredo-Pereira, 2006; Chen *et al.*, 2008).
- **Tráfico y liberación de vesículas:** la pérdida de función de α -Syn conduce a la depleción de la reserva distal de vesículas sinápticas, que se acaban liberando excesivamente (Ruiz *et al.*, 2014; Emanuele & Chierregatti, 2015). Por el contrario, niveles excesivos de α -Syn conducen a una mayor interacción con las vesículas, que se acumulan en las reservas distales (Kurz *et al.*, 2010; Lundblad *et al.*, 2012; Íñigo-Marco *et al.*, 2017). Esta acumulación local favorece la proximidad de las moléculas de α -Syn, aumentando la probabilidad de formación de especies oligoméricas y fibrillas amiloides.

Respecto a γ -Syn, al igual que α -Syn presenta una conformación desplegada y proclive a agregarse en oligómeros solubles (Golebiewska *et al.*, 2014). En modelos animales, la **sobreexpresión** de γ -Syn conduce a la formación de agregados e inclusiones, astrogliosis, déficits motores y muerte prematura (Ninkina *et al.*, 2009). Esta agregación se ve facilitada por la **oxidación de los residuos Met-38 y Tyr-39**; sin embargo, las formas oxidadas de γ -Syn son especialmente relevantes porque se ha demostrado su capacidad de iniciar la agregación de moléculas de α -Syn, y colocalizan con la forma fosforilada de α -Syn en los agregados fibrilares (Surgucheva *et al.*, 2012, 2014).

En pacientes de sinucleinopatías también se han encontrado niveles aumentados de γ -Syn (Rockenstein *et al.*, 2001). Concretamente, se pueden encontrar **agregados de γ -Syn** resistentes a proteasas en la SNC, la amígdala o el giro dentado del hipocampo de pacientes de PD y DLB, con efectos tóxicos similares a los de α -Syn (Galvin *et al.*, 1999; Ninkina *et al.*, 2009, Nguyen *et al.*, 2011). Además, las inclusiones de γ -Syn también se detectan en cerebros *post-mortem* de pacientes de otras enfermedades neurodegenerativas como enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Gaucher o esclerosis lateral amiotrófica

(Myerowitz *et al.*, 2004; Peters *et al.*, 2012; Surgucheva *et al.*, 2014). Por otra parte, también se han detectado acumulaciones de γ -Syn en algunas capas de la retina y en el nervio óptico en pacientes de DLB y de glaucoma (Maurage *et al.*, 2003; Surgucheva *et al.*, 2005).

PROPAGACIÓN Y NATURALEZA PRIÓNICA DE LAS SINUCLEÍNAS

En cerebros *post-mortem* de pacientes de PD con trasplantes neurales se detectó patología de LB en las células del implante, lo cual llevó a hipotetizar que α -Syn podría propagarse entre células (Li *et al.*, 2008; Kordower *et al.*, 2008). En experimentos *in vitro* y en modelos celulares se ha comprobado que formas mal plegadas de α -Syn o sus especies fibrilares pueden inducir la agregación de otras moléculas de α -Syn normales, por fenómenos de **nucleación** (Wood *et al.*, 1999; Brundin *et al.*, 2008; Danzer *et al.*, 2008; Angot & Brundin, 2009; Desplats *et al.*, 2009; Goedert *et al.*, 2010; Angot *et al.*, 2012). Además, la inyección *in vivo* de formas agregadas de α -Syn en cerebros de animales induce la formación de inclusiones que se pueden expandir a neuronas de regiones distales (Goedert, 2015).

El mecanismo más probable para la transmisión entre células de las formas tóxicas de α -Syn ocurriría en tres pasos (**Figura 14**): 1) α -Syn se libera al espacio extracelular, por exocitosis o por la muerte de la célula; 2) las formas tóxicas penetran en otras células por endocitosis, translocación en la membrana, transmisión trans-sináptica o mediante receptores celulares; y 3) la α -Syn internalizada recluta más moléculas de α -Syn citosólicas de la nueva célula, y actúa como nucleadora para formar nuevos agregados patogénicos (Angot & Brundin, 2009). De esta forma, los agregados de α -Syn tendrían una **transmisión priónica**, lo cual podría estar relacionado con la propagación de la patología de LB observada anatómicamente según los estadios de Braak (Braak *et al.*, 2003; Brundin *et al.*, 2008; Olanow & Prusiner, 2009; Goedert *et al.*, 2010; Polymenidou & Cleveland, 2012). Además, las formas tóxicas de α -Syn también pueden desencadenar la agregación de otras proteínas como β -amiloide, tau o TDP-43, y promover su propagación en otras enfermedades neurodegenerativas (Giasson *et al.*, 2003; Tsigelny *et al.*, 2008; Ono *et al.*, 2012).

Al igual que α -Syn, γ -Syn también ha mostrado capacidad de transmisión entre células, probablemente siendo secretada a través de exosomas (Surgucheva *et al.*, 2012). Esta propiedad también se ha relacionado con la mayor concentración de γ -Syn en el líquido cefalorraquídeo de pacientes de enfermedad de Alzheimer o de Creutzfeldt-Jakob, DLB y demencia vascular (Doherty *et al.*, 2008; Oeckl *et al.*, 2016).

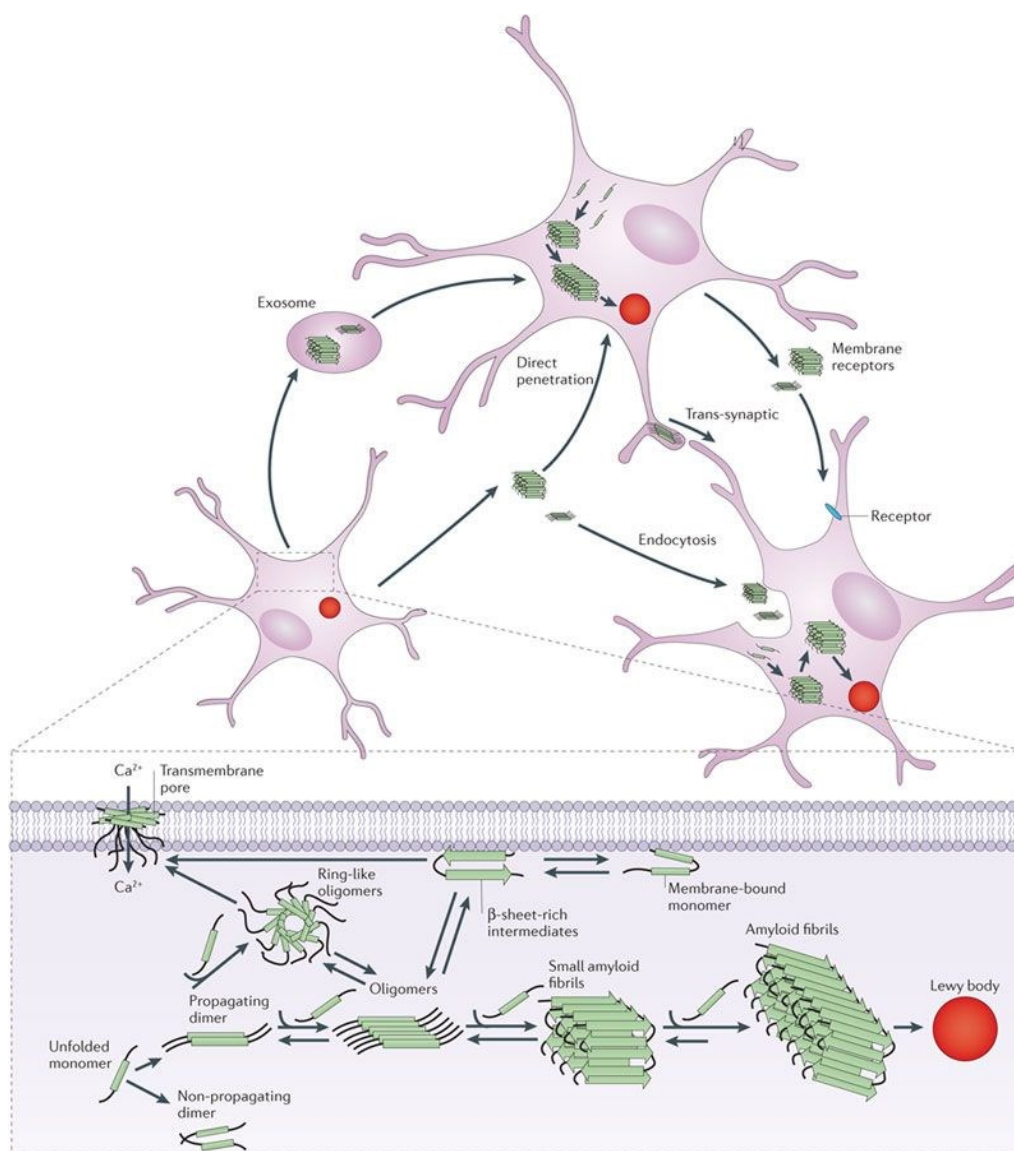


Figura 14. Propagación y agregación de α -Syn. Los fenómenos de agregación pueden producirse en el citoplasma o desde las membranas celulares. Los monómeros se agregan inicialmente **oligómeros** de varias conformaciones y morfologías que acaban formando **fibrillas**, cuya acumulación desencadena la formación de los **cuerpos de Lewy**. Si las especies tóxicas salen al espacio extracelular se pueden transmitir a otras células por endocitosis, penetración directa o a través de la sinapsis o receptores celulares. Obtenido de Lashuel *et al.*, 2013.

V. γ -SINUCLÉINA COMO MARCADOR TUMORAL

Las tres sinucleínas de la familia presentan múltiples funciones, muchas de ellas redundantes, pero la mayor parte de estudios se ha centrado en la α -Syn por su relación con la PD. Sin embargo, γ -Syn ha sido estudiada sobre todo por su papel en ciertos tipos de cáncer, y se conoce mucho menos su papel en relación con el sistema nervioso.

Inicialmente, γ -Syn fue denominada como la proteína BCSG1 (*breast cancer-specific gene 1*), ya que se identificó en varios tipos de **tumores de mama** de estado avanzado (Lavedan *et al.*, 1998). Posteriormente se ha demostrado su implicación en otros tipos de cáncer como el de ovario, cérvix, próstata, vejiga, hígado, páncreas, pulmón, esófago, estómago o colon, e incluso en tumores avanzados del sistema nervioso como ependimomas o glioblastomas (Ninkina *et al.*, 1998; Fung *et al.*, 2003; Iwaki *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2007).

En los estudios clínicos se ha comprobado que la expresión elevada de γ -Syn en los tumores constituye un **marcador de progresión**, siendo signo de un pronóstico desfavorable ya que sus niveles se correlacionan con el estado de progresión del tumor (Ji *et al.*, 1997; Bruening *et al.*, 2000, Guo *et al.*, 2007). Siguiendo esta línea, mediante modelos celulares se ha demostrado que γ -Syn también estaría implicada en la regulación de la invasividad y metástasis de los tumores, independientemente del tipo de cáncer, ya que interactúa o regula la expresión de proteínas implicadas en el ciclo mitótico (ruta mTOR, proteínas del *checkpoint* mitótico), las cascadas de señalización (MAPK, señalización mediada por estrógenos) o la motilidad celular (metaloproteasas MMP2 o MMP9) (Jia *et al.*, 1999; Surguchov *et al.*, 1999, 2001a; Fung *et al.*, 2003; Gupta *et al.*, 2003b; Surgucheva *et al.*, 2003; Inaba *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2006; Surgucheva *et al.*, 2006; Liang *et al.*, 2014).

Pese a esto, no se han encontrado evidencias de mutaciones ni amplificaciones del gen *SNCG* en estas líneas tumorales, lo cual sugiere que su desregulación se produce a nivel transcripcional o por alteraciones epigenéticas (Ninkina *et al.*, 1998; Bruening *et al.*, 2000, Gupta *et al.*, 2003a; Yanagawa *et al.*, 2004; Ye *et al.*, 2008).

3. TRATAMIENTOS DE LAS SINUCLEINOPATÍAS

A. TRATAMIENTOS ACTUALES

Hoy en día, las sinucleinopatías son enfermedades neurodegenerativas que no tienen cura, en parte a causa de la falta de biomarcadores de diagnóstico y progresión y a la detección tardía de la enfermedad. Por ello, las intervenciones actuales son de tipo sintomático, especialmente centradas en la reducción de los efectos motores y en la mejora de la calidad de vida de los pacientes.

I. TERAPIA FARMACOLÓGICA

Actualmente no existen tratamientos que puedan detener la progresión de la PD. Durante el curso temporal de la misma, los síntomas progresan invariablemente, y sin tratamiento avanzan agresivamente hasta una pérdida de independencia en 8 a 10 años (Casey, 2013). En el proceso, los principales problemas se relacionan inicialmente con los síntomas motores y la respuesta a la medicación, pero la discapacidad de los pacientes aumenta con el tiempo a causa de la comorbidad con perturbaciones autonómicas, problemas de sueño, alteraciones del estado de ánimo y déficit cognitivo.

Con el fin de revertir la sintomatología motora se han desarrollado distintos tratamientos para sustituir e incrementar los niveles de DA afectados por la degeneración nigroestriatal. El principal fármaco es la **levodopa**, un precursor de la DA que disminuye los síntomas temporalmente tras atravesar la barrera hematoencefálica y ser metabolizada (Olanow *et al.*, 2011). Sin embargo, al ser administrada por vía oral el 90-95% de la levodopa es metabolizada periféricamente con efectos secundarios, por lo que se administra con inhibidores de la DOPA-descarboxilasa como carbidopa o benserazida. También se suele combinar con inhibidores de la catecol-O-metiltransferasa para evitar la degradación de la DA una vez metabolizada.

Con el tiempo, la respuesta frente a la levodopa deja de ser constante y conduce a disquinesias a lo largo del día (fases *on/off*), ante lo cual se puede reducir la dosis o modificar la vía de administración (Tolosa *et al.*, 2007; Zhang & Tan, 2016). En esta estrategia destaca el uso de bombas intraduodenales para la infusión continua y prolongada de levodopa, que permite mantener los niveles en el plasma constantes.

Además de la levodopa, se han explorado otras terapias farmacológicas con **agonistas de DA**, en especial en las primeras fases de la enfermedad y edades más tempranas para retrasar el uso de la levodopa y sus complicaciones (Samii *et al.*, 2004; Aquino & Fox, 2015). Estos fármacos, como la ritogotina y la apomorfina, actúan incrementando la respuesta post-sináptica al unirse a los receptores D1 y D2, aunque al administrarse periféricamente también conducen a diversos efectos secundarios que limitan su potencial terapéutico. Como estrategia para aumentar la cantidad de DA en los ganglios basales también se emplean **inhibidores de monoamino-oxidasa B (MAO-B)**, que permiten retrasar el uso de la levodopa o para atenuar las fluctuaciones, aunque causan efectos secundarios y son menos efectivos contra síntomas motores.

Respecto a la DLB sólo se suelen ofrecer cuidados paliativos, ya que el tratamiento farmacológico no puede modificar la evolución de la enfermedad y su complejidad clínica aumenta por el equilibrio que debe alcanzarse entre los distintos tipos de síntomas (Boot, 2015; Walker *et al.*, 2015; Velayudhan *et al.*, 2017):

- **Síntomas motores:** los pacientes no son tan sensibles a los fármacos antiparkinsonianos como levodopa, y deben introducirse con cautela por los posibles efectos psicóticos que pueden agravar el componente neuropsiquiátrico.
- **Síntomas neuropsiquiátricos:** no hay tratamientos efectivos para las alucinaciones visuales más allá de la interrupción del tratamiento con levodopa; según la tolerancia a anticolinérgicos o antidepresivos pueden usarse contra la depresión, con el riesgo de empeorar las alucinaciones (McKeith *et al.*, 2017; Tousi, 2017).
- **Desórdenes en la fase REM:** se pueden tratar con melatonina, o con clonazepam aunque puede empeorar el deterioro cognitivo (St Louis *et al.*, 2017a, 2017b).
- **Síntomas autonómicos:** pueden evitarse reduciendo los fármacos dopaminérgicos o antipsicóticos atípicos, en especial frente a problemas de tensión.

II. OTROS TIPOS DE TRATAMIENTO

Junto a las terapias farmacológicas, también se han desarrollado otros tipos de tratamiento en aquellos casos donde los fármacos dopaminérgicos no responden (Elbers *et al.*, 2015). En concreto, la **estimulación cerebral profunda** puede mejorar entre un 30 y un 60% las capacidades motoras y las fluctuaciones en los pacientes al aplicarse sobre regiones del circuito motor como el globo pálido interno, el tálamo o el núcleo subtalámico (Temel *et al.*, 2006; Okun & Foote, 2010).

La **rehabilitación** fisioterapéutica y el ejercicio físico regular también pueden mantener y mejorar las capacidades motoras, en especial después de la medicación con levodopa (Goodwin *et al.*, 2008). Los ejercicios de relajación o fortalecimiento muscular, la logopedia o la terapia ocupacional resultan beneficiosos en la mejora de la calidad de vida, especialmente contra los síntomas de la DLB (Dereli & Yaliman, 2010; Connors *et al.*, 2018).

La afección del proceso digestivo por problemas como estreñimiento, gastroparesis o disfagia suele requerir una **dieta equilibrada** para evitar el cambio de peso y minimizar las consecuencias de la disfunción autonómica. Especialmente, se recomienda evitar un exceso de proteínas junto a la medicación, para evitar la competencia con la levodopa al atravesar la barrera hematoencefálica (Barichella *et al.*, 2009).

Por último, los **cuidados paliativos** también son relevantes para mejorar la calidad de vida del paciente, en especial en etapas tempranas para acompañarlos en los problemas motores y el factor emocional (Ferrell *et al.*, 2007; Wilcox, 2010; Ghoche, 2012; Lorenzl *et al.*, 2013). La demanda hacia los cuidadores aumenta en fases más tardías, o en pacientes de DLB por los síntomas neuropsiquiátricos, el comportamiento fluctuante y las alucinaciones visuales (Vann Jones & O'Brien, 2014; Cheng, 2017).

B. TERAPIAS EXPERIMENTALES

Con el conocimiento molecular y bioquímico obtenido sobre las sinucleínas se han considerado diferentes métodos para inhibir sus propiedades patológicas y enlentecer la progresión de las sinucleinopatías, incluyendo la reducción de su expresión, el aumento de su degradación o la inhibición de su agregación en agregados tóxicos (**Figura 15**) (Lashuel *et al.*, 2013, Sardi *et al.*, 2018).

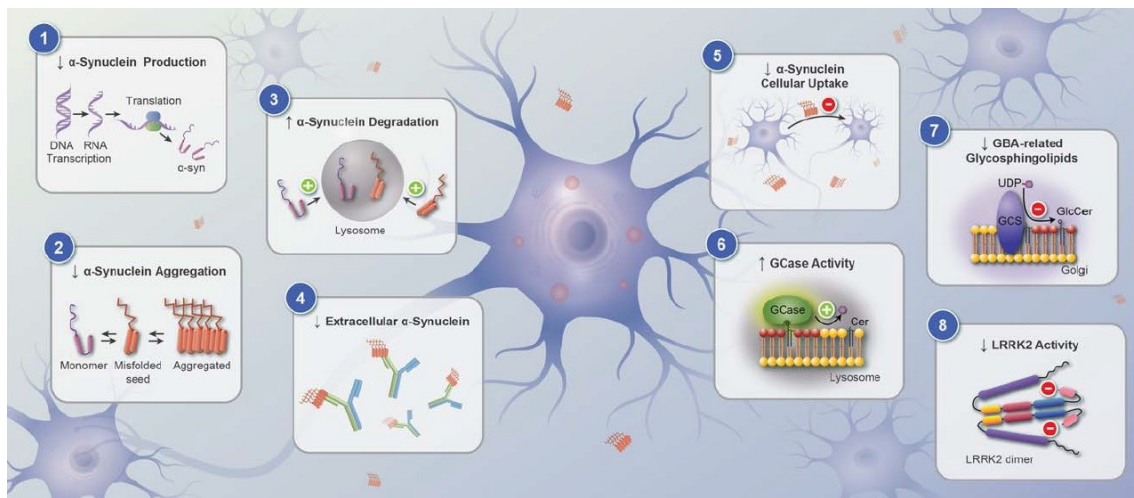


Figura 15. Terapias experimentales para frenar la progresión de la patología de la PD: 1) reducción de la producción de α -Syn; 2) disminución de la agregación intracelular de α -Syn; 3) incremento de la degradación intracelular de α -Syn; 4,5) reducción de la cantidad de agregados extracelulares de α -Syn e inhibición de su recaptación; 6) aumento de la actividad de la enzima GBA; 7) modulación de los glicosfingolípidos relacionados con la GBA; 8) inhibición de la actividad kinasa de LRRK2. Obtenido de Sardi *et al.*, 2018.

El descubrimiento de que la dosis génica de las sinucleínas puede desencadenar la patología en la PD sugiere que la manipulación de sus niveles de expresión puede servir como estrategia terapéutica o preventiva. En los años 70 se descubrió la capacidad de silenciamiento de la expresión génica de los ácidos nucleicos de cadena corta, y posteriormente se describió un mecanismo endógeno de modulación de la expresión génica mediante RNAs de interferencia (iRNA) (McNamara *et al.*, 2006; Mayer *et al.*, 2009; Thiel & Giangrande, 2009). Aprovechando el potencial de estas técnicas, actualmente existe un gran interés en el **silenciamiento de la expresión** de proteínas como las sinucleínas, principalmente con dos estrategias:

- **Oligonucleótidos antisentido (ASO):** secuencias simples de DNA de entre 18 y 25 bases complementarias con el mRNA de interés, que normalmente se modifican químicamente para aumentar su eficiencia. Al reconocer a su mRNA diana provocan la activación de la RNasa H, causando la degradación del transcrito (Schoch & Miller, 2017; Scoles *et al.*, 2019). En modelos animales han mostrado su seguridad y efectividad frente a las sinucleinopatías, y actualmente se está empleando esta estrategia experimentalmente en enfermedades neurodegenerativas como la PD, la enfermedad de Huntington, la de Alzheimer o la esclerosis lateral amiotrófica (Benson *et al.*, 2018; Foltynia & Langston, 2018; Mercuri *et al.*, 2018; Scoles & Pulst, 2018).
- **RNAs pequeños de interferencia (siRNA):** secuencias de doble hebra de RNA que activan los mecanismos de las células para bloquear la traducción o degradar el mRNA de un gen concreto a través del complejo RISC, de manera análoga a los microRNAs endógenos. En el caso de las sinucleinopatías se ha conseguido una disminución selectiva y segura de la expresión de α -Syn en roedores, consiguiendo revertir las alteraciones en un modelo de PD (Javed *et al.*, 2016; Zharikov *et al.*, 2019).

Desde otros puntos de vista, se han explorado distintas estrategias para **inhibir la agregación de α -Syn**. Entre ellas destaca el uso de intracuerpos, pequeños anticuerpos que pueden entrar en las células y unirse a la α -Syn en forma monomérica para impedir su oligomerización y fibrilación (El Agnaf *et al.*, 2004; Masliah *et al.*, 2005; Amer *et al.*, 2006; Abe *et al.*, 2007). En cultivos celulares se ha descrito que la administración de estos intracuerpos previene la agregación de α -Syn, de modo que podrían ser eficaces en estadios tempranos de PD familiar o frente a errores en los sistemas de degradación de proteínas (Zhou *et al.*, 2004; Lynch *et al.*, 2008; Bhatt *et al.*, 2013). También se han explorado algunos compuestos flavonoides como la baicaleína, que pueden inhibir la formación de formas fibrilares de α -Syn o incluso disgregarlas (Zhu *et al.*, 2004).

Otras aproximaciones optan por **aumentar la degradación intracelular de α -Syn**. Entre ellas, la inhibición de mTOR, un inhibidor de las vías autofágicas, podría incrementar estos procesos y reducir los niveles de α -Syn. En modelos animales ya se ha demostrado que algunos de estos inhibidores disminuyen la toxicidad neuronal causada por α -Syn

(Decressac *et al.*, 2013; Ghosh *et al.*, 2016). También se están investigando inhibidores de la tirosina-kinasa c-Abl, que en estudios preclínicos han mostrado que bloquean la agregación de proteínas y la neurodegeneración, aunque no se conoce con exactitud su mecanismo de acción (Karuppagounder *et al.*, 2014; Brahmachari *et al.*, 2017); en concreto, el inhibidor nilotinib ha mostrado una mejora en los síntomas motoras en pacientes de PD y DLB en ensayos clínicos (Pagan *et al.*, 2016).

Por último, otra de las estrategias exploradas contra las sinucleínas es la **inhibición de su transmisión celular**. Mediante la reducción de sus niveles extracelulares se puede tratar de bloquear su propagación entre células, para lo cual se está explorando la inmunización contra α -Syn. En concreto, existen ensayos clínicos basados en la inmunización pasiva mediante anticuerpos monoclonales, que han mostrado efectividad para reducir la forma agregada de α -Syn aunque no su forma monomérica (Games *et al.*, 2013; Schenk *et al.*, 2017; Jankovic *et al.*, 2018; Brys *et al.*, 2019).

A. HIPÓTESIS

Varias líneas de evidencias indican un papel crucial de la proteína α -Syn, y en menor medida γ -Syn, en la neuropatología de las sinucleinopatías. Mientras α -Syn y su forma fosforilada afectan a varios pro-cesos celulares que conducen a la disfunción sináptica y pérdida de las neuronas monoaminérgicas, en especial las dopaminérgicas, la proteína γ -Syn se ha sugerido como un factor esencial que afecta a la función cognitiva. Ambas proteínas se localizan principalmente en los terminales sinápticos asociados a las vesículas sinápticas; sin embargo, el rol fisiológico de ambas sinucleínas es aún poco conocido.

Mientras que la función biológica de α -Syn sobre la plasticidad monoaminérgica ha sido abordada en el desarrollo de otra tesis del grupo de investigación, el presente trabajo de tesis se ha centrado en obtener un mayor conocimiento acerca del papel regulador de γ -Syn sobre la neurotransmisión dopaminérgica y la plasticidad sináptica bajo la hipótesis de trabajo de que **las sinucleínas actúan como reguladores negativos de la liberación de DA, 5-HT y NE en áreas corticales y subcorticales en virtud de la conectividad de estos sistemas**, llevando así a la aparición de la sintomatología cognitivo-afectiva en la PD y otras sinucleinopatías.

Consecuentemente, también hipotetizamos que **la reducción de la síntesis de las sinucleínas inducida por oligonucleótidos inhibitorios dirigidos selectivamente hacia las neuronas monoaminérgicas normalizará la neurotransmisión y plasticidad monoaminérgica**, contribuyendo a mejorar las funciones de los circuitos cognitivo-afectivos en las sinucleinopatías.

B. OBJETIVOS

El objetivo general de esta tesis es examinar el papel modulador de la proteína sináptica γ -Syn sobre la actividad de los componentes que mantienen la homeostasis de la neurotransmisión dopaminérgica. Además, también evaluar la eficacia de un nuevo oligonucleótido antisentido con potencial terapéutico en modelos murinos de PD. Concretamente los objetivos específicos son:

1. Generación de un modelo animal de sobreexpresión y de *knockdown* de γ -sinucleína en las neuronas dopaminérgicas de la *substantia nigra compacta* y el área tegmental ventral, utilizando vectores víricos adenoasociados u oligonucleótidos inhibitorios, respectivamente.
2. Caracterización fenotípica de ambos modelos animales de γ -sinucleína, desde un punto de vista molecular, celular, neuroquímico y conductual; examen de las consecuencias funcionales sobre la neurotransmisión dopaminérgica.
3. Evaluación de la neurotransmisión dopaminérgica y la presencia de comportamientos motores, emocionales y cognitivos en modelos murinos transgénicos con las formas mutadas de las proteínas α Syn*A30P*A53T y LRRK2*G2019S.
4. Caracterización de la eficacia del tratamiento con un oligonucleótido antisentido conjugado con indatralina en los modelos de ratones transgénicos α Syn*A30P*A53T y LRRK2*G2019S; validación *in vivo* de su direccionamiento hacia las neuronas monoaminérgicas.

A. ANIMALES

En los experimentos se emplearon ratones que fueron estabulados bajo condiciones controladas (22 ± 1 °C, humedad de $55\pm 5\%$, ciclo de luz/oscuridad de 12 h) y con agua y comida disponibles *ad libitum*. Todos los procedimientos se llevaron a cabo de acuerdo con las guías éticas estándares (RD 53/2012, directiva UE 2010/63 de 22/09/2010) y aprobados por el Comité Institucional para el Uso y Cuidado de los Animales de la Universitat de Barcelona. En los experimentos del primer trabajo se usaron ratones machos de la cepa C57Bl/6J de 10-14 semanas (*Charles River Laboratories*, Lyon, Francia).

I. MODELOS DE RATONES TRANSGÉNICOS

Se emplearon ratones machos de 4-5 meses de edad de las siguientes líneas modificadas genéticamente (*The Jackson Laboratory*, Bar Harbor, ME, EEUU):

- **Línea Tg(Th-SNCA*A30P*A53T)39Eric/J**: portadora del gen *SNCA* humano con las mutaciones A30P y A53T, expresado bajo el promotor de tirosina-hidroxilasa de rata. Este modelo de ratón transgénico fue generado por Eric Richfield y colaboradores (Rutgers University, NJ, EEUU) (Richfield *et al.*, 2002).
- **Línea Tg(LRKK2*G2019S)2AMjff/J**: portadora gen *LRRK2* humano con la mutación G2019S, expresada bajo el propio promotor del gen *LRRK2* e introducida con el sistema BAC (*Bacterial Artificial Chromosome*). Este modelo de ratón transgénico fue generado por Kuldip Dave y colaboradores (*Michael J. Fox Foundation*).

Como controles en ambos modelos se utilizaron ratones machos C57Bl/6J de la misma edad y fondo genético.

Tabla 2. Modelos experimentales empleados en la presente tesis.

MODELO	EXPRESIÓN SINUCLEÍNAS	TRATAMIENTO	ANÁLISIS	SACRIFICIO
AAV10-γ-Syn	Sobreexpresión γ -Syn	Infusión AAV10 SNe/VTA	<i>Histológico</i> <i>Neuroquímico</i> <i>Conductual</i>	<i>1-4-8-16</i> <i>semanas post-</i> <i>infusión</i>
IND-ASO-1415	Silenciamiento γ -Syn	Infusión ASO SNe/VTA Infusión ASO I.C.V.	<i>Histológico</i> <i>Neuroquímico</i>	<i>24-72 h post-</i> <i>infusión</i> <i>1 día tras</i> <i>última dosis</i>
αSyn*A30P *A53T	Sobreexpresión (h)- α -Syn mutada	Infusión ASO I.C.V.	<i>Histológico</i> <i>Neuroquímico</i> <i>Conductual</i>	<i>1 día tras</i> <i>última dosis</i>
LRRK2* G2019S	-	Infusión ASO I.C.V.	<i>Histológico</i> <i>Neuroquímico</i> <i>Conductual</i>	<i>1 día tras</i> <i>última dosis</i>

B. MODELO DE SOBREENPRESIÓN MEDIANTE VECTORES VÍRICOS

Para la sobreexpresión de la proteína γ -Syn en la SNe/VTA se ha empleado un **vector vírico adenoasociado de serotipo 10 (AAV10)**, que sobreexpresa el cDNA de la forma murina endógena de γ -Syn bajo el promotor de citomegalovirus (CMV). Los vectores se produjeron en la Unitat de Producció de Vectors del Centre de Biotecnologia Animal i de Teràpia Gènica (Universitat Autònoma de Barcelona, España), y se almacenaron hasta su uso a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ en tampón PBS-MK-Iodixanol (137 mM NaCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 2.5 mM KCl, 1.8 mM KH_2PO_4 , 1mM MgCl_2 con iodixanol 40%). Como control se utilizó un vector AAV10 vacío o el vehículo en que se almacenan los vectores.

Para la administración, ratones machos de la cepa C57Bl/6J de 10-14 semanas fueron anestesiados intraperitonealmente (i.p.) con pentobarbital sódico (40 mg/kg) y se colocaron en un sistema estereotáxico. Los ratones recibieron unilateralmente en la SNe/VTA 1 μl de: 1) vector vírico AAV10-CMV- γ -Syn (1.33×10^{13} gc/mL), o 2) PBS-MK o un

vector AAV10 vacío como controles. Las coordenadas de infusión fueron (en mm): anterior-posterior, AP: -2.9; medial-lateral, ML: -1.3; dorsal-ventral, DV: -4.25, relativas al punto bregma (Franklin & Paxinos, 2008); la administración se llevó a cabo utilizando una jeringa Hamilton acoplada a un microinyector *KDS-310-PLUS* (*World Precision Instruments*, Sarasota, LF, EEUU) a un flujo de 0.2 $\mu\text{L}/\text{min}$. Tras la infusión, se esperaron 10 min para permitir la difusión del volumen inyectado, y la incisión se cerró mediante el adhesivo tisular *Histoacryl* (*B. Braun*, Melsungen, Alemania), supervisando a los ratones hasta su recuperación de la anestesia.

C. MODELO DE SILENCIAMIENTO MEDIANTE OLIGONUCLEÓTIDOS ANTISENTIDO

En primer lugar, se sintetizaron moléculas de RNAs pequeños de interferencia (*small interference RNA*, siRNA) con 3 secuencias distintas contra diferentes regiones del transcrito de la γ -Syn murina (siRNA 422-440, siRNA 439-457, siRNA 449-468; GenBank NM_011430.3) (**Tabla 3**).

Además, se han diseñado secuencias de **oligonucleótidos antisentido** (*antisense oligonucleotide*, ASO) contra el transcrito de la γ -Syn murina (1415-ASO, GenBank NM_011430.3) y contra la α -Syn humana y murina (1233-ASO, GenBank AH008229.3) (**Tabla 3**). Adicionalmente se ha empleado una secuencia de ASO sin homología con ninguna región del genoma de ratón como control negativo (1227-ASO). Los ASOs fueron conjugados con una molécula de **indatralina**, inhibidor triple con gran afinidad *in vitro* y ocupación *in vivo* de los transportadores de monoaminas: DAT, SERT y NAT (Molochnikov & Cohen, 2014).

La síntesis y purificación de las moléculas de siRNA y ASO conjugadas se realizó por parte de *nLife Therapeutics* S.L. (Granada, España), según la patente PCT/EP2011/056270 y tal como se describe en estudios anteriores (Bortolozzi *et al.*, 2012; Ferrés-Coy *et al.*, 2016; Alarcón-Arís *et al.*, 2018). Los siRNAs consisten en bases de RNA de doble cadena, de 19

pares de bases de ribonucleótidos complementarios con 2 bases de desoxirribonucleótidos en sus extremos 3'. Los ASOs consisten en un gapmero, un oligonucleótido quimérico de 18 nucleótidos con un bloque central de DNA flanqueado por bases de 2-O-metil RNA para proteger al DNA de la degradación por nucleasas y mejorar su unión a la secuencia diana.

La síntesis de las moléculas siRNA y ASO llevó a cabo con fosoramiditas *UltraMild-Protected* (Glen Research, Sterling, VA, EEUU) y un sintetizador automático H-8 DNA/RNA (K&A Laborgeraete GbR, Schaafheim, Alemania). La indatralina (clorhidrato, transracemato) se conjugó a los ASOs mediante una modificación 5'-carboxi-C10 a través de un enlace amida, y la condensación se llevó a cabo bajo condiciones orgánicas (diisopropiletilamina/dimetilformamida, DIPEA/DMF), a temperatura ambiente durante 24 h. Los ASO conjugados se purificaron por cromatografía líquida de alta precisión usando columnas RP-C18 (4.6x150 mm, 5 µm) bajo una condición de gradiente lineal de acetonitrilo. Los pesos moleculares de las cadenas de oligonucleótidos y los conjugados se confirmaron por espectrometría de masas MALDI-TOF (*Ultraflex*; Bruker Daltonics, Billerica, MA, EEUU), y la concentración de los oligonucleótidos conjugados se calculó según su absorbancia a la longitud de onda 260 nm. Las soluciones de todos los siRNAs y ASO se prepararon en agua libre de RNasas y almacenadas a -30 °C hasta su uso.

Para el **modelo de silenciamiento agudo**, ratones machos de la cepa C57Bl/6J de 10-14 semanas fueron anestesiados y colocados en un sistema estereotáxico para recibir unilateralmente en la SNc/VTA 1 µl de: 1) siRNAs (60 µg/µL); 2) IND-1415-ASO (60 µg/µL); o 3) IND-1227-ASO o líquido cefalorraquídeo artificial (LCR; 125 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1.26 mM CaCl₂, 1.18 mM MgCl₂ con glucosa 5%, pH 5.5-6.0), empleados como controles. Las coordenadas de infusión fueron (en mm): AP: -2.9; ML: -1.3; DV: -4.25, relativas al punto bregma; la administración se llevó a cabo utilizando una jeringa Hamilton acoplada a un microinyector *KDS-310-PLUS* (*World Precision Instruments*) a un flujo de 0.2 µL/min. Tras la infusión, se esperaron 10 min para permitir la difusión del volumen inyectado, y la incisión se cerró mediante el adhesivo tisular *Histoacryl* (*B. Braun*, Melsungen, Alemania), supervisando a los ratones hasta su recuperación de la anestesia.

Para el **modelo de silenciamiento crónico** intracerebroventricular (i.c.v.), los ratones fueron implantados con minibombas osmóticas (*Alzet Osmotic Pumps*, Cupertino, CA, EEUU). Para ello, los ratones fueron anestesiados y colocados en un sistema estereotáxico;

las minibombas se implantaron subcutáneamente y se situó una cánula de infusión en el ventrículo lateral para la administración continua. En el trabajo 1, los ratones recibieron: 1) IND-1415-ASO (60 µg/día), o 2) LCR, como control; por otro lado, en el trabajo 2, los ratones transgénicos recibieron: 1) IND-1233-ASO (100 µg/día), o 2) LCR, como control. Las coordenadas para el implante fueron (en mm): AP: -0.34; ML: -1.0; DV: -2.2, relativas al punto bregma, y la cánula se fijó con cemento dental *TAB2000* (Kerr, Brea, CA, EEUU), supervisando a los ratones hasta su recuperación de la anestesia.

Tabla 3. Secuencias de ASOs y siRNAs usadas en la presente tesis.

MOLÉCULA	TRANSCRITO DIANA	SECUENCIA SENTIDO/ANTISENTIDO	ADMINISTRACIÓN / DOSIS
1415-ASO	γ-Syn	- / <i>ucuuCATTCTCCTCuugu</i>	<i>SNc/VTA (60 µg/µL)</i> <i>I.C.V. (60 µg/día)</i>
1233-ASO	α-Syn	- / <i>cuccCTCCACTGTCuucu</i>	<i>I.C.V. (100 µg/día)</i>
1227-ASO	-	- / <i>ccgtATCGTAAGCAgtac</i>	<i>SNc/VTA (60 µg/µL)</i>
siRNA 422-440	γ-Syn	<i>gcaagaggagaaugaagagTT / cucuucuuuccucucTT</i>	<i>SNc/VTA (60 µg/µL)</i>
siRNA 439-457	γ-Syn	<i>ggccaagaguggagaagacTT / gucuucuccacucuggccTT</i>	<i>SNc/VTA (60 µg/µL)</i>
siRNA 449-468	γ-Syn	<i>ggagaagacuagaaggcugTT / cagccuucuagucucuccTT</i>	<i>SNc/VTA (60 µg/µL)</i>

A,C,G,T = 2'-desoxirribonucleótidos; a,c,g,u = ribonucleótidos (siRNAs); *a,c,g,u* = 2'-O-metil-ribonucleótidos (ASOs).

D. HIBRIDACIÓN *IN SITU*

Para los experimentos de hibridación *in situ* (ISH) los ratones fueron sacrificados por sobredosis de anestesia y se extrajeron sus cerebros, que fueron congelados en hielo seco y almacenados a -80 °C. Se obtuvieron secciones coronales de tejido (14 µm) con un microtomo-criostato (*HM550-OM*; *Microm*, Walldorf, Alemania), montadas en portaobjetos recubiertos de (3-aminopropil)-triétoxisilano (*Sigma-Aldrich-RBI*) y almacenadas a -30 °C hasta su uso.

Previamente, los tejidos se fijaron durante 20 min a 4 °C con paraformaldehído (4%) en solución salina fosfatada (PBS 1x: 137 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2.5 mM KCl, 1.8 mM KH₂PO₄), lavados sucesivamente durante 5 min en PBS 3x, PBS 1x y PBS 1x, e incubados durante 2 min a 21 °C en una solución de pronasa predigerida (24 U/mL; *Calbiochem*, San Diego, CA, EEUU) en Tris-HCl (50 mM, pH 7.5) y EDTA (5 mM). La actividad enzimática se detuvo por inmersión durante 30 s en glicina (2 mg/mL en PBS 1x), para finalmente lavar dos veces los tejidos en PBS 1x y deshidratarlos en un gradiente de etanol 70-100%.

I. HIBRIDACIÓN RADIATIVA

Para la detección de los transcritos de interés se usaron las siguientes sondas antisentido de oligodesoxirribonucleótidos (*Axolabs GmbH*, Kulmbach, Alemania) (**Tabla 4**):

Tabla 4. Sondas antisentido de cDNA empleadas para los experimentos de hibridación *in situ*

mRNA	REFERENCIA	SECUENCIA SONDA	BASES HOMÓLOGAS EN EL TRANSCRITO
γ-Syn	NM_011430	5'-GCTTCTTGGTCTGTGCAGGGGGT TCCAAGTCCTCCTTGCACACCACC-3'	366-416
α-Syn (ratón)	NM_009221	5'-AGGTTTTCACTGTAGTGAGAG GGGAGCACCGGGATGCTGAGG-3'	411-447
α-Syn (humano)	NM_000345	5'-AATTCTTCTTCTGTGGGGCTC CTTCTTCATTCTTGCCCAAC-3'	2498-2548
DAT	NM_010020	5'-CACGTAGAAAGAGATGAGGATGACA GTGAAGCCCACACCTTTCAGGACAG-3'	820-863

Una cantidad de 2 pmol de cada sonda se marcó en su extremo 3' con [³³P]-dATP (>2500 Ci/mmol; *DuPont-NEN*, Boston, MA, EEUU) usando la enzima desoxinucleotidil-transferasa terminal (TdT; *Calbiochem*). Para la hibridación, las sondas marcadas radiativamente se diluyeron en una solución con formamida (50%), citrato salino estándar (4x), solución de Denhardt (1x), sulfato de dextrano (10%) y sarkosil (1%) en tampón fosfato (20 mM, pH 7.0), con tRNA de levadura (250 µg/mL) y DNA de esperma de salmón (500 µg/mL). La concentración final de las sondas radiactivas en el tampón de

hibridación se calculó considerando la cantidad de marcaje radiactivo obtenida tras la hibridación, con alrededor de 1.5 nM (20.000–25.000 cpm). Los tejidos se cubrieron con la solución de hibridación con las sondas radiactivas, a su vez con coberturas de *Parafilm* (*Bemis*, Neenah, WI, EEUU) e incubados *overnight* a 42 °C en recipientes húmedos.

Tras la hibridación, los tejidos se lavaron 4 veces (45 min) en un tampón Tris-HCl (10 mM, pH 7.5) con NaCl (0.6 M) a 60 °C, para la eliminación de uniones inespecíficas. Los tejidos hibridados se expusieron en films *Kodak Biomax-MR* (*Sigma-Aldrich-RBI*) durante 24-72 h con pantallas intensificadoras. Como control de hibridación se incubaron tejidos adyacentes con un exceso (50x) de sondas no marcadas, y la citoarquitectura de las regiones hibridadas se analizó en tejidos adicionales teñidos con violeta de cresilo.

Adicionalmente, tejidos hibridados se sumergieron en emulsión nuclear *Ilford K5* (*Ilford Photo*, Mobberly, CH, Reino Unido) diluida 1:1 en agua a 42 °C. Los tejidos se incubaron en oscuridad durante 15 días a 4 °C, revelados en solución *Kodak D19* (*Kodak*, Rochester, NY, EEUU) durante 5 min y fijados en *Ilford Hypam* (*Ilford Photo*) para la precipitación de la emulsión sobre los tejidos.

II. CUANTIFICACIÓN DE LOS AUTORRADIOGRAMAS

A partir de los films autorradiográficos se obtuvieron fotografías en blanco y negro de cada tejido mediante una cámara *Retiga R1* (*QImaging*, Surrey, Canadá) sobre un transiluminador *Northern Light B95* (*Imaging Research*, St. Catherines, Canadá). Desde las imágenes obtenidas se analizó la hibridación a partir de la densidad óptica relativa de regiones de tamaño uniforme, midiendo su valor gris promedio en la plataforma *Fiji* del software *NIH ImageJ* 1.51s (Schindelin *et al.*, 2012), y sustrayendo el fondo no específico de los films. La densidad óptica se evaluó en 2-3 tejidos adyacentes de cada ratón por duplicado y fue promediada para los obtener valores individuales.

E. INMUNOHISTOQUÍMICA

Para la inmunohistoquímica, los ratones fueron anestesiados y perfundidos transcardíacamente con paraformaldehído (4% en PBS, pH 7.4), durante 15 min a 5 mL/min, mediante una bomba de perfusión *PHD Ultra* (Harvard Apparatus; Holliston, MA, EEUU). Los cerebros se extrajeron y mantuvieron 24 h a 4 °C en la misma solución de PFA 4%, y se transfirieron por soluciones con un gradiente de sucrosa 10-20-30%, durante 24 h cada una, para ser criopreservados por inmersión en isopentano a -35 °C. De los cerebros se obtuvieron secciones coronales de tejido (30 µm) mediante un criostato *Microm HM550-OM*, que se mantuvieron individualmente en tampón fosfato 0.1 M

Para los experimentos de inmunohistoquímica, se emplearon los tejidos obtenidos mediante este método (*free-floating*, Fr-FI), y también los tejidos de 14 µm de grosor recogidos en portaobjetos para los experimentos de ISH (tejido fresco). En los experimentos se siguió el siguiente protocolo: los tejidos se lavaron en PBS y se inactivaron las peroxidasas endógenas incubándolos en metanol 48% y H₂O₂ 1.5%. Después de dos lavados en PBS y PBS con Triton X-100 0.2% (PBST), se incubaron en solución de bloqueo (PBST con gelatina 0.2% y *goat serum* 3%). Tras el bloqueo, los tejidos se incubaron *overnight* a 4 °C con los anticuerpos primarios correspondientes: *mouse anti* (h)-α-Syn (MA1-12874), o *rabbit anti*- TH (ab112) (**Tabla 5**), en una solución de PBST con gelatina 0.2%.

Tras la incubación con los anticuerpos primarios, los tejidos se lavaron en PBST y se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente con los anticuerpos biotinilados correspondientes: *goat anti*- *mouse* (A-10519) o *goat anti*- *rabbit* (BA-1000) (**Tabla 5**). Para finalizar, los tejidos se lavaron en PBST y se incubaron durante 1 h con el complejo avidina-biotina para la reacción histoquímica (*VECTASTAIN Elite ABC HRP Kit, PK-6100*; *Vector Laboratories*, Burlingame, CA, EEUU), para después llevar a cabo la reacción sumergiendo los tejidos en PBS con tetraclorhidrato de 3,3'-diaminobenzidina (DAB, 1%; *Sigma-Aldrich-RBI*) y peróxido de hidrógeno (0.03%). Los tejidos individuales se montaron en portaobjetos tratados con gelatina y cubiertos con el medio de montaje *Entellan* (*Electron Microscopy Sciences*, Hatfield, PA, EEUU); los tejidos obtenidos en portaobjetos se cubrieron con solución Mowiol 4-88 (*Sigma-Aldrich-RBI*). En los experimentos de

inmunohistoquímica se emplearon principalmente tejidos de SNc/VTA entre las coordenadas anteroposteriores -2.46 mm y -3.64 mm. Los tejidos fueron examinados con un microscopio *Nikon Eclipse E1000* (*Nikon*, Tokio, Japón) equipado con una cámara digital (*DXM1200 3.0*, software *ACT-1*, *Nikon*), tomando imágenes con objetivos 10x, 20x y 60x.

En las imágenes obtenidas de los tejidos *free-floating* se contaron automáticamente las células positivas para TH o (h)- α -Syn y la intensidad del marcaje contra (h)- α -Syn a lo largo de 5-6 coordenadas AP de SNc/VTA, mediante una macro semiautomática en el software *ImageJ* para definir el número de células y su área en función del contraste y la intensidad de la reacción inmunohistoquímica.

Por su parte, en las secciones utilizadas en hibridación *in situ* con emulsión y empleadas en la inmunohistoquímica se empleó la misma macro para cuantificar el área ocupada por la emulsión precipitada dentro de las células TH⁺, a lo largo de 3-4 coordenadas AP de SNc/VTA, y se calculó la proporción entre el área de la emulsión y el área de la reacción inmunohistoquímica en cada célula.

F. WESTERN BLOT

Para el análisis por *Western blot* los animales fueron sacrificados, se extrajo el cerebro y utilizando una matriz de cerebro de ratón (*RBM-2000C*; *ASI Instruments*, Warren, MI, EEUU) se obtuvieron secciones coronales de 2 mm de grosor para diseccionar la SNc/VTA. Las muestras de tejido se congelaron a -80 °C y se homogeneizaron por ultrasonidos (*Labsonic M Ultrasonic Homogenizer*; *Sartorius AG*, Göttingen, Alemania) en tampón RIPA (Tris-Base 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 5 mM, desoxicolato de sodio 1%, SDS 0.1% y Triton X-100 1%) con inhibidores de proteasas (*Complete Protease*; *Roche*, Indianapolis, IN, EEUU). Las muestras se centrifugaron a 12000 G (4 °C, 10 min) y se cuantificó la concentración de proteína en los sobrenadantes mediante un kit de análisis *Pierce BCA* (*Thermo Fisher Scientific*).

Para la electroforesis se añadieron 30 µg de cada muestra en proporción 3:1 con tampón de carga (*Laemmli Sample buffer*; *Bio-Rad*, Hercules, CA, EEUU) con β-mercaptoetanol 10%, y se incubaron a 95 °C durante 5 min. A continuación, cada muestra se cargó en un gel de acrilamida 6-14% (*Bio-Rad*); la entrada en el gel se efectuó con una corriente de 70 V durante 20 min seguida de la separación a 120 V durante 60 min. Por último, las proteínas separadas se transfirieron desde el gel de acrilamida a membranas de nitrocelulosa (0.2 µm), durante 90 min a 400 mA.

Tras la transferencia, las membranas se bloquearon durante 2 h con 5% de seroalbúmina bovina (BSA) en TBST (Tris 20 mM y NaCl 150 mM con Tween-20 0.1%) y se incubaron con los anticuerpos primarios correspondientes: *rabbit* anti- γ-Syn (ab55424) o *mouse* anti- β-actina (A3854) (**Tabla 5**), *overnight* a 4 °C. Posteriormente, se incubaron con los anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa (HRP) (*donkey* anti-*rabbit*, NA934), durante 2 h a temperatura ambiente en solución de bloqueo. La detección se llevó a cabo por quimioluminiscencia mediante un kit de sustrato *SuperSignal Chemiluminiscense ECL* (*Thermo Fisher Scientific*) y se tomaron imágenes mediante el sistema *Chemidoc Imaging* (*Bio-Rad*) que se analizaron en el software *ImageLab* (*Bio-Rad*).

Tabla 5. Anticuerpos primarios y secundarios empleados para la detección de proteínas por inmunohistoquímica y *Western blot*.

ANTICUERPO	CONJUGACIÓN	REFERENCIA	DILUCIÓN	TÉCNICA
Anti- γ-Syn	-	<i>Abcam</i> – ab55424	1:500	WB
Anti- (h)-α-Syn	-	<i>Thermo</i> – MA1-12874	1:1000	IHC (Fr-Fl)
Anti- TH	-	<i>Abcam</i> – ab112	1:5000	IHC (Fr-Fl) IHC (fresco)
Anti- β-actina	HRP	<i>Sigma</i> – A3854	1:25000	WB
Anti- Rabbit	HRP	<i>Sigma</i> – NA934	1:10000	WB
Anti- Rabbit	Biotina	<i>Vector</i> – BA-1000	1:500	IHC (Fr-Fl) IHC (fresco)
Anti- Mouse	Biotina	<i>Thermo</i> – A-10519	1:200	IHC (Fr-Fl)

G. FÁRMACOS Y REACTIVOS

Todos los reactivos empleados fueron de grado analítico y obtenidos de *Merck KGaA* (Darmstadt, Alemania). Durante los experimentos de microdiálisis intracerebral se emplearon los siguientes fármacos:

- **Veratridina** (#2918; *Tocris Bioscience*, Madrid, España): agente despolarizante que mantiene abiertos los canales de sodio.
- **Nomifensina maleato** (N1530; *Sigma-Aldrich-RBI*, Madrid, España): inhibidor de los transportadores de DA y noradrenalina (DAT y NAT).
- **D-Anfetamina sulfato** (#2813; *Tocris Bioscience*): inhibidor de los transportadores DAT y liberador de DA.
- **Dopamina clorhidrato** (H8502; *Sigma-Aldrich-RBI*): empleado como patrón estándar en el análisis HPLC con detección electroquímica.
- **Ácido 3,4-dihidroxifenilacético** (#850217; *Sigma-Aldrich-RBI*): empleado como patrón estándar en el análisis HPLC con detección electroquímica.

Las soluciones concentradas de los fármacos (1 mM) fueron preparadas en LCR artificial (excepto veratridina, en DMSO), ajustadas a pH 6.5-7 con NaHCO₃ en caso necesario y almacenadas a -30 °C. Para comprobar los efectos de los fármacos, las soluciones de trabajo se prepararon diariamente por su dilución en LCR artificial a las concentraciones indicadas a continuación, y administradas localmente por diálisis reversa.

H. MICRODIÁLISIS INTRACEREBRAL

La concentración extracelular de DA se midió por microdiálisis intracerebral *in vivo*. Para ello, en los ratones fueron anestesiados y colocados en un sistema estereotáxico para implantar ipsilateralmente una sonda concéntrica de diálisis con una membrana de *Cuprophane* (1.5-2 mm, límite de poro de 6 kDa). Las sondas se implantaron en el cuerpo estriado (CPu; coordenadas en mm: AP: +0.5; ML: -1.7; DV: -4.5) o la corteza prefrontal medial (mPFC; coordenadas en mm: AP: +2.2; ML: -0.2; DV: -3.4) y fueron fijadas con cemento dental *TAB2000*.

Alternativamente, en ratones implantados con minibombas osmóticas, durante la cirugía también se implantó una cánula guía en el CPu (coordenadas en mm: AP: +0.5; ML: -1.7; DV: -2.8), en la que se insertó una cánula falsa para evitar la contaminación. El día anterior a la microdiálisis los ratones fueron ligeramente anestesiados y la cánula falsa se sustituyó por una sonda de microdiálisis CMA7 con una membrana de *Cuprophan* (2 mm, límite de poro de 6 kDa) (*Harvard Apparatus*, Holliston, MA, EEUU).

Los experimentos de microdiálisis se llevaron a cabo 24-48 h después de la implantación de la cánula en ratones en movimiento libre. Inicialmente, los ratones recibieron LCR artificial a un flujo de 1.5 $\mu\text{L}/\text{min}$ mediante bombas de infusión SP220i (*World Precision Instruments*, Sarasota, FL, EEUU), recogiendo fracciones de líquido dializado de 20 min a las que se añadían 5 μL de ácido perclórico 10 mM para evitar la oxidación de la DA. Después del periodo de obtención de las muestras basales de dializado, se siguió el siguiente esquema de infusión de fármacos por diálisis reversa:

- **Veratridina:** 7 fracciones con LCR + DMSO 1%; 1 fracción con veratridina (50 μM); 7 fracciones con LCR + DMSO 1%.
- **Nomifensina:** 6 fracciones con LCR; 6 fracciones con nomifensina (10 μM); 6 fracciones con nomifensina (50 μM).
- **Anfetamina:** 6 fracciones con LCR; 6 fracciones con anfetamina (10 μM); 6 fracciones con anfetamina (100 μM).

La concentración de DA se determinó por cromatografía líquida de alta precisión (HPLC) con detección electroquímica amperométrica con un potencial de oxidación de +0.75 V (autoinyector *Waters 717 plus* / detector *Waters 2465*; Milford, MA, EEUU) y un límite de detección de 3 fmol. Se empleó una fase móvil con 150 mM NaH_2PO_4 , 0.9 mM PIC B8 y 0.5 mM EDTA (pH 2.8 ajustado con ácido ortofosfórico), bombeando metanol 10% a 1 mL/min (bomba *Waters 515*). La DA se separó en una columna *Kinetex C18* con un tamaño de partícula de 2.6 μm (7.5 x 0.46 cm; *Phenomenex*, Torrance, CA, EEUU), a 28 °C. Los niveles basales de DA se calcularon como la media de las muestras basales anteriores a la administración de fármacos.

I. PRUEBAS CONDUCTUALES

Los análisis conductuales se llevaron a cabo en el modelo de sobreexpresión de γ -Syn inducido por AAV10 a diferentes tiempos post-inyección (4, 8 y 16 semanas), en ambos modelos transgénicos y en el modelo de silenciamiento crónico de α -Syn inducido por IND-1233-ASO en el modelo α Syn*A30P*A53T después de 28 días de administración i.c.v. Todos los ratones pasaron por las diferentes pruebas en el siguiente orden: test de campo abierto, test del cilindro, test *RotaRod*, test de reconocimiento de objetos novedosos, test de la caja de luz-oscuridad, test de evitación pasiva, test de suspensión por la cola y test del laberinto acuático de Morris. Las pruebas se realizaron entre las 8:00 A.M. y las 03:00 P.M. y con un intervalo de 24 h entre cada test. Los ratones se llevaron a una habitación ligeramente iluminada para su habituación durante al menos 1 h antes del inicio de la prueba, y entre cada ratón se limpiaron los equipos con agua para evitar interferencias olfativas. Los tests se llevaron a cabo según los siguientes protocolos:

- **Test de campo abierto:** la actividad motora se evaluó en una caja abierta de *Plexiglas* (35x35x40 cm), iluminada indirectamente (25-40 lux); la base de las cajas se cubrió con un plástico opaco intercambiable. Cada ratón se situó en el centro del campo y se registró su actividad durante 15 minutos con una cámara digital (*Videotrack*; *ViewPoint*, Lyon, Francia). Posteriormente se midió la distancia total recorrida (cm), la duración de los movimientos rápidos (>10.5 cm/s) y lentos (3-10.5 cm/s), la velocidad media (cm/s) y el tiempo de reposo (s).
- **Test del cilindro:** la asimetría motora se evaluó en un cilindro transparente acrílico (15x27 cm), contabilizando manualmente el número de contactos con cada pata delantera sobre la pared del cilindro durante 5 minutos. Posteriormente se calculó la proporción del uso de la pata contralateral a la inyección respecto a los ratones administrados con vehículo (Park *et al.*, 2016).
- **Test *RotaRod*:** la coordinación y el equilibrio motor se evaluaron en un sistema *RotaRod* acelerado (*Panlab*, Barcelona, España). Los ratones se situaron en la barra rotatoria en sentido opuesto a la rotación y se entrenaron previamente durante 3 intentos a velocidad constante (0-4-4 rpm), resituándolos nuevamente tras las caídas. Al cabo de 1 h tras el entrenamiento se procedió a una prueba con

aceleración constante (de 4 a 40 rpm durante 5 min), en dos intentos consecutivos, midiendo automáticamente la latencia hasta la caída y la máxima velocidad alcanzada (Marazziti *et al.*, 2004).

- **Test de evitación pasiva:** la memoria condicionada por miedo se evaluó en un sistema de evitación pasiva (*passive avoidance test*) con un compartimento iluminado intensamente (400 lux) y uno oscuro. En la fase de pre-test, los ratones se situaron en la cámara iluminada, con la oportunidad para escapar a la cámara oscura por una abertura. Tras el escape, la puerta se cerró y se aplicó un choque eléctrico corto desde el suelo de la cámara (25 V, 2 s), dejando reposar a los ratones durante 20 s antes de extraerlos. Después de 24 h, los ratones se situaron nuevamente en la cámara iluminada con la vía de escape abierta durante 2 min. Las latencias de escape se midieron en ambas sesiones y se calculó la memoria a corto plazo como la diferencia de tiempo entre el escape en el pretest y el test ($t_{test} - t_{pretest}$) (Kumar *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2016).
- **Test de la caja de luz/oscuridad:** el comportamiento de tipo ansioso se midió mediante un sistema de luz/oscuridad, con dos cajas cuadradas (27x21 cm) conectadas por una abertura de 7x10 cm, una de ellas negra y débilmente iluminada por una bombilla roja (25 W) y otra blanca y fuertemente iluminada desde 30 cm de distancia (60 W, 400 lux). Al principio del test los ratones se situaron en el centro de la caja oscura, y se registró su actividad durante 5 min midiendo el tiempo en cada área, la latencia hasta la primera entrada a la caja iluminada y el número de transiciones (Schulte-Herbrüggen *et al.*, 2012; Moraga-Amaro *et al.*, 2014).
- **Test de suspensión por la cola:** el comportamiento depresivo se midió suspendiendo a los ratones a 30 cm de la superficie, mediante una cinta adhesiva a 1 cm del final de la cola. Durante la prueba se midió el tiempo de inmovilidad a lo largo de 6 min. El test fue grabado en vídeo para su revisión posterior por un observador independiente (Ferrés-Coy *et al.*, 2016).

- **Test de reconocimiento de objetos novedosos:** la memoria a corto plazo se midió en una caja de Plexiglas (35 cm de diámetro), iluminada indirectamente (25-40 lux). Tras de 3 sesiones de habituación de 10 min en el campo vacío durante 3 días consecutivos, los ratones se expusieron a dos objetos idénticos durante 10 min. Después de 24 h, uno de los objetos se intercambió por otro del mismo tamaño, pero forma, color y textura diferentes. En cada sesión con objetos se midió el tiempo de exploración hacia cada objeto y se midió el índice de discriminación como la diferencia de tiempo de exploración de cada objeto respecto al tiempo total ($(t_{\text{novedoso}} - t_{\text{familiar}}) / t_{\text{total}}$) (Kokhan *et al.*, 2013).

- **Test del laberinto acuático de Morris:** el aprendizaje espacial se evaluó en una piscina de 1 m de diámetro con agua a 24 ± 1 °C teñida con látex blanco no tóxico. Se colgaron cuatro objetos marcadamente diferentes en los cuatro puntos cardinales como referencia, y se situó una plataforma circular blanca de 10 cm de diámetro a 1.5 cm bajo el agua, siempre en el cuadrante entre los mismos dos objetos. Las rutas de movimiento se registraron automáticamente con una cámara cenital (*Smart Video Tracking; Panlab, Barcelona, España*) y se midió el tiempo hasta alcanzar la plataforma (latencia de escape). Los ratones se sometieron a 4 pruebas por día durante 5 días consecutivos; los ratones fueron situados en la piscina desde puntos de entrada aleatorios se permitió que nadaran hasta encontrar la plataforma o por un total de 1 min, y si no eran capaces de encontrarla se les situaba sobre ella manualmente, dejándolos en ella durante 30 s. Durante la sesión final, después del entrenamiento, se quitó la plataforma y se midió el tiempo nadando en el cuadrante correspondiente. Se midió la latencia de escape durante las sesiones de aprendizaje, junto al tiempo transcurrido en cada cuadrante en la sesión final sin la plataforma (Pothakos *et al.*, 2009).

J. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los resultados se expresan como la media \pm el error estándar de la media (SEM). El número de ratones utilizados para cada tipo experimento corresponde al mínimo número de animales para lograr significancia estadística, basándose en la experiencia del grupo con las metodologías utilizadas en la presente tesis. Por lo tanto, para hibridación *in situ*, inmunohistoquímica y WB se utilizaron n=5/6 ratones por grupo; para microdiálisis intracerebral, n=6 ratones por grupo, y para las pruebas de comportamiento se utilizaron n=10-15 ratones por grupo. Los datos obtenidos se han analizado mediante el software *GraphPad Prism 7* (San Diego, CA, EEUU), usando según corresponda la prueba *t* de Student de dos colas o el test ANOVA de una o dos vías, con los análisis *post hoc* mediante el test de múltiples comparaciones de Tukey o las correcciones de Bonferroni o Sidak. Las diferencias se han considerado significativas en un valor $P < 0.05$.

TRABAJO 1

MODULACIÓN DE LOS NIVELES ENDÓGENOS DE γ -SINUCLEÍNA EN MODELOS DE RATÓN

1. DISTRIBUCIÓN DE γ -SINUCLEÍNA EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

Primero, nosotros caracterizamos la expresión de γ -Syn en diferentes áreas cerebrales de ratón *wild-type* (WT) mediante hibridación *in situ*. El transcrito de γ -Syn se localiza selectivamente en los **núcleos monoaminérgicos**, incluyendo SNc/VTA, núcleos del rafe dorsal y medial (DR y MnR) y *locus coeruleus* (LC). Además, también se localiza en los núcleos laterales de la habénula, que regulan la actividad de las neuronas monoaminérgicas (Aizawa *et al.*, 2013; Lecca *et al.*, 2014). Por otra parte, se detecta una expresión leve del mRNA de γ -syn en otras áreas cerebrales como el núcleo septal medial, el hipotálamo o la sustancia gris periacueductal, mientras que está ausente en otras regiones subcorticales y en áreas corticales (**Figura 16A**).

Este patrón contrasta con la expresión de α -Syn, analizada en secciones de cerebro adyacentes (**Figura 16B**). Así, el transcrito de α -Syn se expresa de manera mucho más abundante en la mayoría de regiones cerebrales como las cortezas prefrontal medial, cingulada, motora, entorrinal o cerebelar, el hipocampo, el cuerpo estriado, el núcleo *accumbens* o los núcleos monoaminérgicos.

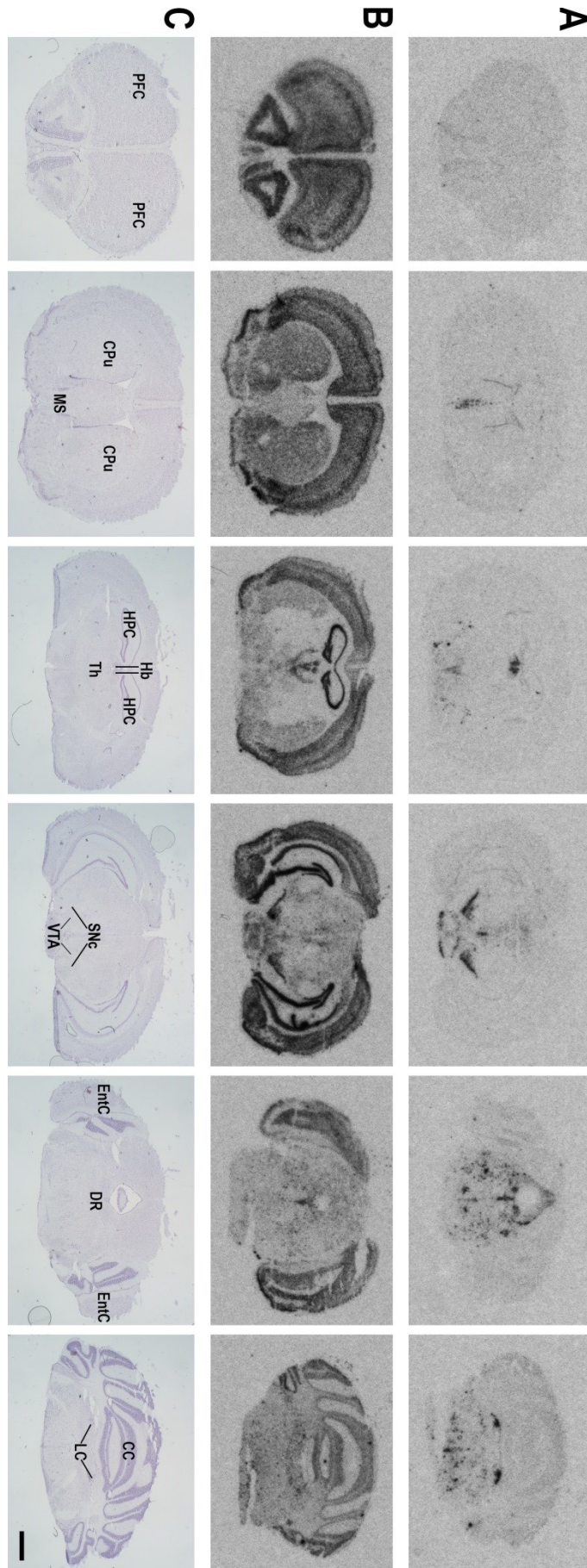


Figura 16. Patrón de expresión de γ -Syn y α -Syn en el cerebro de ratón. Autorradiografía de secciones coronales de cerebro de ratón mostrando la distribución del transcrito de γ -Syn (A) y α -Syn (B), evaluado por ISH. Escala: 1 mm. C) Secciones adyacentes de cerebro de ratón mostrando la citoarquitectura cerebral con tinción de violeta de cresilo: PFC = corteza prefrontal; CPu = caudado putamen; MS = núcleo septal medial; HPC = hipocampo; Hb = núcleos de la habénula; Th = tálamo; SNc = *substantia nigra compacta*; VTA = área tegmental ventral; EntC = corteza entorrinal; DR = núcleo dorsal del rafe; CC = corteza cerebelar; LC = *locus coeruleus*.

Del mismo modo, también analizamos la expresión de β -Syn en los núcleos monoaminérgicos, y se observó que se expresa de forma casi ubicua en todas las regiones analizadas (**Figura 17**).



Figura 17. Patrón de expresión de β -Syn en los núcleos monoaminérgicos del cerebro de ratón. Autorradiografía de secciones coronales de cerebro de ratón mostrando la distribución del transcrito de β -Syn en SNc/VTA, DR y LC, evaluado por ISH. Escala: 1 mm.

2. MODELO DE SOBREEXPRESIÓN DE γ -SINUCLÉINA EN NEURONAS DOPAMINÉRGICAS DE LA SNc/VTA INDUCIDO POR UN VECTOR VÍRICO ADENOSOCIADO

Para el desarrollo del modelo de sobreexpresión de la γ -Syn de ratón se diseñó un vector adenoasociado AAV10 con el promotor de CMV y con el cDNA de la forma murina de γ -Syn, como se ha descrito en *Materiales y Métodos*. Previamente se evaluaron diferentes serotipos víricos (AAV5, AAV9 y AAV10) expresando GFP (*green fluorescent protein*) para elegir el constructo que presentara una mayor capacidad de expresión en las células de la SNc/VTA según su especificidad y eficiencia.

A. SOBREENPRESIÓN DE γ -SINUCLEÍNA EN LA SNc/VTA

En primer lugar, se examinó el **patrón temporal de la sobreexpresión de γ -Syn** en las neuronas DA utilizando el constructo AAV10-CMV- γ -Syn. Para ello, el vector se inyectó unilateralmente en la SNc/VTA de ratones y éstos fueron sacrificados en las semanas 1, 4, 8 y 16 post-inyección (a partir de aquí referidas como 1W, 4W, 8W y 16W). Mediante ISH, se detectó un incremento progresivo de la expresión de γ -Syn en la SNc/VTA: $143.8 \pm 7.4\%$ (1W), $175.5 \pm 9.8\%$ (4W), $184.1 \pm 4.9\%$ (8W) y $193.0 \pm 9.6\%$ (16W), respecto al hemisferio contralateral (**Figura 18A-B**). El análisis estadístico ANOVA de 1 vía seguido del test *post hoc* de Tukey revela un efecto de grupo ($F_{(4,17)}=25.18$, $p<0.001$), con un aumento significativo en los ratones AAV10 en comparación con los inyectados con vehículo (PBS) (1W: $p=0.0019$; 4-8-16W: $p<0.0001$). El análisis también indicó diferencias estadísticas en el aumento de la expresión de γ -Syn entre los grupos 4, 8 y 16W comparados con el grupo 1W (4W: $p=0.0472$; 8W: $p=0.0283$; 16W: $p=0.0073$).

A continuación, se evaluó la **localización celular de la sobreexpresión del mRNA de γ -Syn**. Para ello, se realizó un estudio de colocalización del transcrito de γ -Syn en las células TH⁺ de la SNc/VTA combinando ISH con emulsión fotográfica e inmunohistoquímica, llevándolo a cabo en el grupo de 4W y sus respectivos controles. Se detectó un aumento de la densidad de transcrito de γ -Syn en las células TH⁺, del $166.5 \pm 20.8\%$ respecto al hemisferio contralateral, mientras que la densidad del transcrito en el hemisferio ipsilateral en el grupo control fue igual que la del hemisferio contralateral ($100.0 \pm 14.8\%$) (**Figura 18C-D**). En comparación con los ratones inyectados con vehículo, el test *t* de Student revela una diferencia significativa entre ambos grupos ($t=3.194$, $p=0.0187$).

Por otro lado, no se detectó pérdida del número de células TH⁺ en la SNc/VTA en el hemisferio ipsilateral respecto al contralateral de los ratones inyectados con AAV10 ($114.3 \pm 16.0\%$), en comparación con el grupo control ($99.9 \pm 16.0\%$) (**Figura 18E**). El análisis ANOVA de 2 vías seguido del test *post hoc* de Tukey no muestra ninguna diferencia significativa entre grupos en el número de células, ni por efecto de la inyección del vector AAV10 ($F_{(1,8)}=1.911$, $p=0.2042$), entre hemisferios ($F_{(1,8)}=0.3984$, $p=0.5455$) o por interacción grupo-hemisferio ($F_{(1,8)}=0.4105$, $p=0.5396$).

Además, un número variable de células no positivas para TH también fueron ocupadas por el vector AAV10, observando en ellas la sobreexpresión del transcrito de γ -Syn, tanto en la región de la SNc/VTA como en zonas adyacentes como la formación reticular, el núcleo parabraquial o el campo prerubral.

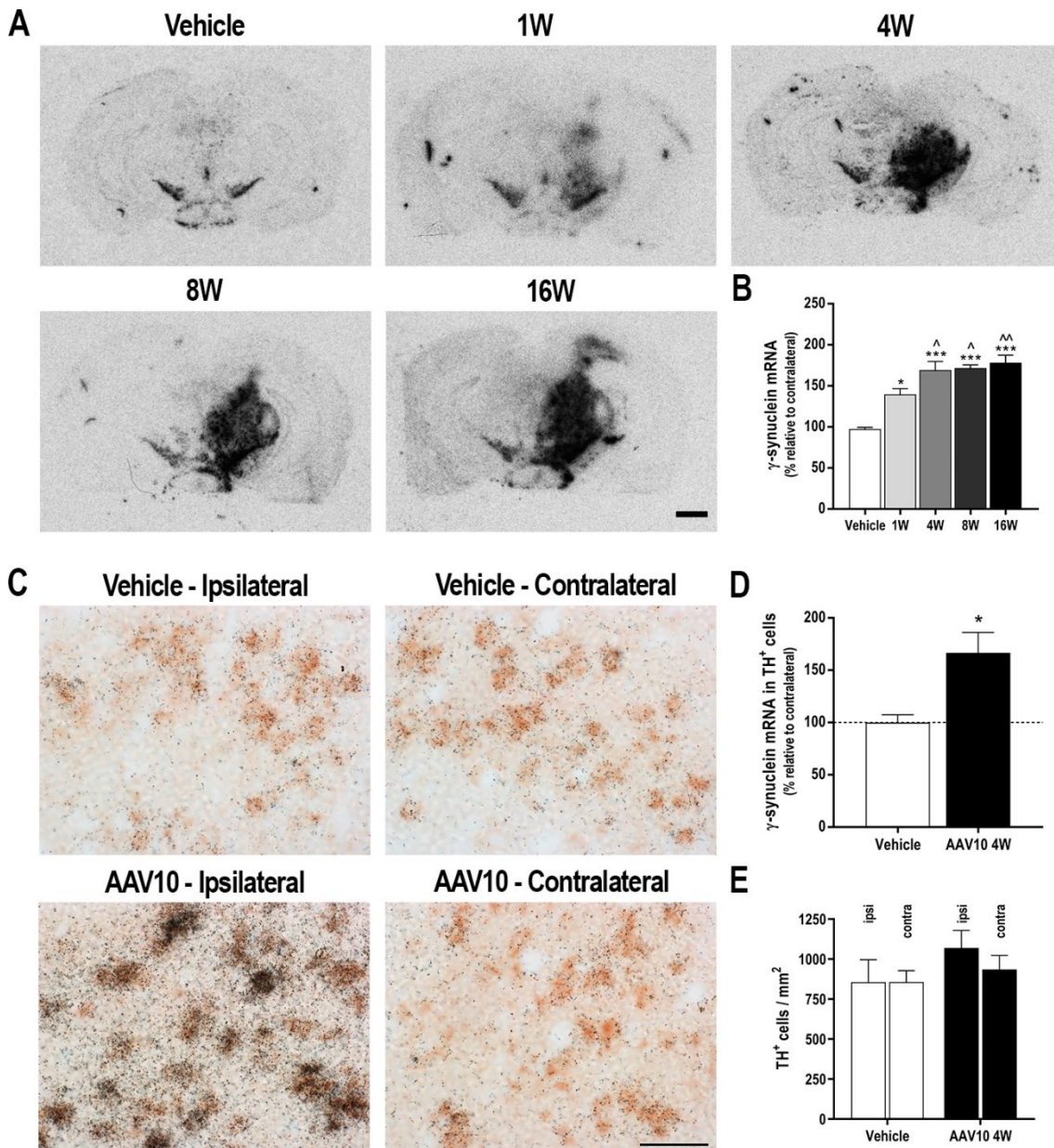


Figura 18. Sobreexpresión del mRNA de γ -Syn endógena inducida por AAV10 en la SNc/VTA. A) Autorradiografía de secciones coronales de cerebro de ratón mostrando incrementos progresivos de los niveles del transcrito de γ -Syn en la SNc/VTA de ratones AAV10, evaluados por ISH. Escala: 1 mm. B) Cuantificación densitométrica de la sobreexpresión del transcrito de γ -Syn en la SNc/VTA, en relación al hemisferio contralateral. Las barras muestran un aumento significativo de los niveles de expresión de γ -Syn en comparación con el grupo control.

C) Imágenes de microscopía óptica mostrando la expresión del mRNA de γ -Syn (identificada utilizando una sonda marcada con ^{33}P y mostrada como puntos negros en la imagen) en las células TH⁺ de la SNc/VTA. Escala: 50 μm . **D)** Cuantificación de la densidad intracelular del transcrito de γ -Syn en las células TH⁺ en relación al área total de la célula. **E)** Cuantificación de la cantidad de células TH⁺ por mm^2 en ambos hemisferios de la SNc/VTA. Los valores representan la media \pm SEM, n=5-6 ratones/grupo. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ comparado con los ratones inyectados con vehículo; ^ $p < 0.05$, ^^ $p < 0.01$ comparado con el grupo 1W.

Para comprobar la especificidad de la sobreexpresión, en los ratones inyectados con AAV10- γ -Syn también evaluamos la expresión del transcrito de α -Syn en la SNc/VTA. Siguiendo la misma metodología, mediante ISH no se observaron cambios entre ambos hemisferios de los ratones AAV10 en ninguno de los tiempos post-inyección (1W: $98.5 \pm 4.5\%$; 4W: $102.8 \pm 3.0\%$; 8W: $103.1 \pm 7.3\%$; 16W: $97.7 \pm 3.3\%$) (**Figura 19A,D**), y comparándolos con el grupo control no se apreciaron diferencias estadísticas en ningún tiempo post-inyección mediante el test ANOVA de 1 vía ($F_{(4,20)}=1.027$, $p=0.4174$).

Del mismo modo, en los ratones con sobreexpresión también se examinó la expresión del transcrito de γ -Syn en el DR, donde no se detectaron cambios significativos en ningún grupo AAV (1W: $105.2 \pm 6.9\%$; 4W: $102.9 \pm 2.9\%$; 8W: $112.4 \pm 4.0\%$; 16W: $108.2 \pm 0.7\%$) (**Figura 19B,E**). Igualmente, la expresión del mRNA de γ -Syn tampoco cambió en el LC entre ambos hemisferios (1W: $95.3 \pm 2.1\%$; 4W: $100.3 \pm 1.9\%$; 8W: $100.0 \pm 7.9\%$; 16W: $96.1 \pm 2.4\%$) (**Figura 19C,F**). Mediante el análisis ANOVA de 1 vía no se revelaron cambios estadísticos en la expresión de γ -Syn, comparando los grupos con diferentes tiempo post-inyección y los respectivos controles (DR: $F_{(4,21)}=0.3816$, $p=0.8192$; LC: $F_{(4,19)}=0.8205$, $p=0.5280$).

Además del análisis de la expresión de γ - y α -Syn, también se estudió el nivel de **expresión del transportador DAT** en la SNc/VTA del modelo de sobreexpresión, en el grupo 4W post-inyección. No se detectaron cambios en la expresión del mRNA en la SNc/VTA del hemisferio ipsilateral respecto al contralateral en los ratones con sobreexpresión, en comparación con el grupo inyectado con vehículo ($97.4 \pm 9.8\%$) (**Figura 20**). El test *t* de Student no mostró diferencias estadísticas en la expresión de DAT entre ambos grupos ($t=0.2674$, $p=0.7959$).

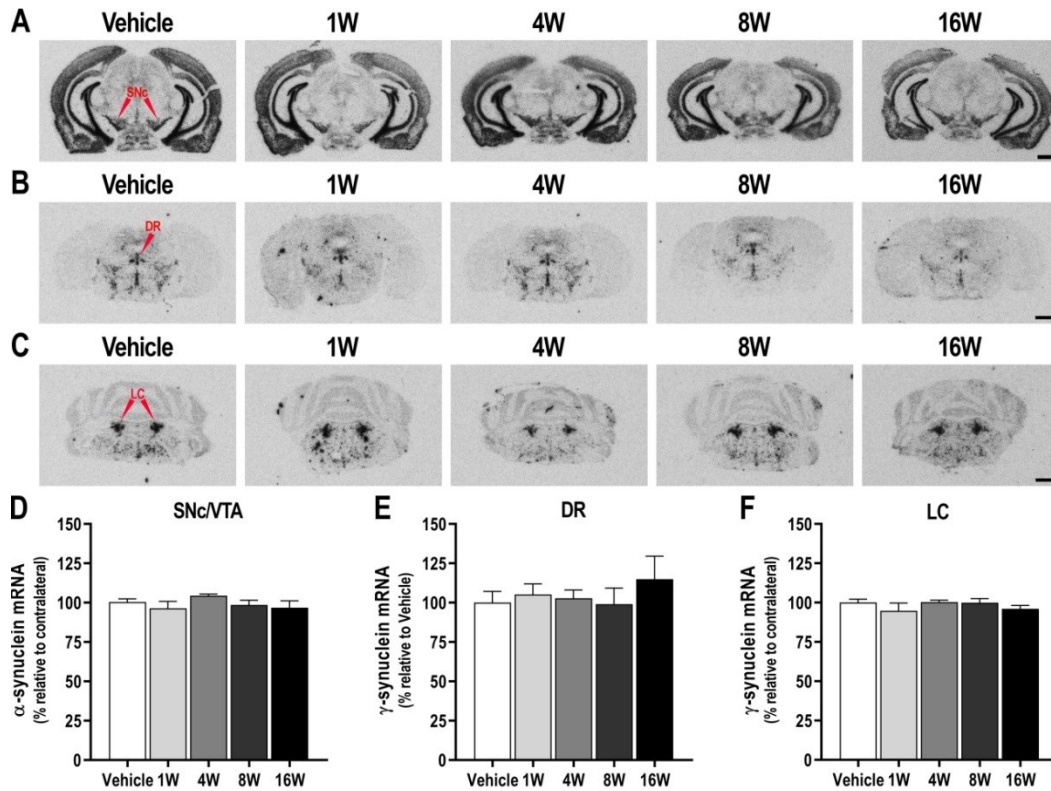


Figura 19. Autorradiografía de secciones coronales de cerebro de ratón mostrando la expresión del transcrito de α -Syn en la SNC/VTA (A) y del transcrito de γ -Syn en el DR (B) y el LC (C) en el modelo de sobreexpresión AAV10. Escala: 1 mm. D) Cuantificación densitométrica de los niveles de transcrito de α -Syn en la SNC/VTA. E,F) Cuantificación densitométrica de los niveles de transcrito de γ -Syn en el DR y el LC, respectivamente. No se encontraron diferencias en ningún tiempo post-inyección. Los valores representan la media \pm SEM, n=5-6 ratones/grupo.

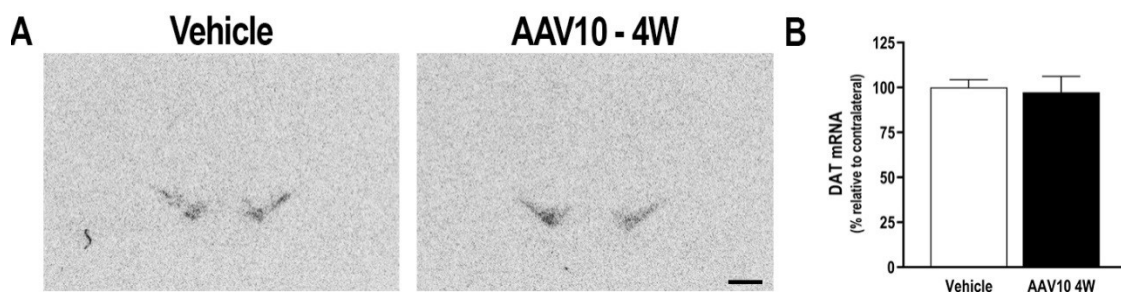


Figura 20. Niveles de expresión de DAT en el modelo AAV10, a 4W post-inyección. A) Autorradiografía de secciones coronales de cerebro de ratón mostrando la expresión del transcrito de DAT en la SNC/VTA, mediante ISH. Escala: 1 mm. B) Cuantificación densitométrica de los niveles de transcrito de DAT. No se encontraron diferencias entre el grupo AAV10 a las 4 semanas y el grupo control. Los valores representan la media \pm SEM, n=5-6 ratones/grupo.

En paralelo al aumento de los niveles de mRNA de γ -Syn, también detectamos incrementos de los **niveles de proteína γ -Syn** en la SNc/VTA mediante *Western blot*. La densidad del inmunoblot para γ -Syn fue cuantificada en la SNc/VTA de ratones AAV10 a 4W post-inyección y ésta mostró un aumento significativo de los niveles de γ -Syn en el lado ipsilateral comparado con el lado ipsilateral de los ratones inyectados con vehículo ($154.5 \pm 14.7\%$ (**Figura 21A,C**). El análisis estadístico utilizando el test *t* de Student mostró un aumento significativo en comparación con el grupo control ($t=3.705$, $p=0.0005$).

Por otro lado, también se analizaron los niveles de la proteína α -Syn endógena en la SNc/VTA de los mismos ratones con sobreexpresión de γ -Syn. En este caso, la densidad del inmunoblot para α -Syn en los ratones con sobreexpresión no mostró diferencias respecto al grupo control ($117.0 \pm 18.2\%$) (**Figura 21B,D**). El análisis estadístico mediante el test *t* de Student no mostró diferencias en los niveles de α -Syn entre ambos grupos ($t=0.9290$, $p=0.3630$).

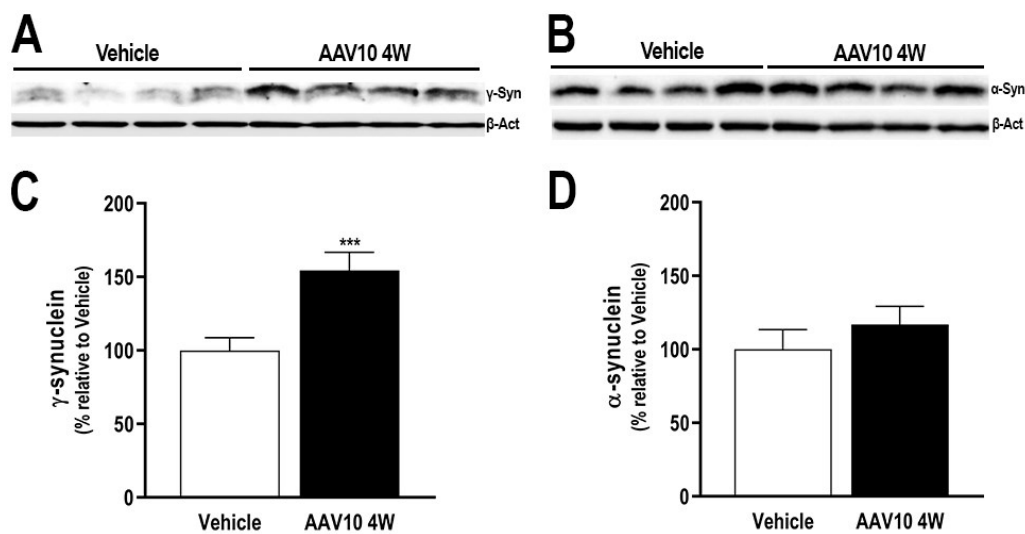


Figura 21. Niveles de las proteínas γ -Syn y α -Syn en la SNc/VTA de ratones con sobreexpresión de γ -Syn endógena inducida por AAV10 a 4W. A,B) Inmunoblot contra γ -Syn y α -Syn, respectivamente, a las 4W post-inyección con el vector AAV10, utilizando β -actina como *house-keeping*. C) Cuantificación densitométrica de los niveles de proteína γ -Syn en la SNc/VTA, utilizando β -actina como *house-keeping*. D) Cuantificación densitométrica de los niveles de proteína α -Syn en la SNc/VTA, utilizando β -actina como *house-keeping*. Los valores representan la media \pm SEM, $n=5$ ratones/grupo. *** $p<0.001$ comparado con el grupo inyectado con vehículo.

B. CONSECUENCIAS DE LA SOBREENPRESIÓN DE γ -SINUCLEÍNA SOBRE LA NEUROTRANSMISIÓN DA

Posteriormente, examinamos si la sobreexpresión de γ -Syn en la SNc/VTA se asocia con cambios en la neurotransmisión DA cortical y subcortical. Para ello, se evaluó la liberación y concentración extracelular de DA en mPFC y CPu de ratones en libre movimiento a 4W post-inyección, utilizando microdiálisis intracerebral. La **concentración basal de DA** extracelular en mPFC y CPu no mostró diferencias entre los grupos AAV10 y control en ninguna de las condiciones utilizadas (**Tabla 6**). El análisis *t* de Student indicó que no hay diferencias estadísticas en la mPFC (LCR: $t=0.9420$, $p=0.3684$; LCR+DMSO: $t=1.453$, $p=0.1768$) ni el CPu (LCR: $t=1.189$, $p=0.2618$; LCR+DMSO: $t=1.573$, $p=0.1502$).

Tabla 6. Niveles basales de DA extracelular en mPFC y CPu evaluados por microdiálisis intracerebral en el modelo de sobreexpresión por AAV10- γ -Syn.

GRUPO	CONDICIONES	DA BASAL (mPFC)	DA BASAL (CPU)
Vehículo	LCR	21.6 ± 3.3 (n=6)	8.1 ± 2.3 (n=6)
	LCR + DMSO 1%	25.4 ± 2.9 (n=6)	13.6 ± 2.3 (n=6)
AAV10 (4W)	LCR	18.2 ± 1.4 (n=6)	13.1 ± 3.5 (n=6)
	LCR + DMSO 1%	20.3 ± 2.0 (n=6)	8.0 ± 2.3 (n=6)

Los valores representan la media de los valores basales ± SEM, expresados en fmol DA por fracción dializada de 20 min. La *n* indica el número de ratones utilizados en cada caso.

Evaluando la **neurotransmisión DA en el CPu**, la infusión veratridina (50 μ M, agente despolarizante) por diálisis reversa aumentó los niveles extracelulares de DA un ~3940% en los ratones inyectados con vehículo, respecto a los niveles basales; por su parte, en los ratones con sobreexpresión la concentración de DA aumentó un ~1606% respecto a los valores basales (**Figura 22A**). El análisis ANOVA de 2 vías seguido del test *post hoc* de Bonferroni no revela una diferencia significativa por efecto de grupo ($F_{(1,9)}=3.352$, $p=0.1003$), pero sí se detectan diferencias por efecto del tiempo ($F_{(15,135)}=25.72$, $p<0.0001$) y por la interacción grupo-tiempo ($F_{(15,135)}=4.980$, $p<0.0001$).

Por otra parte, la administración local de nomifensina (1-10-50 μ M, inhibidor selectivo DAT/NET) aumentó de manera dosis-dependiente la concentración extracelular de DA en

CPu. En el grupo control, el aumento frente a cada dosis de fármaco fue del 338–519–909% respecto a los valores basales; por otra parte, el aumento en los ratones AAV10 fue menos pronunciado, de 133–300–411% respectivamente (**Figura 22B**). El análisis ANOVA de 2 vías mostró una diferencia significativa por efecto de grupo ($F_{(1,10)}=7.033$, $p=0.0242$), por tiempo ($F_{(19,190)}=16.16$, $p<0.0001$) y por interacción grupo–tiempo ($F_{(19,190)}=3.155$, $p<0.0001$).

Además, también se evaluaron los efectos de la sobreexpresión de la γ -Syn endógena sobre la **neurotransmisión DA en la mPFC**. La administración local de veratridina (50 μ M) incrementó la liberación de DA cortical en ambos grupos experimentales, alcanzado niveles de ~185% y ~162% en el grupo control y AAV10, respectivamente (**Figura 22C**). El análisis ANOVA de 2 vías no mostró diferencias significativas por efecto de grupo ($F_{(1,8)}=0.8183$, $p=0.3921$), ni por interacción grupo–tiempo ($F_{(15,120)}=0.8920$, $p=0.5746$), aunque sí por efecto de tiempo ($F_{(15,120)}=8.254$, $p<0.0001$).

La administración de nomifensina (10-50 μ M) produjo un aumento dosis-dependiente de la concentración extracelular de DA cortical (206–259%) en el grupo control; sin embargo, este efecto estuvo ausente en el grupo AAV10 (125–121%) (**Figura 22D**). El ANOVA de 2 vías mostró una diferencia significativa por efecto de grupo ($F_{(1,6)}=8.958$, $p=0.0242$), por tiempo ($F_{(17,102)}=4.664$, $p<0.0001$) y por interacción grupo–tiempo ($F_{(17,102)}=3.033$, $p=0.0003$).

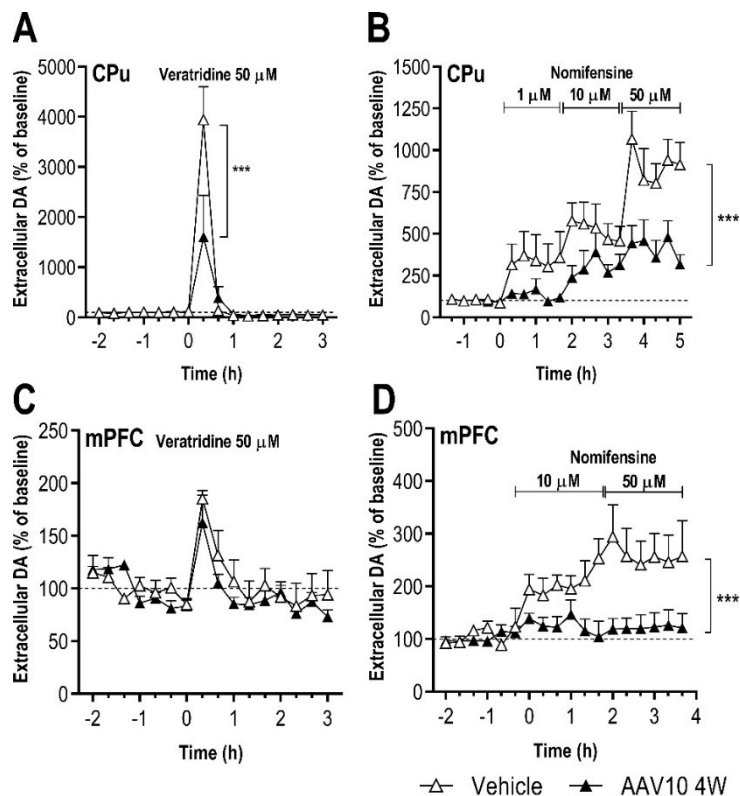


Figura 22. Efectos sobre la neurotransmisión DA nigroestriatal y mesocortical en el modelo AAV10- γ -Syn a las 4W post-inyección. **A)** La infusión local de veratridina (50 μ M) aumentó la liberación de DA extracelular en CPu, con aumentos menores en el grupo AAV10 comparados con el grupo control. **B)** La infusión local de nomifensina (1-10-50 μ M) aumentó de manera dosis-dependiente la concentración extracelular de DA estriatal, con un efecto menor en el grupo AAV10 comparado al grupo control. **C)** La infusión local de veratridina (50 μ M) aumentó la liberación de DA extracelular en la mPFC, sin diferencias entre el grupo AAV10 y el control. **D)** La infusión local de nomifensina (10-50 μ M) aumentó de manera dosis-dependiente la concentración extracelular de DA cortical en el grupo control, pero no en el grupo AAV10. Los valores representan la media \pm SEM, n=5-6 ratones/grupo. ***p<0.001 vs grupo inyectado con vehículo.

Por otro lado, se llevaron a cabo experimentos adicionales de microdiálisis en grupos de ratones inyectados con AAV10 o vehículo y evaluados a **12W post-inyección**.

En CPu, la infusión de veratridina (50 μ M) aumentó los niveles extracelulares de DA un \sim 2997% en los ratones inyectados con vehículo, respecto a los niveles basales; por su parte, en los ratones con sobreexpresión la concentración de DA aumentó un \sim 902% respecto a los valores basales (**Figura 23A**). El análisis ANOVA de 2 vías seguido del test *post hoc* de Bonferroni no revela una diferencia significativa por efecto de grupo ($F_{(1,11)}=2.925$, $p=0.1152$), pero sí se detectan diferencias por efecto del tiempo ($F_{(15,165)}=9.774$, $p<0.0001$) y por la interacción grupo-tiempo ($F_{(15,165)}=3.058$, $p=0.0002$).

Por otra parte, la administración local de nomifensina (1-10 μ M) aumentó de manera dosis-dependiente la concentración extracelular de DA en CPu. En el grupo control, el aumento fue del 160–351% respecto a los valores basales, mientras que el aumento en los ratones AAV10 fue menos pronunciado (145–217%) (**Figura 23B**). El análisis ANOVA de 2 vías mostró una diferencia significativa por efecto de grupo ($F_{(1,7)}=5.789$, $p=0.0470$), por tiempo ($F_{(14,98)}=22.75$, $p<0.0001$) y por interacción grupo-tiempo ($F_{(14,98)}=3.333$, $p=0.0002$).

Respecto a la mPFC a 12W, la administración local de veratridina (50 μ M) incrementó la liberación de DA cortical en ambos grupos experimentales, alcanzado niveles de \sim 144% y \sim 168% en el grupo control y AAV10, respectivamente (**Figura 23C**). El análisis ANOVA de 2 vías no mostró diferencias significativas por efecto de grupo ($F_{(1,9)}=0.0787$, $p=0.7854$), ni por interacción grupo-tiempo ($F_{(15,135)}=0.4298$, $p=0.9679$), aunque sí por efecto de tiempo ($F_{(15,135)}=3.949$, $p<0.0001$).

La administración de nomifensina (1-10 μM) produjo un aumento dosis-dependiente de la concentración extracelular de DA cortical (167–215%) en el grupo control; sin embargo, este efecto no se observó en el grupo AAV10 (104–131%) (**Figura 23D**). El test ANOVA de 2 vías no mostró diferencias estadísticas por efecto de grupo ($F_{(1,10)}=4.036$, $p=0.0723$), pero sí por tiempo ($F_{(17,170)}=4.951$, $p<0.0001$) y por interacción grupo–tiempo ($F_{(17,170)}=1.883$, $p=0.0224$).

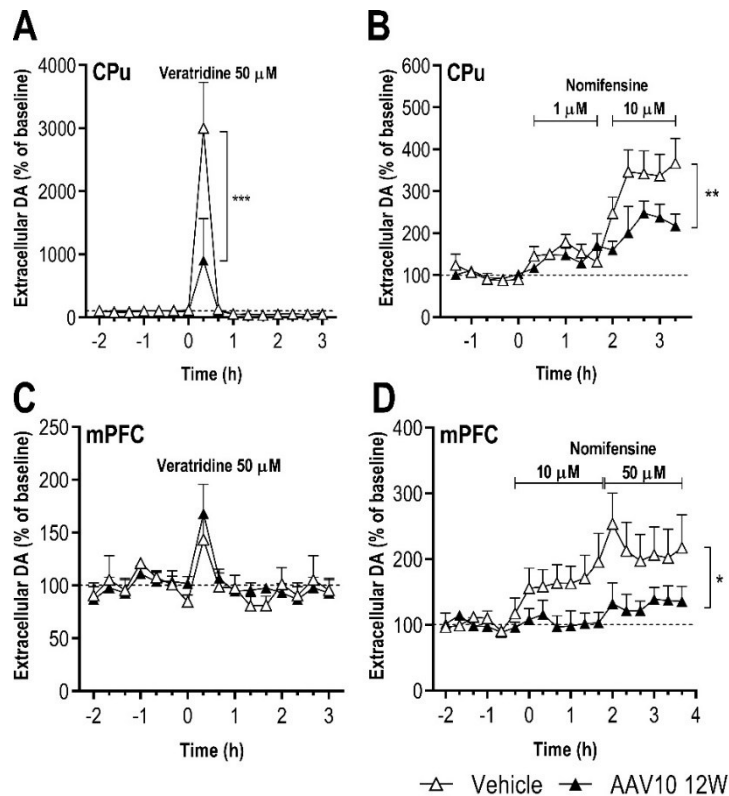


Figura 23. Efectos sobre la neurotransmisión DA nigroestriatal y mesocortical en el modelo AAV10- γ -Syn a las 12W post-inyección. **A)** La infusión local de veratridina (50 μM) aumentó la liberación de DA extracelular en CPU, con aumentos menores en el grupo AAV10 comparados con el grupo control. **B)** La infusión local de nomifensina (1-10-50 μM) aumentó de manera dosis-dependiente la concentración extracelular de DA estriatal, con un efecto menor en el grupo AAV10 comparado al grupo control. **C)** La infusión local de veratridina (50 μM) aumentó la liberación de DA extracelular en la mPFC, sin diferencias entre el grupo AAV10 y el control. **D)** La infusión local de nomifensina (10-50 μM) aumentó de manera dosis-dependiente la concentración extracelular de DA cortical en el grupo control, pero no en el grupo AAV10. Los valores representan la media \pm SEM, $n=5-6$ ratones/grupo. *** $p<0.001$ vs grupo inyectado con vehículo.

En cada experimento de microdiálisis, también se cuantificó de modo simultáneo uno de los metabolitos principales de DA, el **ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC)**, en cada una de las fracciones dializadas. La concentración basal de DOPAC extracelular en mPFC y CPu no mostró diferencias entre los grupos AAV10 y control en ninguna de las condiciones utilizadas (**Tabla 7**). El test *t* de Student indicó que no hay diferencias estadísticas en la mPFC (LCR: $t=0.8230$, $p=0.4297$; LCR+DMSO: $t=1.109$, $p=0.2934$) ni el CPu (LCR: $t=0.4109$, $p=0.6898$; LCR+DMSO: $t=0.6943$, $p=0.5033$).

Tabla 7. Niveles basales de DOPAC extracelular en mPFC y CPu evaluados por microdiálisis intracerebral en el modelo de sobreexpresión por AAV10- γ -Syn.

GRUPO	CONDICIONES	DOPAC BASAL (mPFC)	DOPAC BASAL (CPu)
Vehículo	LCR	0.12 ± 0.04 (n=6)	0.52 ± 0.08 (n=6)
	LCR + DMSO 1%	0.21 ± 0.06 (n=6)	1.26 ± 0.31 (n=6)
AAV10 (4W)	LCR	0.08 ± 0.08 (n=6)	0.46 ± 0.12 (n=6)
	LCR + DMSO 1%	0.14 ± 0.03 (n=6)	0.95 ± 0.34 (n=6)

Los valores representan la media de los valores basales ± SEM, expresados en fmol DOPAC por fracción dializada de 20 min. La *n* indica el número de ratones utilizados en cada caso.

En el CPu, la infusión de veratridina (50 μ M) provocó una disminución de los niveles de DOPAC respecto a los niveles basales, que fue similar en el grupo control (~73%) y en el grupo AAV10 (~84%) (**Figura 24A**); el ANOVA de 2 vías junto al test *post hoc* de Bonferroni no mostró ninguna diferencia significativa por efecto de grupo ($F_{(1,10)}=0.0073$, $p=0.9335$), por tiempo ($F_{(2,20)}=3.037$, $p=0.0705$) y por interacción grupo-tiempo ($F_{(2,20)}=0.2405$, $p=0.7885$). La infusión de nomifensina (1-10-50 μ M) no provocó una respuesta dosis-dependiente en los niveles de DOPAC respecto a los niveles basales, ni en el grupo control (118–85–76%) ni en el AAV10 (94–75–78%) (**Figura 24B**); el ANOVA de 2 vías no mostró diferencias estadísticas por efecto de grupo ($F_{(1,10)}=0.7082$, $p=0.4197$), por tiempo ($F_{(3,30)}=2.603$, $p=0.0702$) ni por interacción grupo-tiempo ($F_{(3,30)}=0.3671$, $p=0.7772$).

En la mPFC, la infusión de veratridina produjo una disminución de los niveles de DOPAC extracelular, similar en los ratones del grupo control (~73%) y del grupo con sobreexpresión (~75%) (**Figura 24C**); el análisis ANOVA no mostró diferencias significativas entre ambos grupos por efecto de grupo ($F_{(1,9)}=0.0187$, $p=0.8943$) ni por

interacción grupo-tiempo ($F_{(2,18)}=0.0201$, $p=0.9802$), aunque sí por tiempo ($F_{(2,18)}=7.232$, $p=0.0050$). La infusión de nomifensina (10-50 μM) tampoco provocó una respuesta dosis-dependiente en los niveles de DOPAC, ni en el grupo control (75–71%) ni en el AAV10 (84–87%) (**Figura 24D**); el ANOVA de 2 vías no mostró diferencias significativas por efecto de grupo ($F_{(1,10)}=0.6692$, $p=0.4324$), por tiempo ($F_{(2,20)}=2.975$, $p=0.0739$) y por interacción grupo-tiempo ($F_{(2,20)}=0.3498$, $p=0.7091$).

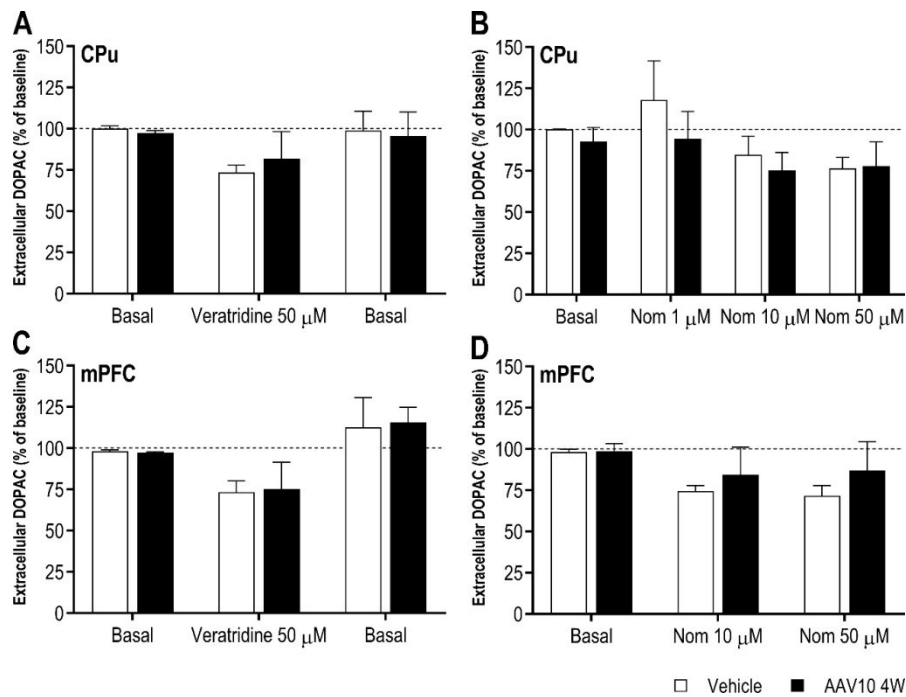


Figura 24. Niveles extracelulares de DOPAC en CPu y mPFC en el modelo AAV10- γ -Syn a 4W post-inyección. Las gráficas muestran los niveles de DOPAC representados como área bajo la curva. **A,B**) La infusión en CPu de veratridina (50 μM) o nomifensina (1-10-50 μM) no mostró diferencias entre ambos los grupos inyectados con AAV10 y con vehículo en los niveles de DOPAC extracelular. **C,D**) La infusión en mPFC de veratridina (50 μM) o nomifensina (10-50 μM) no produjo diferencias entre ambos grupos en los niveles de DOPAC extracelular. Los valores representan la media \pm SEM, $n=5-6$ ratones/grupo.

C. CONSECUENCIAS CONDUCTUALES DE LA SOBREENPRESIÓN DE γ -SINUCLEÍNA

Para examinar si la sobreexpresión de γ -Syn en la SNc/VTA se relaciona con cambios conductuales, se llevaron a cabo varias pruebas comportamentales en los ratones AAV10 y sus respectivos controles en las semanas 4, 8 y 16 posteriores a la inyección.

I. COMPORTAMIENTO MOTOR

En primer lugar, evaluamos la actividad motora de los ratones con sobreexpresión de γ -Syn mediante el **test de campo abierto**, midiendo la distancia total recorrida durante 15 min. Los ratones inyectados con AAV10 no mostraron ninguna diferencia en la actividad locomotora en ningún tiempo post-inyección; la distancia total recorrida por cada grupo fue de $83.6 \pm 11.4\%$ (4W), $95.8 \pm 8.0\%$ (8W) y $77.2 \pm 20.5\%$ (16W), en comparación con sus respectivos grupos control (**Figura 25A**). El test *t* de Student no mostró diferencias estadísticas en la distancia total recorrida entre ambos grupos (4W: $t=1.436$, $p=0.1889$; 8W: $t=0.5291$, $p=0.6032$; 16W: $t=1.112$, $p=0.3166$); mediante el mismo análisis tampoco se detectaron diferencias en el resto de variables cuantificadas: tiempo de reposo, duración de los movimientos rápidos y lentos, y velocidad media.

Para evaluar la asimetría en el uso de las patas delanteras llevamos a cabo la **prueba del cilindro**, contando el número de contactos de cada pata sobre la pared del cilindro durante 5 min para calcular el uso de la pata contralateral a la inyección. En comparación con los ratones inyectados con vehículo, la proporción de contactos de la pata contralateral respecto al total de contactos en los ratones inyectados con AAV10 fue de $100.2 \pm 6.9\%$ (4W), $100.7 \pm 4.1\%$ (8W) y $90.8 \pm 9.1\%$ (16W). El test *t* de Student no mostró diferencias significativas entre los grupos con sobreexpresión de γ -Syn comparados con los grupos controles que recibieron vehículo en ningún tiempo de evaluación (**Figura 25B**), como reveló el test *t* de Student (4W: $t=0.0274$, $p=0.9788$; 8W: $t=0.1709$, $p=0.8665$; 16 weeks: $t=1.018$, $p=0.3383$).

Además, evaluamos también la coordinación y el equilibrio mediante la **prueba del RotaRod** acelerado, cuantificando la latencia de la caída (**Figura 25C**). Ambos grupos, AAV10 y control, mostraron un comportamiento similar a 4W y 8W, con tiempos de latencia de caída comparables tal como se revela mediante el test *t* de Student (4W: $t=1.012$, $p=0.3227$; 8W: $t=0.2132$, $p=0.8328$). Sin embargo a 16W, los ratones AAV10 mostraron una latencia de caída menor comparada con el grupo control ($80.9 \pm 8.4\%$), evidenciando de este modo un empeoramiento de la función motora en el *RotaRod*; mediante el test *t* de Student se revelaron diferencias significativas entre ambos grupos a las 16W ($t=2.258$, $p=0.0342$).

II. FUNCIÓN COGNITIVA

Los efectos de la sobreexpresión de la forma endógena de γ -Syn sobre la función cognitiva de los ratones también fueron evaluados en los diferentes tiempos post-inyección. Mediante el **test de evitación pasiva**, evaluamos la latencia de escape para calcular la memoria a corto plazo condicionada por miedo ($t_{test} - t_{pretest}$) (**Figura 25D**). En los tiempos 4W y 8W se detectó un comportamiento similar entre los grupos AAV10 y control, con una memoria a corto plazo similar como se revela en el análisis *t* de Student (4W: $t=1.316$, $p=0.2024$; 8W: $t=1.602$, $p=0.1209$). No obstante, a las 16W se apreció una menor memoria a corto plazo en el grupo AAV10 en comparación con el grupo inyectado con vehículo ($54.1 \pm 22.1\%$); mediante el mismo análisis estadístico se revelaron diferencias significativas entre ambos grupos en este tiempo post-inyección ($t=2.076$, $p=0.0492$).

Además, también utilizamos el **test de reconocimiento de objetos novedosos** para evaluar el efecto de la sobreexpresión de γ -Syn en la memoria a corto plazo, cuantificando el tiempo de exploración de ambos objetos. Durante el periodo de entrenamiento, ambos grupos mostraron una preferencia similar por los mismos objetos, en todos los tiempos post-inyección. En el test, los dos grupos de ratones mostraron un mayor tiempo de exploración del objeto novedoso respecto al familiar (**Figura 25E**); en los tiempos de evaluación, el test ANOVA de 2 vías mostró diferencias estadísticas por efecto del objeto (4W: $F_{(1,44)}=51.61$, $p<0.001$; 8W: $F_{(1,54)}=187.8$, $p<0.001$; 16W: $F_{(1,44)}=50.14$, $p<0.001$), pero no por efecto de grupo (4W: $F_{(1,44)}=2.546$, $p=0.1177$; 8W: $F_{(1,54)}=2.597$, $p=0.1129$; 16W:

$F_{(1,44)}=1.540$, $p=0.2212$) ni por interacción grupo-tiempo (4W: $F_{(1,44)}=1.397$, $p=0.2435$; 8W: $F_{(1,54)}=2.914$, $p=0.0935$; 16W: $F_{(1,44)}=3.938$, $p=0.0535$).

Durante este test, los grupos con sobreexpresión mostraron una discriminación similar del objeto novedoso en comparación con el grupo control, en los tiempos 4W ($93.6 \pm 6.6\%$) y 8W ($98.7 \pm 7.6\%$) (**Figura 25E**); el test t de Student no reveló diferencias estadísticas en ambos tiempos (4W: $t=1.493$, $p=0.1511$; 8W: $t=0.1732$, $p=0.8638$). Sin embargo, los ratones con sobreexpresión del grupo 16W presentaron una menor discriminación entre el objeto familiar y el novedoso en comparación con el grupo control ($76.9 \pm 8.0\%$); en este caso, el test t de Student mostró diferencias significativas entre ambos grupos ($t=2.651$, $p=0.0158$).

Finalmente, también evaluamos los cambios en el aprendizaje espacial y memoria de referencia utilizando el **laberinto acuático de Morris**, a 4, 8 y 16W post-inyección. A lo largo de las 4 sesiones de entrenamiento registramos las latencias de escape de los diferentes grupos para analizar el aprendizaje (**Figura 25F**). En el grupo 4W no se detectaron diferencias en el aprendizaje, de modo que los ratones con sobreexpresión presentaron una latencia de escape similar a sus respectivos controles ($100.1 \pm 6.0\%$); mediante el test ANOVA de 2 vías seguido del test *post hoc* de Bonferroni no se detectan diferencias entre ambos grupos, por efecto del grupo ($F_{(1,23)}=0.0003$, $p=0.9864$), ni interacción grupo-tiempo ($F_{(4,92)}=0.1816$, $p=0.9474$), aunque sí por tiempo ($F_{(4,92)}=8.489$, $p<0.0001$). Sin embargo, en los grupos 8W y 16W post-inyección sí que se apreció una latencia de escape mayor de los ratones con sobreexpresión en comparación con sus respectivos controles (8W: $113.6 \pm 5.2\%$; 16W: $120.5 \pm 9.3\%$). Con el mismo test ANOVA se revelaron diferencias significativas en el tiempo 8W por efecto de grupo ($F_{(1,22)}=6.864$, $p=0.0156$) aunque no por tiempo ($F_{(3,66)}=2.165$, $p=0.1005$) ni interacción grupo-tiempo ($F_{(3,66)}=1.065$, $p=0.3699$); igualmente, también se revelaron diferencias entre ambos grupos en el tiempo 16W por efecto de grupo ($F_{(1,17)}=4.846$, $p=0.0418$) y por tiempo ($F_{(3,51)}=5.393$, $p=0.0027$), pero no por su interacción ($F_{(3,51)}=0.9785$, $p=0.4102$).

Después del aprendizaje en el test del laberinto de Morris también se realizó la prueba sin la plataforma para evaluar la memoria de referencia, midiendo el tiempo transcurrido en cada cuadrante. No obstante, no se observaron diferencias en el tiempo transcurrido en el cuadrante de referencia comparando los ratones con sobreexpresión con sus respectivos grupos control en los diferentes tiempos post-inyección (4W: $104.3 \pm 22.3\%$; 8W: $100.5 \pm$

30.1%; 16W: $126.5 \pm 19.3\%$) (**Figura 25F**). Mediante el test *t* de Student no se revelaron diferencias estadísticas entre ambos grupos en ninguno de los tiempos evaluados (4W: $t=0.1938$, $p=0.8481$; 8W: $t=0.0502$, $p=0.9604$; 16W: $t=1.374$, $p=0.1826$).

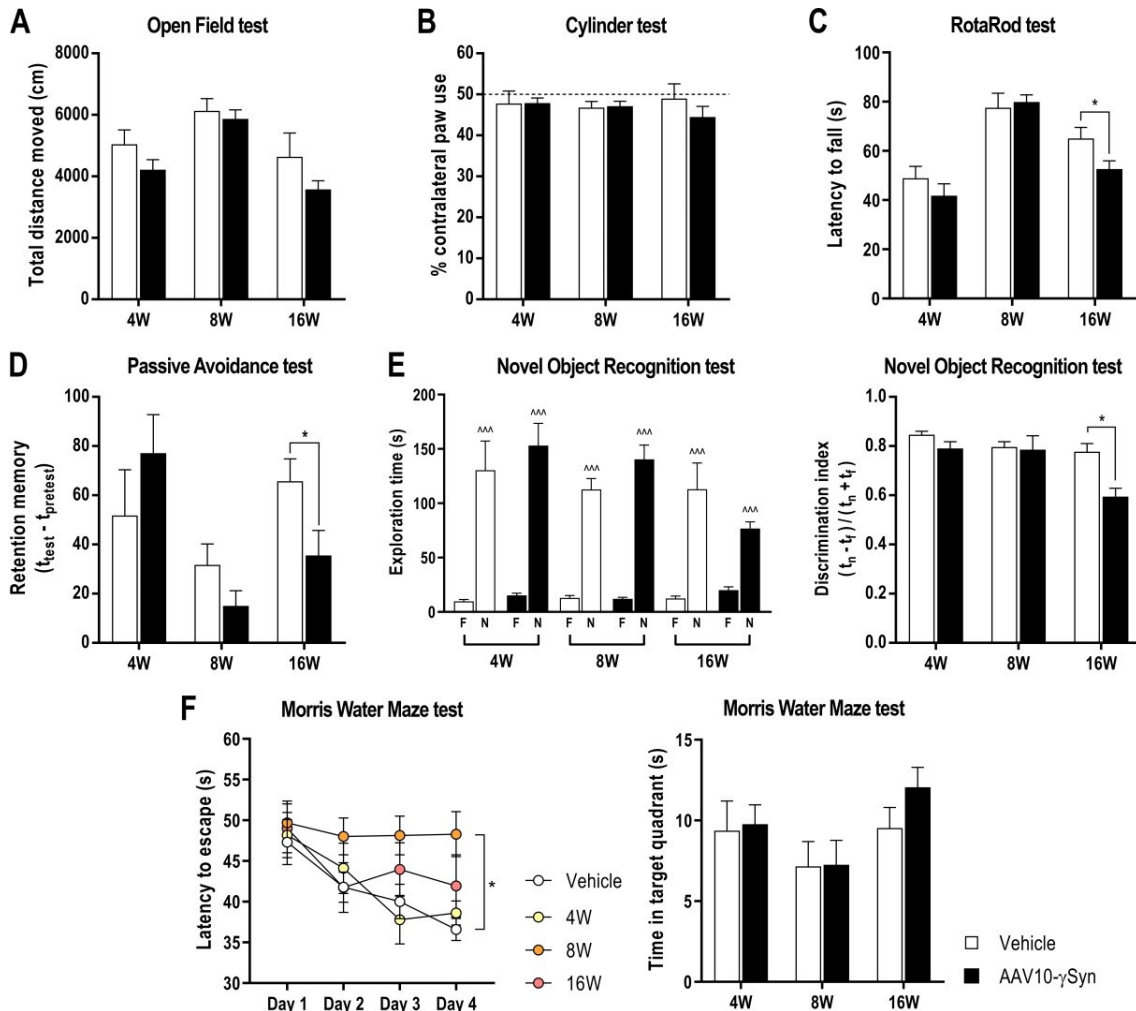


Figura 25. Cambios conductuales en el modelo AAV10-γ-Syn. A) Test de campo abierto. Los ratones no muestran ninguna diferencia en la distancia total en ningún tiempo post-inyección. B) Test del cilindro. No se detectan diferencias en el uso de la pata delantera contralateral en ningún tiempo post-inyección. C) Test *RotaRod*. Se detectó un empeoramiento de la coordinación motora de los ratones AAV10 a las 16W post-inyección, evidente por un menor tiempo de latencia hasta la caída en el test acelerado. D) Test de evitación pasiva. Midiendo la latencia hasta el cruce a la cámara oscura, los ratones con sobreexpresión mostraron una peor memoria de retención a las 16W post-inyección. E) Test de reconocimiento de objetos novedosos. Los ratones AAV10 y controles mostraron una mayor preferencia por el objeto novedoso con tiempos de exploración similares, pero el grupo AAV10 mostró un índice de discriminación menor a las 16W. F = Objeto familiar, N = Objeto novedoso. F) Test del laberinto acuático de Morris. Los ratones mostraron

mayores latencias de escape durante las sesiones de entrenamiento a partir de 8W post-inyección, aunque no se detectaron diferencias en el tiempo transcurrido en el cuadrante de escape durante la sesión del test. Los valores representan la media \pm SEM, $n=10-15$ ratones/grupo. * $p<0.05$, ** $p<0.01$ vs grupo inyectado con vehículo; $^{***}p<0.001$ vs objeto familiar.

Adicionalmente, para descartar posibles efectos asociados a elementos virales, un grupo de ratones fue inyectado con un vector AAV10-CMV vacío en la SNc/VTA. Los ratones fueron tratados de un modo similar a aquellos que recibieron el constructo AAV10-CMV- γ -Syn y fueron evaluados en los mismos tiempos. Mediante ISH no se detectó ningún cambio en la expresión del transcrito de γ -Syn en la SNc/VTA del hemisferio ipsilateral respecto al contralateral en ninguno de los grupos inyectados con el vector vacío, respecto al grupo control inyectado con vehículo (**Figura 26A,B**); el análisis ANOVA de 1 vía con el test *post hoc* de Tukey no reveló diferencias entre ambos grupos ($F_{(4,20)}=0.0314$, $p=0.8661$).

Además, en los ratones inyectados con el vector AAV vacío también se llevaron a cabo las pruebas de comportamiento motor de campo abierto y del cilindro, a los tiempos post-inyección 4W, 8W y 16W. En el test de campo abierto los ratones inyectados con el vector vacío no mostraron ninguna diferencia en la actividad locomotora en ninguno de los tiempos post-inyección, en comparación con sus respectivos controles (**Figura 26C**). El test *t* de Student no mostró diferencias significativas en la distancia total recorrida entre ambos grupos (4W: $t=1.186$, $p=0.2697$; 8W: $t=0.3342$, $p=0.7421$; 16W: $t=0.2036$, $p=0.8454$).

En la prueba del cilindro para evaluar la asimetría en el uso de las patas delanteras tampoco se han detectado diferencias significativas entre los grupos inyectados con el vector AAV vacío y los inyectados con vehículo en ningún tiempo post-inyección (**Figura 26D**). Así, el test *t* de Student no reveló diferencias estadísticas entre los grupos, en comparación con sus respectivos controles (4W: $t=1.316$, $p=0.2246$; 8W: $t=0.8646$, $p=0.4000$; 16W: $t=1.047$, $p=0.3256$).

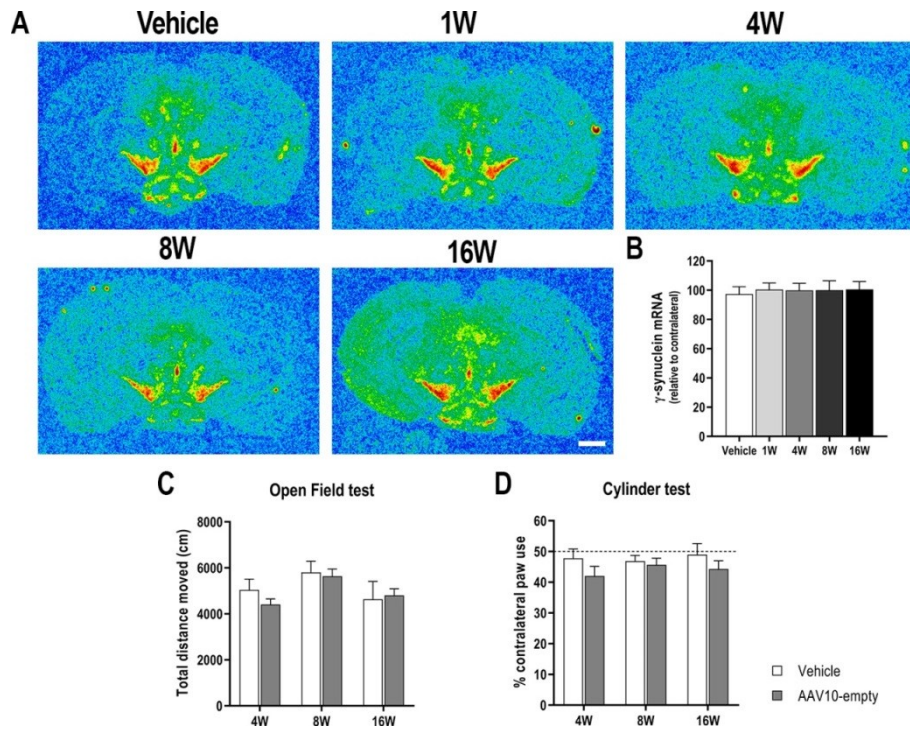


Figura 26. Efectos de la inyección de un vector AAV10-CMV vacío en la SNc/VTA.

A) Autorradiografía de secciones coronales de cerebro de ratón mostrando la expresión del transcrito de γ -Syn en la SNc/VTA de ratones inyectados con un vector AAV10-CMV vacío, evaluados por ISH. Escala: 1 mm. **B)** Cuantificación densitométrica de la expresión del transcrito de γ -Syn en la SNc/VTA, en relación al hemisferio contralateral. Las barras no muestran diferencias en los niveles de expresión de γ -Syn en comparación con el grupo control. **C)** Test de campo abierto. Los ratones no muestran ninguna diferencia en la distancia total en ningún tiempo post-inyección. **D)** Test del cilindro. No se detectan diferencias en el uso de la pata delantera contralateral en ningún tiempo post-inyección. Los valores representan la media \pm SEM, n=5-6 ratones/grupo (ISH); n=10-15 ratones/grupo (comportamiento).

3. MODELO DE SILENCIAMIENTO DE γ -SINUCLEÍNA EN NEURONAS DOPAMINÉRGICAS DE LA SNc/VTA MEDIANTE OLIGONUCLEÓTIDOS ANTISENTIDO

A. ESTUDIO PRELIMINAR: SILENCIAMIENTO AGUDO DE γ -SINUCLEÍNA MEDIANTE RNAs PEQUEÑOS DE INTERFERENCIA

Previamente al desarrollo del modelo de silenciamiento mediante moléculas ASO, y siguiendo con la línea experimental del grupo de investigación (Bortolozzi *et al.*, 2012; Ferrés-Coy *et al.* 2013a,b, 2016), se llevó a cabo un estudio para evaluar la eficacia de silenciamiento *in vivo* de tres secuencias de siRNAs, complementarias con varias regiones del mRNA *Sncg* murino codificante para γ -Syn, y sin homología para los transcritos de α -Syn y β -Syn. Las secuencias de los siRNAs están detalladas en la **Tabla 3**, y todas ellas mostraron una eficacia del 50-80% para el silenciamiento de *Sncg* utilizando algoritmos de diseño de siRNAs provistos por Cenix BioScience.

Distintos grupos de ratones WT recibieron localmente 1 μ l conteniendo 60 μ g de cada secuencia de siRNA en la SNc/VTA y el grupo control recibió LCR artificial, y fueron sacrificados 24 h después. La **Figura 27** muestra la cuantificación de la expresión de γ -Syn en la SNc y la VTA tras la infusión de las diferentes moléculas administradas. Los valores medios en comparación con el hemisferio contralateral fueron los siguientes: siRNA 422-440 (SNc: $99.2 \pm 3.7\%$; VTA: $101.9 \pm 3.9\%$), siRNA 439-457 (SNc: $102.1 \pm 3.7\%$; VTA: $101.4 \pm 3.9\%$) y siRNA 449-468 (SNc: $85.1\% \pm 4.0\%$; VTA: $84.5 \pm 4.5\%$).

El análisis *t* de Student no mostró diferencias estadísticas entre el grupo control y el administrado con siRNA 422-440 (SNc: $t=0.2899$, $p=0.7743$; VTA: $t=0.4074$, $p=0.6873$), ni tampoco entre el grupo control y el inyectado con siRNA 439-457 (SNc: $t=0.4285$, $p=0.6723$; VTA: $t=0.1964$, $p=0.8460$). Sin embargo, sí que se reveló una reducción significativa comparando el grupo control y el inyectado con siRNA 449-468 (SNc: $t=3.151$, $p=0.0050$; VTA: $t=3.009$, $p=0.0065$).

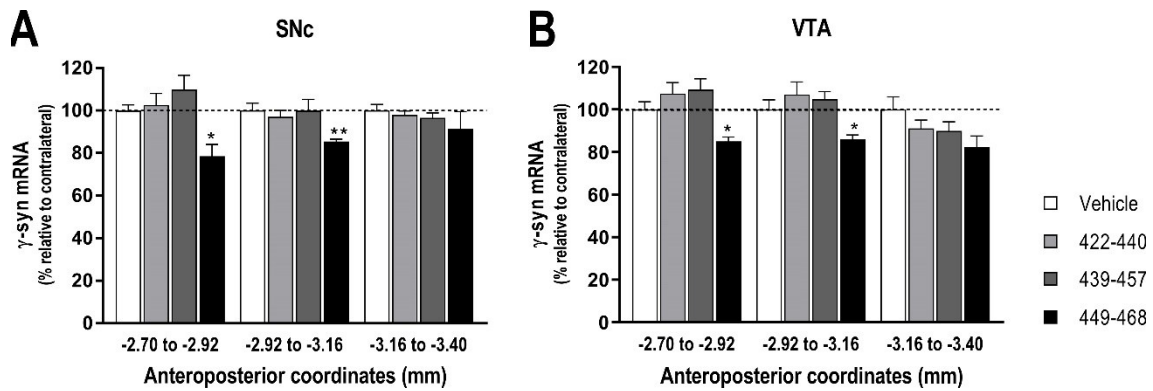


Figura 27. Expresión de γ -Syn en las neuronas DA de la SNc/VTA tras la administración local de siRNAs. Los diferentes grupos de ratones recibieron 60 μ g de las moléculas siRNA y fueron sacrificados 24 h después. Las barras muestran la cuantificación densitométrica de los niveles de transcrito de γ -Syn en la SNc (A) y la VTA (B), evaluados en diferentes coordenadas anteroposteriores. Los valores representan la media \pm SEM, n=5 ratones/grupo. *p<0.05, **p<0.01 vs ratones inyectados con vehículo.

Los resultados anteriores mostraron que la secuencia siRNA 449-468 fue la más efectiva para reducir *in vivo* la expresión del mRNA de γ -Syn. Sin embargo, considerando que en el momento del desarrollo de esta tesis paralelamente se estaban llevando a cabo diferentes estudios comparativos de la eficacia de siRNAs y ASOs para reducir la expresión de α -Syn, siendo los últimos más potentes que los primeros (Alarcón-Arís *et al.*, 2018), hemos decidido diseñar una molécula ASO que se una a la misma región del mRNA de γ -Syn que el siRNA 449-468. Además, esta molécula ASO (a partir de ahora 1415-ASO) fue conjugada con el inhibidor triple de los transportadores de monoaminas, indatralina, para dirigirla selectivamente hacia las neuronas DA como previamente se hizo para IND-1233-ASO contra α -Syn (Alarcón-Arís *et al.*, 2018). En las secciones siguientes se describirán los efectos de IND-1415-ASO sobre los niveles de γ -sinucleína en la SNc/VTA.

B. REDUCCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE γ -SINUCLEÍNA EN LA SNc/VTA POR LA ADMINISTRACIÓN LOCAL DE IND-1415-ASO

Una vez sintetizada la molécula IND-1415-ASO, ésta fue aplicada estereotáxicamente en la SNc/VTA de los ratones (60 μ g en 1 μ l) y éstos fueron sacrificados 24 y 72 h después de la administración. El grupo control recibió 1 μ l de LCR artificial en la SNc/VTA. Mediante ISH, se detectó una menor expresión de γ -Syn en la SNc/VTA de los ratones tratados con IND-1415-ASO, comparada con el grupo control. Esta reducción fue del $75.4 \pm 5.7\%$ y del $80.1 \pm 3.9\%$ a las 24 y 72 h respectivamente, respecto al hemisferio contralateral (**Figura 28A,C**). El análisis ANOVA de 1 vía seguido del test *post hoc* de Tukey mostró un efecto de grupo ($F_{(2,14)}=13.19$, $p=0.0006$), con una reducción significativa a las 24 h ($p=0.0013$) y 72 h ($p=0.0041$) en comparación con el grupo control tratado con vehículo, pero sin diferencias significativas entre ambos grupos tratados con IND-1415-ASO ($p=0.7195$).

Para evaluar más exhaustivamente el efecto de IND-1415-ASO sobre la reducción del mRNA de γ -Syn, se llevó a cabo un estudio de colocalización a fin de identificar el tipo celular. Para ello, se realizaron experimentos dobles de ISH de γ -Syn y de inmunohistoquímica para identificar células TH⁺ (**Figura 28B**).

En primer lugar, se cuantificaron las células TH⁺ con expresión del mRNA de γ -Syn, y se detectó una reducción del número de células doble positivas (TH⁺/ γ -Syn⁺) en la SNc/VTA de los ratones administrados con IND-1415-ASO, en comparación con los inyectados con vehículo. La reducción fue del $87.0 \pm 7.7\%$ y del $84.6 \pm 6.3\%$ a las 24 y 72 h post-administración respectivamente, respecto al hemisferio contralateral a la inyección (**Figura 28D**). El análisis ANOVA de 1 vía no mostró un efecto de grupo ($F_{(2,9)}=3.007$, $p=0.1000$), pero en las comparaciones múltiples se observó una reducción significativa en los ratones tratados con IND-1415-ASO evaluados a las 72 h ($p=0.0497$), aunque no a las 24 h ($p=0.1431$).

Seguidamente, se cuantificó la densidad del transcrito de γ -Syn en las células TH⁺ como el área de la emulsión en relación al área con inmunorreacción TH⁺. En este caso también se observó una disminución de la densidad del mRNA de γ -Syn en las células de los ratones tratados con IND-1415-ASO en comparación con el grupo control, del $75.0 \pm 7.9\%$ y del 66.6

RESULTADOS

$\pm 7.3\%$ a las 24 y 72 h respectivamente, respecto al hemisferio contralateral (**Figura 28E**). El análisis ANOVA de 1 vía seguido del test *post hoc* de Tukey reveló un efecto de grupo ($F_{(2,10)}=13.74$, $p=0.0014$), con una reducción significativa a las 24 h ($p=0.0115$) y a las 72 h ($p=0.0012$) respecto al grupo control, pero sin diferencias entre ambos grupos inyectados con IND-1415-ASO ($p=0.4324$).

Además, no se detectó una pérdida de células TH⁺ en la SNc/VTA en el hemisferio ipsilateral respecto al contralateral en los ratones tratados con IND-1415-ASO (24 h: $88.1 \pm 10.5\%$; 72 h: $92.4 \pm 11.1\%$), en comparación con el grupo administrado con vehículo ($105.2 \pm 14.9\%$) (**Figura 28F**). El análisis ANOVA de 2 vías seguido del test *post hoc* de Tukey no muestra diferencias estadísticas entre los grupos en el número de células por efecto de grupo ($F_{(2,20)}=2.763$, $p=0.0872$), de hemisferio ($F_{(1,20)}=0.4143$, $p=0.5271$) ni interacción grupo-hemisferio ($F_{(2,20)}=0.5180$, $p=0.6035$).

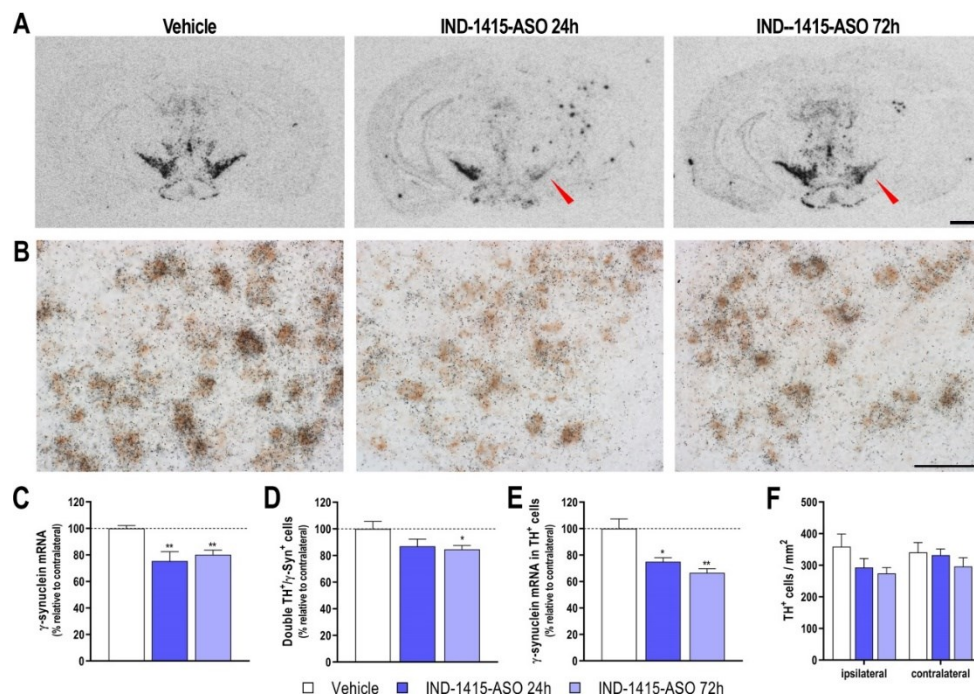


Figura 28. Silenciamiento de γ -Syn en las neuronas DA de la SNc/VTA inducido por IND-1415-ASO A) Autorradiografía de secciones coronales de cerebro de ratón

mostrando la reducción del nivel de transcrito de γ -Syn en la SNc/VTA de ratones administrados con IND-1415-ASO, evaluada mediante ISH. Escala: 1 mm. B) Imágenes de microscopía óptica mostrando la expresión del mRNA de γ -Syn (identificada utilizando una sonda marcada con ³³P y mostrada como puntos negros en la imagen) en las células TH⁺ de la SNc/VTA. Escala: 50 μ m. C) Cuantificación densitométrica de la sobreexpresión del transcrito de γ -Syn en la SNc/VTA, en

relación al hemisferio contralateral. Las barras muestran una reducción significativa de los niveles de expresión de γ -Syn en comparación con el grupo control tratado con vehículo. **D)** Cuantificación de las células TH⁺ con expresión del mRNA de γ -Syn en la SNc/VTA de los ratones administrados con IND-1415-ASO. **E)** Cuantificación de la densidad intracelular del transcrito de γ -Syn en las células TH⁺, en relación al área total de la célula. **F)** Cuantificación de la cantidad de células TH⁺ por mm² en la SNc/VTA, en los hemisferios ipsi- y contralateral. Los valores representan la media \pm SEM, n=5-6 ratones/grupo. *p<0.05, **p<0.01 vs ratones inyectados con vehículo.

Para comprobar la especificidad del silenciamiento, en los ratones inyectados con IND-1415-ASO también evaluamos la expresión del transcrito de α -Syn en la SNc/VTA, 24 h después de la administración. Mediante ISH no se observaron cambios entre ambos hemisferios de los ratones tratados con IND-1415-ASO (109.0 \pm 6.9%) (**Figura 29A**), y el test *t* de Student no mostró diferencias estadísticas con el grupo administrado con vehículo (*t*=1.407, *p*=0.1971).

Además, también se examinó la expresión del mRNA de γ -Syn en el DR y LC de los ratones tratados con IND-1415-ASO, 24 h después de la inyección. No se observaron cambios en la expresión de γ -Syn en el DR (110.1 \pm 5.5%), en comparación con el grupo control (**Figura 29B**), y el test *t* de Student no mostró diferencias entre ambos grupos (*t*=0.7954, *p*=0.4525). Del mismo modo, tampoco se observaron cambios en la expresión de γ -Syn en el LC (99.8 \pm 3.3%) (**Figura 29C**), y el test *t* de Student no mostró diferencias con el grupo control (*t*=0.0449, *p*=0.9652).

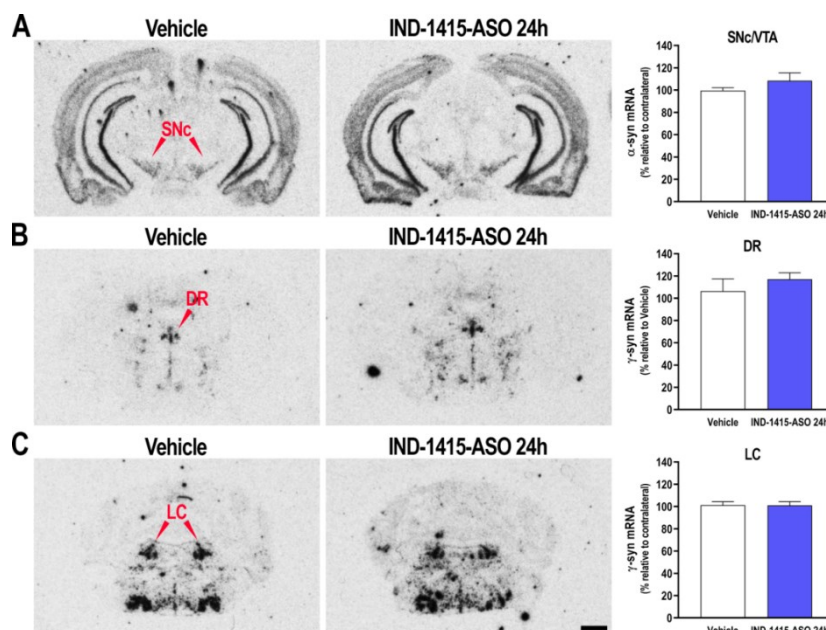


Figura 29. Autorradiografía de secciones coronales de cerebro de ratón mostrando la expresión del transcrito de α -Syn en la SNc/VTA (A) y del transcrito de γ -Syn en el DR (B) y el LC (C) en el modelo de silenciamiento por IND-1415-ASO. Escala: 1 mm. La cuantificación densitométrica no muestra diferencias en ningún tiempo tras la administración. Los valores representan la media \pm SEM, n=5-6 ratones/grupo.

Sin embargo, el análisis de la expresión de otro de los marcadores de neuronas DA como DAT, mostró una reducción significativa en el modelo de silenciamiento de la expresión de γ -Syn. Sorprendentemente, comparando la expresión del transcrito de DAT en la SNc/VTA del hemisferio ipsilateral respecto al contralateral de los ratones inyectados con IND-1415-ASO se detectó una disminución del mRNA de DAT de $57.9 \pm 16.6\%$ a las 24 h y del $61.8 \pm 15.9\%$ a las 72 h (**Figura 30A,B**). El ANOVA de 1 vía seguido del test *post hoc* de Tukey mostró un efecto de grupo ($F_{(2,11)}=14.56$, $p=0.0008$), con una reducción significativa en comparación con el lado ipsilateral del grupo control tratado con vehículo (24 h: $p=0.0037$; 72 h: $p=0.0012$), y sin diferencias entre ambos grupos de IND-1415-ASO ($p=0.9033$). Además, el análisis de regresión lineal simple mostró una correlación significativa entre la reducción del mRNA de γ -Syn y de DAT ($R^2=0.5477$, $p=0.0025$) (**Figura 30C**).

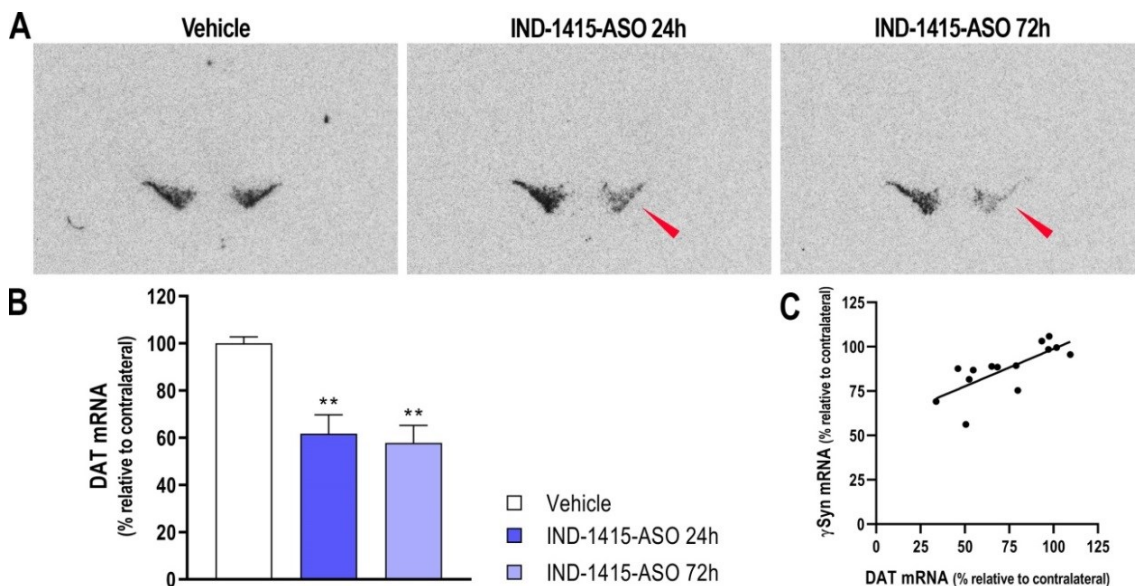


Figura 30. Niveles de expresión de DAT en el modelo de silenciamiento por IND-1415-ASO, 24 y 72 h post-administración. A) Autorradiografía de secciones coronales de cerebro de ratón mostrando la reducción de la expresión del transcrito de DAT en la SNc/VTA, evaluada por ISH. Escala: 1mm. B) Cuantificación densitométrica de los niveles de transcrito de DAT en la SNc/VTA, en relación al

hemisferio contralateral. Las barras muestran una reducción significativa de la expresión en comparación con el grupo inyectado con vehículo. **C)** Relación entre los niveles de expresión de γ -Syn y DAT, mostrando una correlación directa entre ambos. Los valores representan la media \pm SEM, $n=5-6$ ratones/grupo. $**p<0.01$ vs grupo control.

Adicionalmente, para descartar posibles efectos asociados a la activación de los elementos celulares de la RNasa-H, un grupo de ratones fue inyectado con un IND-ASO sin homología con el genoma de ratón (IND-1227-ASO) en la SNc/VTA. Los ratones fueron tratados de modo similar a los administrados con IND-1415-ASO y fueron evaluados 24 h después de la administración. Mediante ISH no se detectó ningún cambio en la expresión del transcrito de γ -Syn en la SNc/VTA del hemisferio ipsilateral respecto al contralateral en el grupo inyectado con IND-1227-ASO (94.7 ± 1.7), en comparación con el grupo control ($100.0 \pm 2.5\%$) (**Figura 31**). El análisis *t* de Student no reveló diferencias estadísticas entre ambos grupos ($t=1.620$, $p=0.1363$).

Considerando que la administración de IND-1227-ASO en la SNc/VTA no produjo ningún efecto en la expresión del transcrito de γ -Syn, decidimos administrar vehículo (LCR) en los ratones empleados como grupo control durante la evaluación de la neurotransmisión DA.

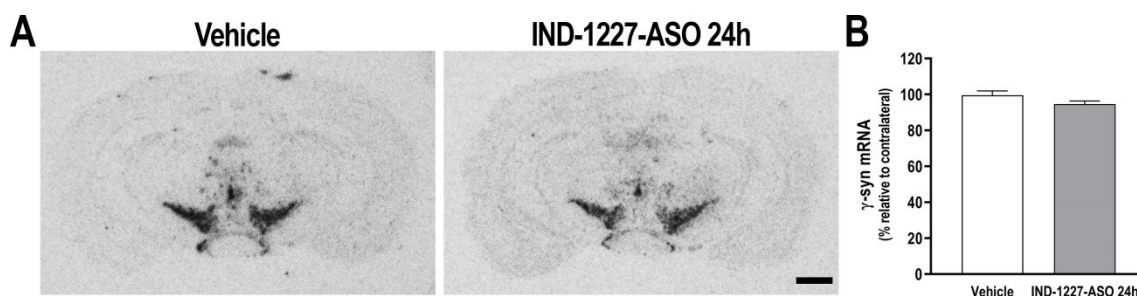


Figura 31. Efectos de la inyección de IND-1227-ASO en la SNc/VTA. **A)** Autorradiografía de secciones coronales de cerebro de ratón mostrando la expresión del transcrito de γ -Syn en la SNc/VTA de ratones inyectados con IND-1227-ASO, sin homología con el genoma murino, evaluados por ISH. Escala: 1 mm. **B)** Cuantificación densitométrica de la expresión del transcrito de γ -Syn en la SNc/VTA, en relación al hemisferio contralateral. Las barras no muestran diferencias en los niveles de expresión de γ -Syn en comparación con el grupo control. Los valores representan la media \pm SEM, $n=5-6$ ratones/grupo (ISH).

Posteriormente, evaluamos los niveles de la proteína γ -Syn en la SNc/VTA de los ratones tratados con IND-1415-ASO o vehículo mediante *Western blot*. La densidad del inmunoblot para γ -Syn de ratones administrados con IND-1415-ASO mostró una reducción de los niveles de γ -Syn del lado ipsilateral en comparación con el lado ipsilateral del grupo control (24h: $94.5 \pm 11.3\%$; 72h: $63.1 \pm 10.5\%$) (**Figura 32A,C**). El ANOVA de 1 vía seguido del test *post hoc* de Tukey mostró diferencias un efecto de grupo ($F_{(2,21)}=7.640$, $p=0.0032$), con cambios significativos a 72 h ($p=0.0029$), pero no a 24 h ($p=0.8521$), comparando ratones tratados con IND-1415-ASO y con vehículo.

Por otro lado, también evaluamos los niveles de la proteína α -Syn endógena en la SNc/VTA de los ratones inyectados con IND-1415-ASO o vehículo. La densidad del inmunoblot para α -Syn de la SNc/VTA ipsilateral de los ratones tratados con IND-1415-ASO mostró un nivel de proteína del $109.1 \pm 20.0\%$ y del $70.6 \pm 19.6\%$ a las 24 y 72 h post-inyección respectivamente, en comparación con el grupo control (**Figura 32B,D**). El test ANOVA de 1 vía seguido del test *post hoc* de Tukey no mostró diferencias estadísticas entre los ratones inyectados con IND-1415-ASO y con vehículo por efecto de grupo ($F_{(2,9)}=2.489$, $p=0.1379$), y las comparaciones múltiples no revelaron cambios comparando los dos grupos tratados con IND-1415-ASO con el grupo control (24 h: $p=0.6637$; 72h: $p=0.1844$).

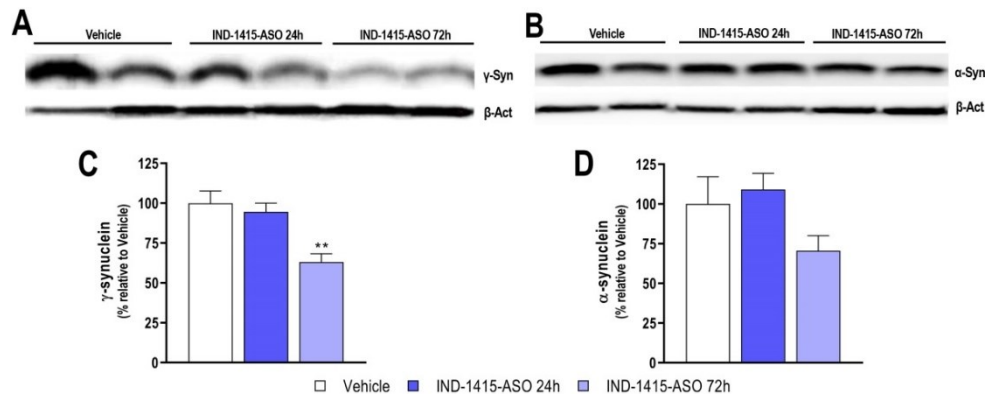


Figura 32. Niveles de las proteínas γ -Syn y α -Syn en la SNc/VTA de ratones tratados con IND-1415-ASO, 24 y 72 h después de la administración. A,B) Inmunoblot contra γ -Syn y α -Syn respectivamente, 24 h y 72 h después de la administración de IND-1415-ASO, utilizando β -actina como *house-keeping*. **B)** Cuantificación densitométrica de los niveles de proteína γ -Syn en la SNc/VTA, utilizando β -actina como *house-keeping*. **C)** Cuantificación densitométrica de los niveles de proteína α -Syn en la SNc/VTA, utilizando β -actina como *house-keeping*. Los valores representan la media \pm SEM, $n=5$ ratones/grupo. ****** $p<0.01$ vs grupo inyectado con vehículo.

C. CONSECUENCIAS DE LA REDUCCIÓN DE LA PROTEÍNA γ -SINUCLEÍNA SOBRE LA NEUROTRANSMISIÓN DA

A continuación, se caracterizó el efecto de la reducción de la proteína γ -Syn sobre la neurotransmisión DA en la mPFC y CPu, de la misma manera que en el modelo de sobreexpresión de γ -Syn en SNc/VTA. Para ello, se llevaron a cabo experimentos de microdiálisis entre 24 y 48 h después de la administración de IND-1415-ASO. La **concentración basal media de DA** extracelular en mPFC y CPu no mostró cambios entre los grupos inyectados con IND-1415-ASO y con vehículo, en ninguna de las condiciones utilizadas (**Tabla 8**). El análisis *t* de Student no mostró diferencias estadísticas en la mPFC (LCR: $t=0.0543$, $p=0.9573$; LCR+DMSO: $t=0.5394$, $p=0.6043$) ni el CPu (LCR: $t=0.2364$, $p=0.8159$; LCR+DMSO: $t=0.2739$, $p=0.7911$).

Tabla 8. Niveles basales de DA extracelular en mPFC y CPu evaluados por microdiálisis intracerebral en el modelo de silenciamiento por IND-1415-ASO.

GRUPO	CONDICIONES	DA BASAL (mPFC)	DA BASAL (CPu)
Vehículo	LCR	20.6 ± 2.8 (n=5)	15.8 ± 1.6 (n=5)
	LCR + DMSO 1%	14.1 ± 0.7 (n=5)	20.1 ± 1.9 (n=5)
IND-1415-ASO	LCR	20.9 ± 6.6 (n=5)	14.3 ± 2.3 (n=5)
	LCR + DMSO 1%	15.2 ± 1.9 (n=5)	21.4 ± 4.1 (n=5)

Los valores representan la media de los valores basales ± SEM, expresados en fmol DA por fracción dializada de 20 min. La *n* indica el número de ratones utilizados en cada caso.

La infusión del agente despolarizante veratridina (50 μ M) por diálisis reversa produjo un aumento significativo de la liberación de DA en el CPu, con niveles similares para ambos grupos experimentales y del orden de ~1360% y ~1495% para el grupo control y para el tratado con IND-1415-ASO, respectivamente (**Figura 33A**). El ANOVA de 2 vías seguido del test *post hoc* de Bonferroni mostró un efecto de tiempo ($F_{(15,105)}=40.20$, $p<0.0001$), pero no de grupo ($F_{(1,7)}=0.0175$, $p=0.8986$) ni interacción grupo-tiempo ($F_{(15,105)}=0.2125$, $p=0.9992$).

Por otra parte, la administración local del inhibidor selectivo de DAT/NET, nomifensina (1-10 μ M) aumentó de manera dosis-dependiente la concentración extracelular de DA en CPu en ambos grupos. En este caso, el aumento en el grupo control fue de 149–272%

respecto a los valores basales, mientras que el aumento en el grupo tratado con IND-1415-ASO fue de 295–680% (**Figura 33B**). El análisis ANOVA de 2 vías mostró una diferencia significativa entre ambos grupos por efecto de grupo ($F_{(1,7)}=7.061$, $p=0.0326$), por tiempo ($F_{(17,119)}=17.14$, $p<0.0001$) y por interacción grupo–tiempo ($F_{(17,119)}=5.152$, $p<0.0001$).

De modo similar, la administración local del liberador de DA e inhibidor de DAT/NET, amfetamina (1-10 μM) aumentó de modo dosis-dependiente la concentración extracelular de DA en CPu. En el grupo control tratado con vehículo tuvo incrementos de los valores de DA del 173–255% respecto a los valores basales, mientras que estos niveles fueron mayores en el grupo tratado con IND-1415-ASO (202–443%) (**Figura 33C**). El ANOVA de 2 vías mostró un efecto de tiempo ($F_{(17,85)}=14.68$, $p<0.0001$), y de interacción grupo–tiempo ($F_{(17,85)}=2.534$, $p=0.0026$), mientras que el efecto grupo fue marginal ($F_{(1,5)}=6.591$, $p=0.0502$).

Además, también analizamos el efecto de IND-1415-ASO sobre la **neurotransmisión DA cortical**. En este caso, la administración local de veratridina (50 μM) produjo un aumento de DA cortical respecto a los niveles basales del ~219% en el grupo control y del ~206% en el IND-1415-ASO (**Figura 33D**). El ANOVA de 2 vías mostró diferencias por efecto de tiempo ($F_{(15,120)}=15.68$, $p<0.0001$), pero no de grupo ($F_{(1,8)}=0.0022$, $p=0.9639$) ni interacción grupo–tiempo ($F_{(15,120)}=0.3491$, $p=0.9882$).

La administración de nomifensina (10-50 μM) produjo un aumento dosis-dependiente de la concentración extracelular de DA cortical, del 191–233% en el grupo control y del 191–213% en el grupo tratado con IND-1415-ASO, en relación a los niveles basales (**Figura 33E**). El análisis ANOVA de 2 vías mostró diferencias por efecto tiempo ($F_{(17,85)}=8.534$, $p<0.0001$) pero no por efecto de grupo ($F_{(1,5)}=0.0571$, $p=0.8206$) ni por interacción grupo–tiempo ($F_{(17,85)}=0.6268$, $p=0.8616$).

Por último, la administración local de amfetamina (10-100 μM) condujo a un aumento de la concentración de DA cortical del 144–188% en el grupo inyectado con vehículo y del 125–169% en el inyectado con IND-1415-ASO, respecto a sus valores basales (**Figura 33F**). El ANOVA de 2 vías reveló diferencias por efecto por tiempo ($F_{(17,102)}=11.34$, $p<0.0001$) aunque no por efecto de grupo ($F_{(1,6)}=1.271$, $p=0.3026$) ni por interacción grupo–tiempo ($F_{(17,102)}=0.7543$, $p=0.7398$).

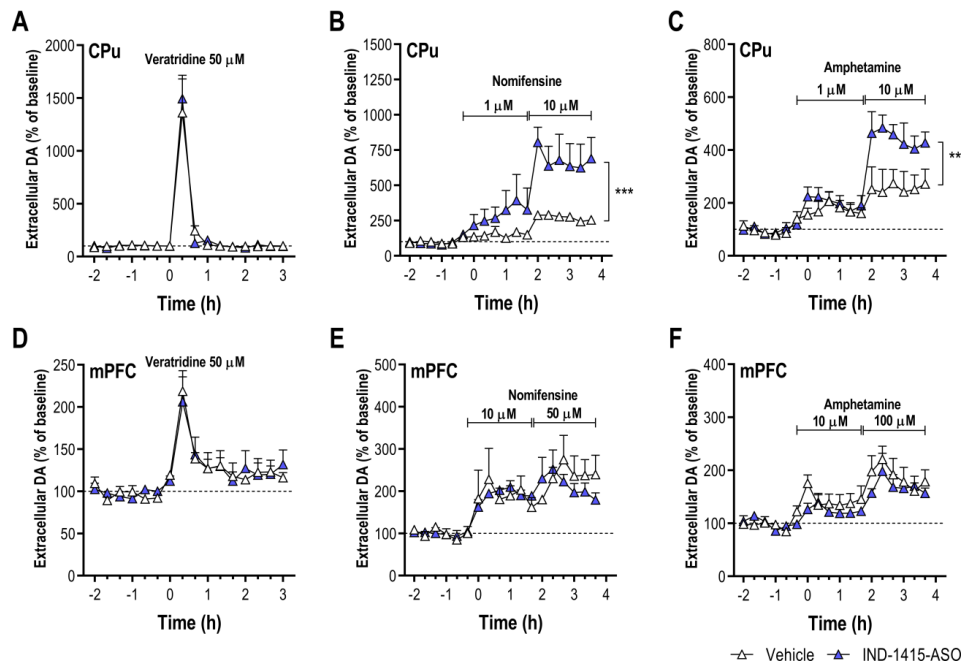


Figura 33. Efectos sobre la neurotransmisión DA nigroestriatal y mesocortical en el modelo de silenciamiento por IND-1415-ASO. **A)** La infusión local de veratridina (50 μ M) aumentó la liberación de DA extracelular en CPu, sin diferencias significativas entre grupos. **B)** La infusión local de nomifensina (1-10 μ M) aumentó de manera dosis-dependiente la concentración extracelular de DA estriatal, con un efecto mayor en el grupo IND-1415-ASO que en los controles. **C)** La infusión local de anfetamina (1-10 μ M) aumentó de manera dosis-dependiente la concentración extracelular de DA estriatal, con niveles mayores en el grupo IND-1415-ASO que en los controles. **D)** La infusión local de veratridina (50 μ M) aumentó la liberación de DA extracelular en mPFC, sin diferencias entre ambos grupos. **E)** La infusión local de nomifensina (10-50 μ M) aumentó de manera dosis-dependiente la concentración extracelular de DA cortical en el grupo control y el tratado con IND-1415-ASO, sin diferencias entre ambos. **F)** La infusión local de anfetamina (10-100 μ M) aumentó de manera dosis-dependiente la concentración extracelular de DA cortical en el grupo control y en el tratado con IND-1415-ASO, sin diferencias grupos. Los valores representan la media \pm SEM, n=5-6 ratones/grupo. **p<0.01, ***p<0.001 vs grupo inyectado con vehículo.

En cada experimento de microdiálisis también se cuantificó simultáneamente el metabolito de DA, DOPAC, en cada una de las fracciones dializadas. La concentración basal de DOPAC extracelular en mPFC y CPu no mostró diferencias entre los grupos inyectados con vehículo ni con IND-1415-ASO en ninguna de las condiciones empleadas (**Tabla 9**). El test *t* de Student no reveló diferencias estadísticas en la mPFC (LCR: $t=1.388$, $p=0.2026$; LCR+DMSO: $t=0.3778$, $p=0.7154$) ni el CPu (LCR: $t=1.292$, $p=0.2323$; LCR+DMSO: $t=0.5803$, $p=0.5777$).

Tabla 9. Niveles basales de DOPAC extracelular en mPFC y CPu evaluados por microdiálisis intracerebral en el modelo de silenciamiento por IND-1415-ASO

GRUPO	CONDICIONES	DOPAC BASAL (mPFC)	DOPAC BASAL (CPu)
Vehículo	LCR	0.29 ± 0.08 (n=5)	1.44 ± 0.45 (n=5)
	LCR + DMSO 1%	0.14 ± 0.02 (n=5)	1.95 ± 0.36 (n=5)
IND-1415-ASO	LCR	0.17 ± 0.04 (n=5)	0.82 ± 0.18 (n=5)
	LCR + DMSO 1%	0.17 ± 0.07 (n=5)	2.29 ± 0.47 (n=5)

Los valores representan la media de los valores basales ± SEM, expresados en fmol DOPAC por fracción dializada de 20 min. La *n* indica el número de ratones utilizados en cada caso.

En CPu, la infusión de veratridina (50 µM) provocó una disminución de los niveles de DOPAC similar en el grupo control (~60%) y en el grupo IND-1415-ASO (~78%), respecto a los niveles basales (**Figura 34A**); el ANOVA de 2 vías junto al test *post hoc* de Bonferroni mostró diferencias por efecto de tiempo ($F_{(2,14)}=8.336$, $p=0.0041$) pero no por efecto grupo ($F_{(1,7)}=0.2520$, $p=0.6311$) ni por interacción grupo-tiempo ($F_{(2,14)}=1.407$, $p=0.2774$). La infusión de nomifensina (1-10 µM) no provocó una respuesta dosis-dependiente en los niveles de DOPAC, ni en el grupo control (76–76%) ni en el IND-1415-ASO (76–77%) (**Figura 34B**); el ANOVA de 2 vías mostró un efecto de tiempo ($F_{(2,12)}=4.956$, $p=0.0270$) pero no efecto grupo ($F_{(1,6)}=0.0976$, $p=0.7653$) ni interacción grupo-tiempo ($F_{(2,12)}=0.0637$, $p=0.9386$). Igualmente, la infusión de anfetamina (1-10 µM) tampoco condujo a una respuesta dosis-dependiente de los niveles de DOPAC respecto a los basales, ni en el grupo control (97–96%) ni en el tratado con IND-1415-ASO (69–81%) (**Figura 34C**); el test ANOVA de 2 vías no mostró diferencias estadísticas por efecto de grupo ($F_{(1,7)}=0.7661$, $p=0.4104$), por tiempo ($F_{(2,14)}=0.9720$, $p=0.4024$) ni por interacción grupo-tiempo ($F_{(2,14)}=0.6769$, $p=0.5241$).

En la mPFC, la infusión de veratridina (50 µM) provocó una disminución de los niveles de DOPAC similar en el grupo control (~90%) y en el grupo IND-1415-ASO (~87%), respecto a los niveles basales (**Figura 34D**); el ANOVA de 2 vías no mostró diferencias por efecto grupo ($F_{(1,7)}=0.0063$, $p=0.9389$), por efecto tiempo ($F_{(2,14)}=3.254$, $p=0.0691$) ni por interacción grupo-tiempo ($F_{(2,14)}=0.0452$, $p=0.9560$). La infusión de nomifensina (10-50 µM) no provocó una respuesta dosis-dependiente en los niveles de DOPAC, ni en el grupo control (66–69%) ni en el IND-1415-ASO (94–54%) (**Figura 34E**); el ANOVA de 2 vías no mostró diferencias por efecto de grupo ($F_{(1,8)}=0.3590$, $p=0.5656$), por efecto de tiempo ($F_{(2,16)}=3.583$, $p=0.0518$) ni

interacción grupo-tiempo ($F_{(2,16)}=0.2566$, $p=1.483$). Igualmente, la infusión de amfetamina (10-100 μM) no condujo a una respuesta dosis dependientes de los niveles de DOPAC respecto a los basales, ni en el grupo control (69–74%) ni en el tratado con IND-1415-ASO (92–91%) (**Figura 34F**); el test ANOVA de 2 vías no mostró diferencias estadísticas por efecto de grupo ($F_{(1,8)}=0.5739$, $p=0.4704$), por tiempo ($F_{(2,16)}=1.390$, $p=0.2776$) ni por interacción grupo-tiempo ($F_{(2,16)}=1.099$, $p=0.3571$).

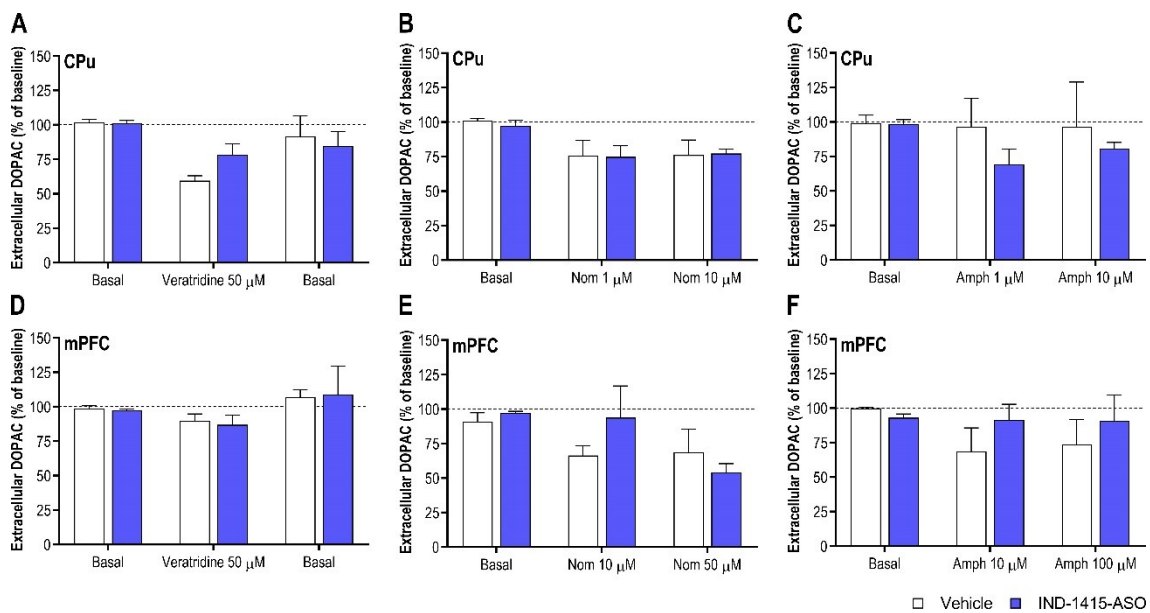


Figura 34. Niveles extracelulares de DOPAC en CPu y mPFC en el modelo IND-1415-ASO. Las gráficas muestran los niveles de DOPAC representados como área bajo la curva. **A,B,C** La infusión en CPu de veratridina (50 μM), nomifensina (1-10 μM) o amfetamina (1-10 μM), respectivamente, no mostró diferencias entre ratones administrados con IND-1415-ASO y vehículo en los niveles de DOPAC extracelular. **D,E,F** La infusión en mPFC de veratridina (50 μM), nomifensina (10-50 μM) o amfetamina (10-100 μM), respectivamente, no mostró diferencias entre ambos grupos en los niveles de DOPAC extracelular. Los valores representan la media \pm SEM, $n=5-6$ ratones/grupo.

D. ESTUDIO PILOTO: REDUCCIÓN SOSTENIDA DE LA EXPRESIÓN DE γ -SINUCLEÍNA EN LOS NÚCLEOS MONOAMINÉRGICOS POR LA ADMINISTRACIÓN INTRACEREBROVENTRICULAR DE IND-1415-ASO

Después de la caracterización del efecto de la reducción de γ -Syn sobre la neurotransmisión DA inducida por la aplicación local de IND-1415-ASO en la SNc/VTA, decidimos llevar a cabo un experimento piloto de silenciamiento sostenido de γ -Syn en los núcleos monoaminérgicos, para analizar en estudios futuros sus consecuencias sobre la neurotransmisión monoaminérgica (DA, 5-HT y NA) y el comportamiento.

Para ello, dos grupos de ratones fueron implantados con minibombas osmóticas para la administración por vía intracerebroventricular de IND-1415-ASO a una dosis de 60 μ g por día durante de 7 y 14 días, respectivamente. Los ratones fueron sacrificados 24 h después de finalizar el tratamiento y se evaluó el perfil de expresión de γ -Syn en los tres núcleos monoaminérgicos, SNc/VTA, DR y LC. Mediante ISH, detectamos una reducción significativa de la expresión del transcrito de γ -Syn en las diferentes áreas cerebrales comparadas con el grupo control tratado con vehículo (**Figura 35A**). En los dos tiempos de tratamiento, los niveles de expresión de γ -Syn en estas áreas fueron los siguientes:

- SNc/VTA: $78.4 \pm 3.6\%$ (7 días) y $74.2 \pm 3.9\%$ (14 días), respecto al grupo control (**Figura 35B**). El análisis ANOVA de 1 vía muestra diferencias estadísticas por efecto de grupo ($F_{(2,18)}=31.96$, $p<0.0001$), con una reducción significativa en los grupos de 7 días ($p<0.0001$) y 14 días ($p<0.0001$), respecto al grupo control; no se detectaron diferencias entre ambos grupos administrados con IND-1415-ASO ($p=0.5694$).
- DR: $59.8 \pm 10.74\%$ (7 días) y $78.3 \pm 8.7\%$ (14 días), en comparación con el grupo control (**Figura 35C**). El ANOVA de 1 vía muestra diferencias por efecto de grupo ($F_{(2,18)}=5.374$, $p=0.0148$), con una reducción significativa de los grupos de 7 días ($p=0.0174$) y 14 días ($p=0.0206$), respecto al grupo control; no se detectaron diferencias estadísticas entre ambos grupos tratados con IND-1415-ASO ($p=0.2277$).

- LC: $79.3 \pm 2.5\%$ (7 días) y $86.5 \pm 3.4\%$ (14 días), respecto al grupo control (**Figura 35D**). El análisis ANOVA mostró diferencias estadísticas por efecto de grupo ($F_{(2,18)}=23.10$, $p<0.0001$), con una reducción significativa de los grupos de 7 días ($p=0.0003$) y 14 días ($p=0.0119$), comparados con el grupo control; no se detectaron diferencias entre ambos grupos tratados con IND-1415-ASO ($p=0.1554$).

Adicionalmente, analizamos estadísticamente los niveles de expresión de γ -Syn en los dos grupos de ratones administrados con IND-1415-ASO durante 7 y 14 días, comparando las diferentes áreas evaluadas. El análisis ANOVA de 2 vías seguido del test *post-hoc* de Tukey reveló diferencias estadísticas por efecto de área ($F_{(2,26)}=4.695$, $p=0.0182$) pero no por efecto de tratamiento ($F_{(1,26)}=2.075$, $p=0.0602$) ni por interacción área-tratamiento ($F_{(2,26)}=3.193$, $p=0.0575$). En el grupo con 7 días de tratamiento, el test de múltiples comparaciones de Tukey reveló diferencias entre SNc/VTA y DR ($p=0.0163$) y entre DR y LC ($p=0.0117$), pero no entre SNc/VTA y LC ($p=0.9882$). En el grupo administrado durante 14 días, el test de múltiples comparaciones no reveló diferencias entre SNc/VTA y DR ($p=0.7997$), DR y LC ($p=0.4349$) ni SNc/VTA y LC ($p=0.1615$).

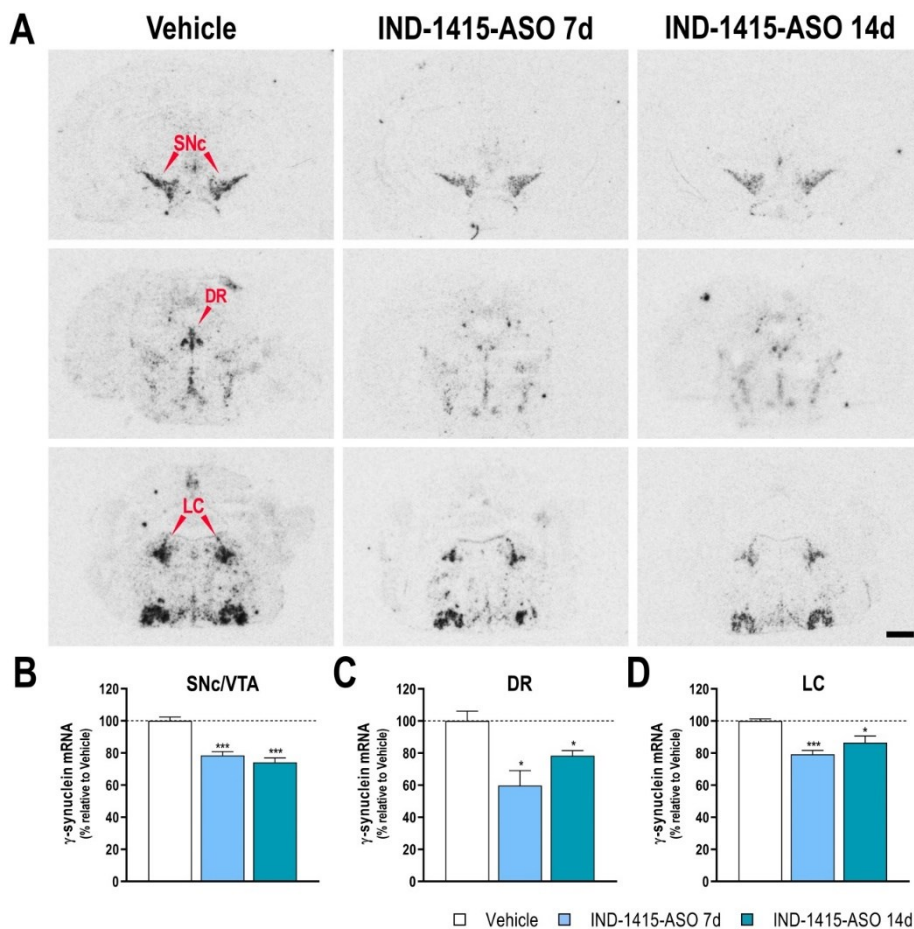


Figura 35. Silenciamiento de γ -Syn en los núcleos monoaminérgicos por la administración intracerebroventricular de IND-1415-ASO. A) Autorradiografía de secciones coronales de cerebro de ratón mostrando la reducción del nivel de transcrito de γ -Syn en SNc/VTA, DR y LC de ratones administrados con IND-1415-ASO durante 7 y 14 días, evaluada mediante ISH. Escala: 1 mm. **B,C,D)** Cuantificación densitométrica de la expresión del transcrito de γ -Syn en SNc/VTA, DR y LC, respectivamente. Las barras muestran una reducción significativa de los niveles de expresión de γ -Syn en los ratones tratados con IND-1415-ASO, en comparación con el grupo inyectado con vehículo. Los valores representan la media \pm SEM, n=5-6 ratones/grupo. *p<0.05, **p<0.01 vs ratones inyectados con vehículo.

Además, y para comprobar la especificidad del silenciamiento sostenido, en los ratones administrados con IND-1415-ASO también evaluamos la expresión de los transcritos de α -Syn y β -Syn en los tres núcleos monoaminérgicos.

Mediante ISH no se observaron cambios en la expresión del mRNA de α -Syn en ninguna de las áreas evaluadas en ninguno de los grupos administrados con IND-1415-ASO. Los niveles de expresión en cada grupo tratado con IND-1415-ASO fueron los siguientes: SNc/VTA, $96.0 \pm 6.9\%$ (7 días) y $105.2 \pm 6.8\%$ (14 días); DR, $88.5 \pm 18.9\%$ (7 días) y $119.5 \pm 20.3\%$ (14 días); LC, $102.0 \pm 7.9\%$ (7 días) y $75.1 \pm 13.7\%$ (14 días), respecto al grupo control (**Figura 36A**). El análisis ANOVA de 1 vía no mostró diferencias estadísticas en ninguna de las áreas, comparando los ratones administrados con IND-1415-ASO y con vehículo (SNc/VTA, $F_{(2,18)}=0.8260$, $p=0.4537$; DR, $F_{(2,18)}=1.034$, $p=0.3756$; LC, $F_{(2,18)}=1.019$, $p=0.3810$).

Por otro lado, evaluando la expresión del transcrito de β -Syn, no observamos cambios en ninguna de las áreas en el grupo administrado con IND-1415-ASO durante 7 días, en comparación con el grupo control, pero sí detectamos un aumento significativo de la expresión de β -Syn en las tres áreas del grupo administrado durante 14 días. Los niveles de expresión de β -Syn en ambos grupos fueron los siguientes: SNc/VTA, $116.3 \pm 10.1\%$ (7 días) y $164.3 \pm 14.0\%$ (14 días); DR, $91.1 \pm 9.1\%$ (7 días) y $140.4 \pm 13.0\%$ (14 días); LC, $103.6 \pm 6.1\%$ (7 días) y $120.1 \pm 7.2\%$ (14 días), respecto al grupo control (**Figura 36B**). El ANOVA de 1 vía mostró diferencias estadísticas por efecto de grupo en las áreas evaluadas (SNc/VTA, $F_{(2,18)}=13.37$, $p=0.0003$; DR, $F_{(2,18)}=7.766$, $p=0.0037$; LC, $F_{(2,18)}=5.006$, $p=0.0187$); mediante las comparaciones múltiples se observan diferencias significativas entre el grupo tratado

durante 14 días y al grupo control (SNc/VTA: $p=0.0002$; DR: $p=0.0058$; LC: $p=0.0156$), pero no entre el grupo tratado durante 7 días y el grupo control (SNc/VTA: $p=0.3689$; DR: $p=0.7331$; LC: $p=0.8263$).

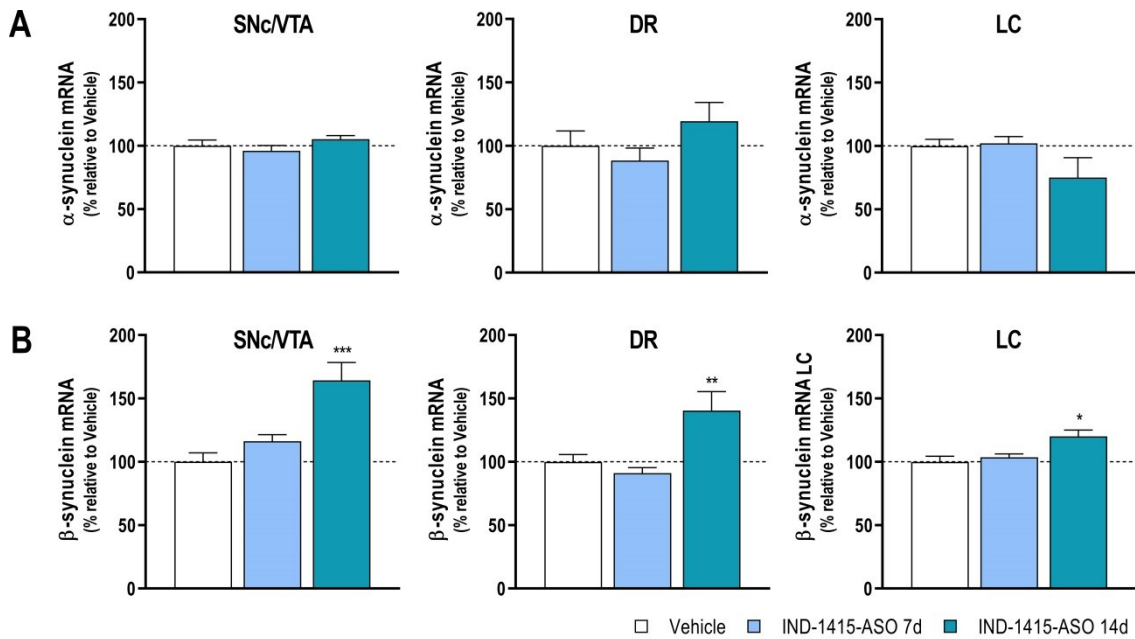


Figura 36. Expresión de α - y β -Syn en los núcleos monoaminérgicos tras la administración intracerebroventricular de IND-1415-ASO. Cuantificación densitométrica de la expresión del transcrito de α -Syn (A) y β -Syn (B) en SNc/VTA, DR y LC de ratones administrados con el IND-1415-ASO durante 7 y 14 días. Las barras muestran un aumento significativo de los niveles de expresión de β -Syn en los ratones tratados con IND-1415-ASO durante 14 días, en comparación con los ratones control. Los valores representan la media \pm SEM, $n=5-6$ ratones/grupo. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ vs ratones inyectados con vehículo.

TRABAJO 2

MODELOS MURINOS TRANSGÉNICOS α SYN*A30P*A53T Y LRRK2*G2019S

1. CARACTERIZACIÓN DEL MODELO MURINO TRANSGÉNICO α SYN*A30P*A53T

En primer lugar, se evaluó el nivel de expresión de ambas formas de α -Syn, murina y humana, en ratones α Syn*A30P*A53T de 4 a 5 meses de edad, así como las posibles alteraciones conductuales y la neurotransmisión DA en comparación con los respectivos grupos control.

A. PERFIL DE EXPRESIÓN DE α -SYN ENDÓGENA Y HUMANA Y DE γ -SYN

Inicialmente, se examinó el **patrón de expresión de la α -Syn murina** en diferentes áreas cerebrales de los ratones transgénicos y los controles. Mediante ISH se detectaron los siguientes niveles de expresión del mRNA de α -Syn endógena en los ratones α Syn*A30P*A53T: mPFC, $95.2 \pm 13.9\%$; CPu, $102.8 \pm 14.8\%$; HPC, $111.9 \pm 13.1\%$; SNc/VTA, $80.3 \pm 14.5\%$; DR, $101.1 \pm 10.9\%$; LC, $87.5 \pm 9.1\%$, en comparación con los niveles de expresión en los ratones controles (**Figura 37**). El análisis *t* de Student no mostró diferencias estadísticas en ninguna de las áreas analizadas, comparando los ratones transgénicos y los WT (mPFC: $t=0.3479$, $p=0.7359$; CPu: $t=0.1914$, $p=0.8525$; HPC: $t=0.9118$, $p=0.3856$; SNc/VTA: $t=1.379$, $p=0.2013$; DR: $t=0.1047$, $p=0.9189$; LC: $t=1.383$, $p=0.2001$).

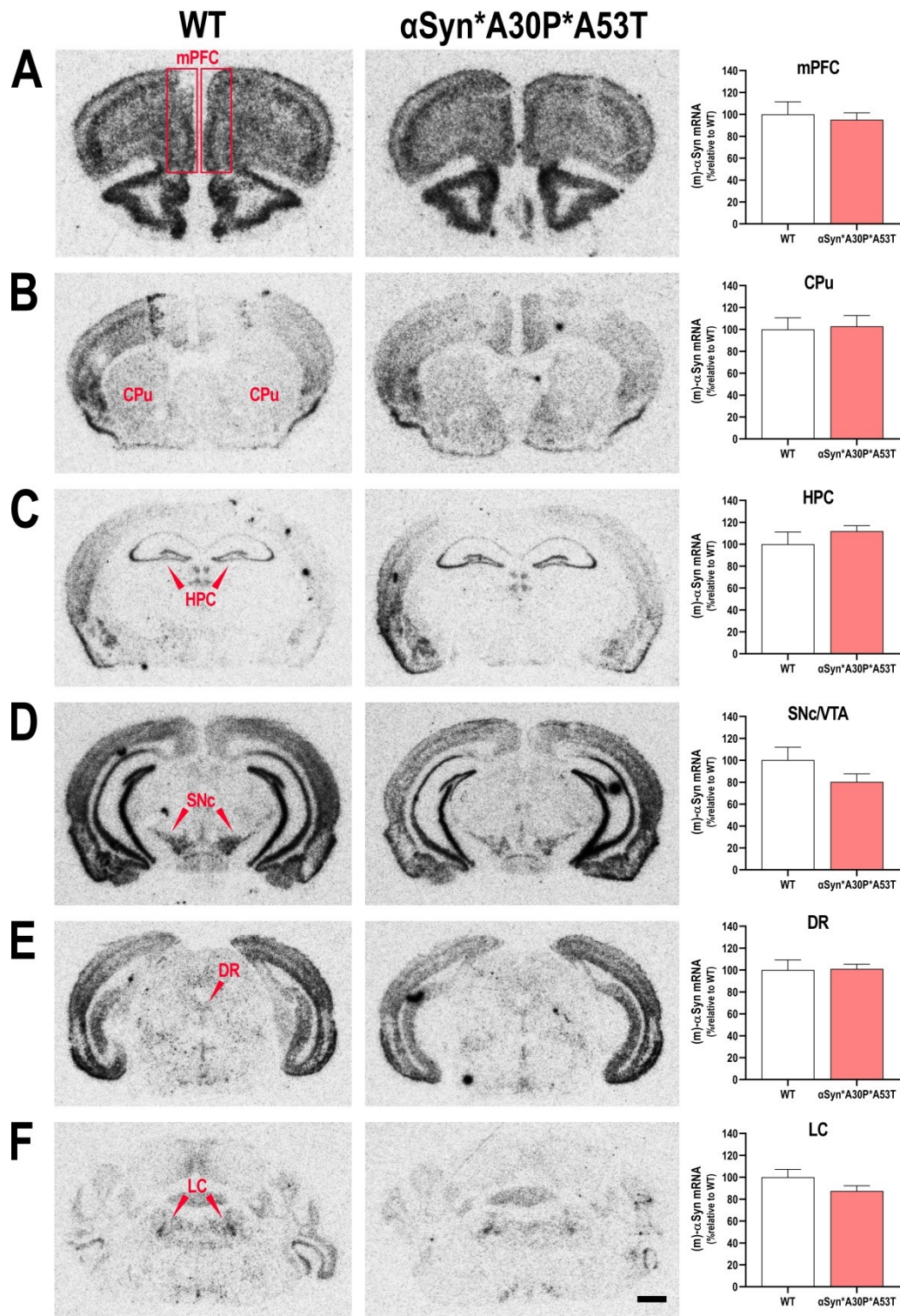


Figura 37. Expresión de la α -Syn endógena en el modelo murino α Syn*A30P*A53T. Autorradiografías de secciones coronales de cerebro de ratón mostrando la expresión de la α -Syn murina en mPFC (A), CPu (B), HPC (C), SNc/VTA (D), DR (E) y LC (F). Escala: 1 mm. Las cuantificaciones densitométricas no muestran diferencias en los niveles de expresión de α -Syn murina en los ratones α Syn*A30P*A53T en comparación con el grupo WT. Los valores representan la media \pm SEM, n=5-6 ratones/grupo.

Además, también se examinó el patrón de expresión de la **forma humana de α -Syn**, (h)- α -Syn, en cortes coronales consecutivos de los ratones α Syn***A30P*****A53T** y WT, mediante ISH (**Figura 21**).

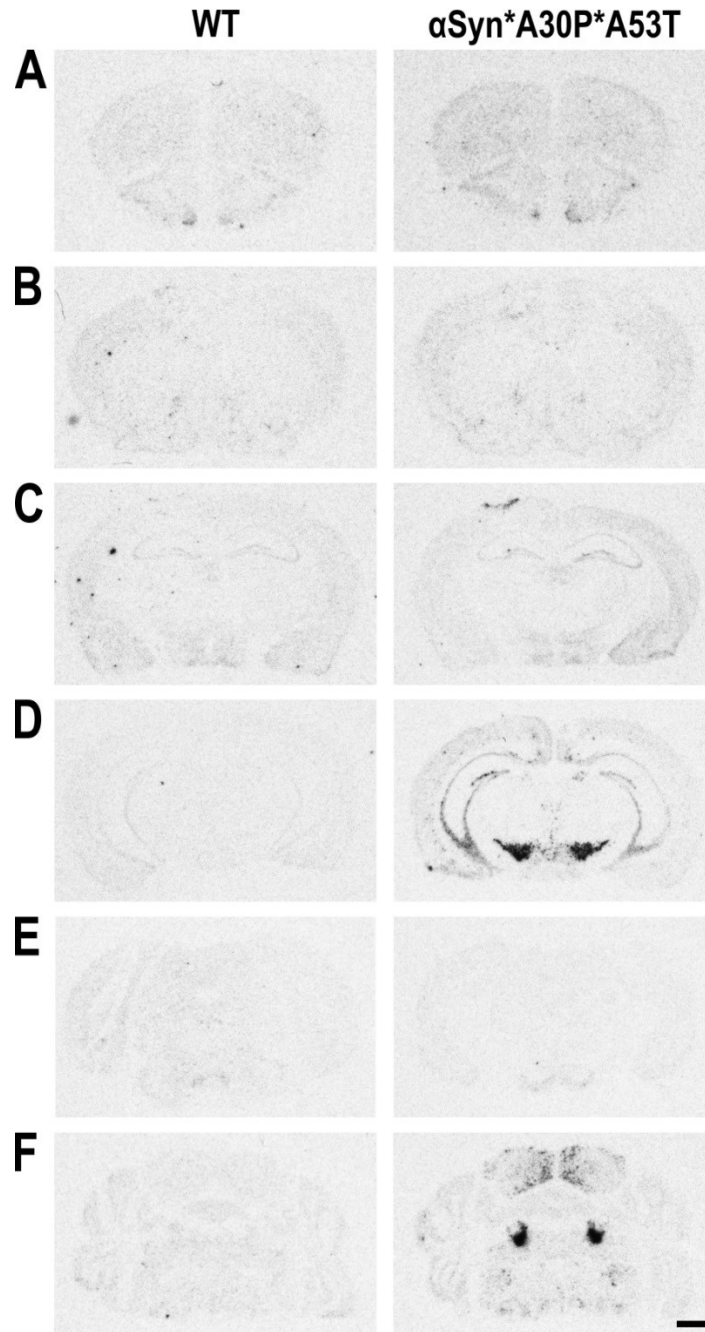


Figura 38. Expresión de (h)- α -Syn en el modelo murino α Syn*A30P*****A53T**.** Autorradiografías de secciones coronales de cerebro de ratón mostrando la expresión de la (h)- α -Syn en mPFC (**A**), CPu (**B**), HPC (**C**), SNc/VTA (**D**), DR (**E**) y LC (**F**). Sólo se detectó expresión de (h)- α -Syn en SNc/VTA y LC de los ratones α Syn***A30P*****A53T**. Escala: 1 mm. Los valores representan la media \pm SEM, n=5-6 ratones/grupo.

Considerando que la expresión del transgén se encuentra bajo el control del promotor de tirosina-hidroxilasa (TH), sólo se ha detectado la expresión del mRNA de la (h)- α -Syn en la SNc/VTA y el LC de los ratones α Syn**A30P***A53T*, mientras que no se ha observado en los ratones WT. Además, comparando la expresión de la α -Syn murina endógena y la (h)- α -Syn transgénica en estas áreas de ratones α Syn**A30P***A53T* se ha detectado un nivel de expresión de (h)- α -Syn entre 3 y 4 veces mayor a la de la forma endógena. Los niveles cuantificados fueron del $316.9 \pm 20.6\%$ en SNc/VTA y del $377.6 \pm 23.3\%$ en LC, en relación a la forma murina de α -Syn (**Figura 39**). El análisis *t* de Student mostró diferencias significativas entre la expresión de ambas formas en las dos áreas analizadas (SNc/VTA: $t=10.52$, $p<0.0001$; LC: $t=11.91$, $p<0.0001$).

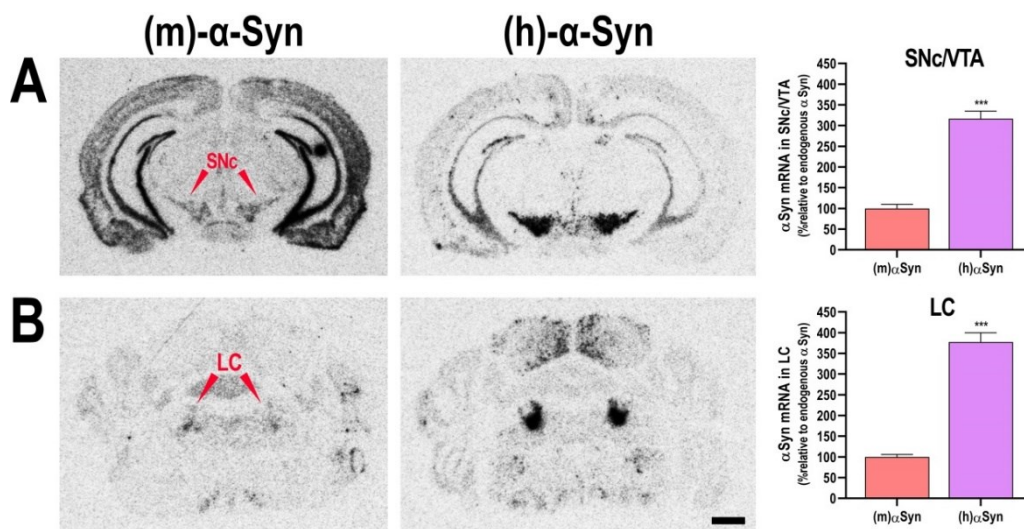


Figura 39. Expresión de las formas endógena y transgénica de α -Syn en el modelo α SynA30P***A53T*.** Autorradiografías de secciones coronales de cerebro de ratón mostrando la expresión de la α -Syn murina y humana en la SNc/VTA (**A**) y LC (**B**). Escala: 1 mm. Las cuantificaciones densitométricas muestran un nivel de expresión de la forma (h)- α -Syn 3-4 veces mayor a la forma murina en las dos áreas analizadas. Los valores representan la media \pm SEM, $n=5-6$ ratones/grupo. *** $p<0.001$ vs expresión de α -Syn murina.

Además, también evaluamos los niveles de expresión de γ -Syn en SNc/VTA y LC de los ratones α Syn**A30P***A53T*, mediante ISH. La **Figura 40** muestra una menor expresión del mRNA de γ -Syn en ambas áreas de los ratones transgénicos, del $80.5 \pm 5.1\%$ y $75.1 \pm 8.7\%$ en SNc/VTA y LC, en comparación con los ratones WT. El análisis *t* de Student mostró una diferencia significativa entre ambos grupos en las dos áreas analizadas (SNc/VTA: $t=3.821$, $p=0.0051$; LC: $t=2.850$, $p=0.0247$).

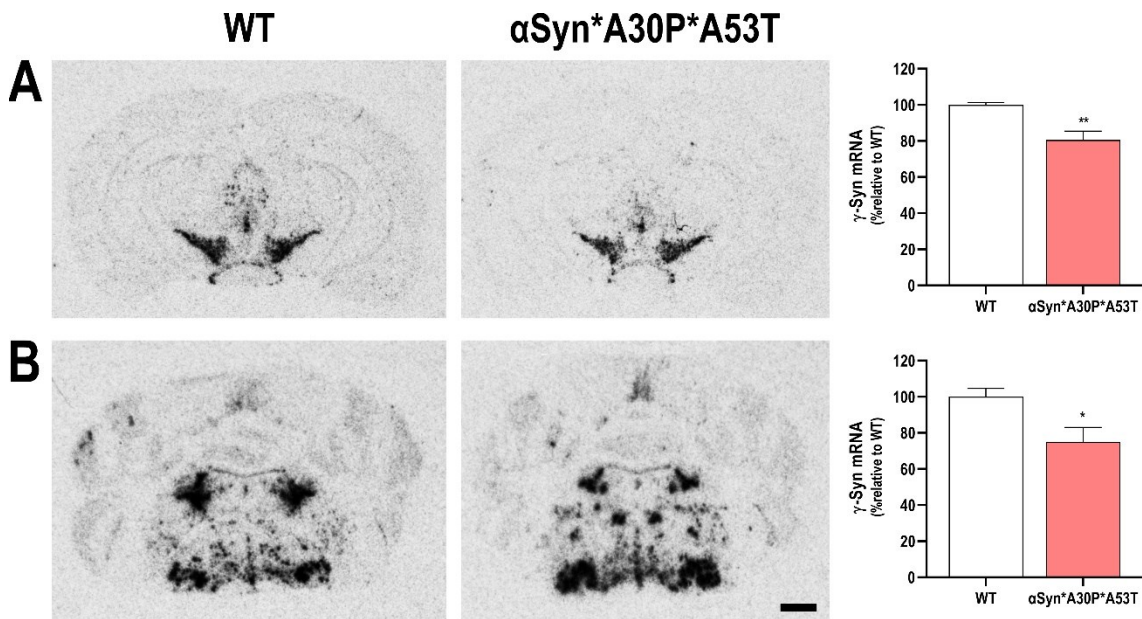


Figura 40. Expresión de la γ -Syn endógena en el modelo murino α Syn*A30P*A53T. Autorradiografías de secciones coronales de cerebro de ratón mostrando la expresión de la γ -Syn endógena en SNc/VTA (A) y LC (B). Escala: 1 mm. Las cuantificaciones densitométricas muestran una menor expresión del transcrito de γ -Syn en ambas áreas. Los valores representan la media \pm SEM, n=5-6 ratones/grupo. *p<0.05, **p<0.001 vs ratones WT.

Por otro lado, también evaluamos la cantidad de células TH⁺ en la SNc/VTA de los ratones α Syn*A30P*A53T. Mediante IHC no detectamos cambios significativos en la cantidad de células en los ratones transgénicos, con una cantidad media de 95.3 \pm 11.1% en relación al grupo WT (Figura 41). El análisis *t* de Student no reveló diferencias estadísticas entre ambos grupos (*t*=0.4253, *p*=0.6855).

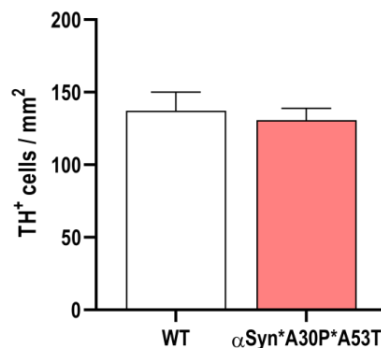


Figura 41. Cantidad de células TH⁺ en la SNc/VTA del modelo murino α Syn*A30P*A53T. No se detectaron diferencias significativas entre el grupo transgénico y el WT. Los valores representan la media \pm SEM, n=5 ratones/grupo.

B. EVALUACIÓN DE LA NEUROTRANSMISIÓN DA EN EL MODELO MURINO α SYN*A30P*A53T

Para evaluar si los ratones con la forma mutada *A30P*A53T de (h)- α Syn presentan alteraciones en la neurotransmisión DA nigroestriatal se llevaron a cabo distintos experimentos de microdiálisis intracerebral en libre movimiento. La **concentración basal de DA extracelular** en CPu no mostró diferencias entre los grupos WT y α Syn*A30P*A53T en ninguna de las condiciones utilizadas (**Tabla 10**). El análisis *t* de Student no mostró diferencias estadísticas con LCR ($t=0.3495$, $p=0.7357$) ni LCR + DMSO ($t=1.526$, $p=0.1530$).

Tabla 10. Niveles basales de DA extracelular en CPu evaluados por microdiálisis intracerebral en el modelo transgénico α Syn*A30P*A53T.

GRUPO	CONDICIONES	DA BASAL (CPu)
WT	LCR	2.9 ± 0.1 (n=6)
	LCR + DMSO 1%	5.0 ± 1.4 (n=6)
α Syn*A30P*A53T	LCR	3.1 ± 0.6 (n=6)
	LCR + DMSO 1%	4.0 ± 1.6 (n=6)

Los valores representan la media de los valores basales ± SEM, expresados en fmol DA por fracción dializada de 20 min. La *n* indica el número de ratones utilizados en cada caso.

La infusión local de veratridina (50 μ M) aumentó la liberación de DA estriatal en ambos grupos. Sin embargo, este incremento fue significativamente menor en los ratones α Syn*A30P*A53T (~3870%) en comparación con los ratones WT (~7888%) (**Figura 42A**). El ANOVA de 2 vías seguido del test *post hoc* de Bonferroni mostró un efecto de tiempo ($F_{(15,135)}=30.57$, $p<0.0001$) y de interacción interacción grupo-tiempo ($F_{(15,135)}=3.695$, $p<0.0001$), pero no efecto de grupo (efecto marginal, $F_{(1,9)}=3.539$, $p=0.0926$).

Además, la administración local de nomifensina (1-10 μ M) por diálisis reversa aumentó de manera dosis-dependiente la concentración extracelular de DA en el CPu de ambos grupos. Estos aumentos fueron similares en los dos grupos de ratones, alcanzando un máximo en el nivel extracelular de DA de ~202% y ~218% en los ratones WT y transgénicos, respectivamente (**Figura 42B**). El análisis ANOVA de 2 vías reveló un efecto

significativo de tiempo ($F_{(17,102)}=4.588$, $p<0.0001$), pero no de grupo ($F_{(1,6)}=0.0009$, $p=0.9774$) ni de interacción grupo-tiempo ($F_{(17,102)}=0.4733$, $p=0.9596$).

Por último, la administración local de anfetamina (1-10 μM) aumentó de modo dosis-dependiente la concentración extracelular de DA en el CPU en ambos grupos de ratones. El aumento en el grupo WT alcanzó un nivel máximo de DA extracelular del $\sim 293\%$ respecto a los valores basales, mientras que el nivel máximo en los ratones $\alpha\text{Syn}^*\text{A30P}^*\text{A53T}$ fue del $\sim 1003\%$ respecto al nivel basal (**Figura 42C**). El análisis ANOVA de 2 vías mostró diferencias por efecto de tiempo ($F_{(17,119)}=7.071$, $p<0.0001$) y por interacción grupo-tiempo ($F_{(17,119)}=3.194$, $p=0.0001$), pero no por efecto de grupo ($F_{(1,7)}=2.638$, $p=0.1483$).

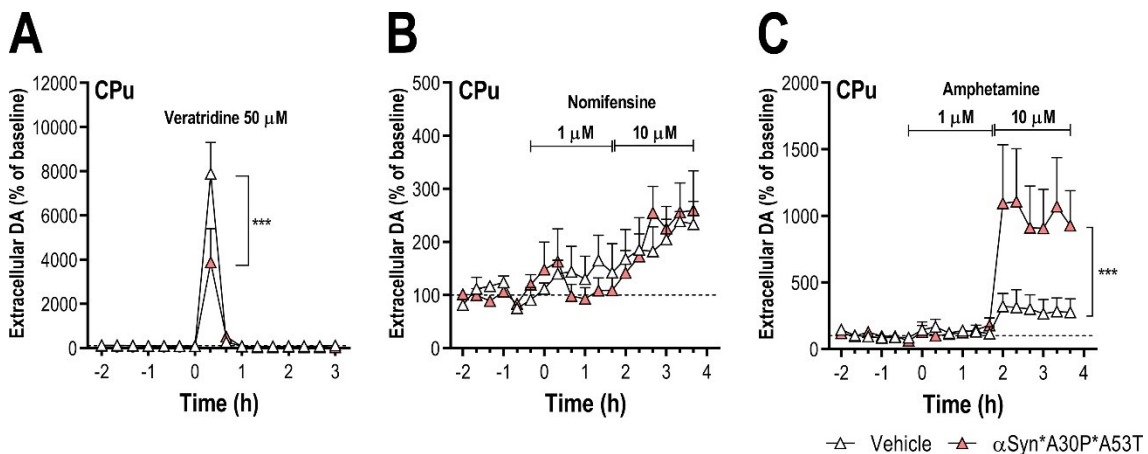


Figura 42. Efectos sobre la neurotransmisión DA nigroestriatal en el modelo $\alpha\text{Syn}^*\text{A30P}^*\text{A53T}$. **A)** La infusión local de veratridina (50 μM) aumentó la liberación de DA extracelular en el CPU, con efectos menos pronunciados en el grupo $\alpha\text{Syn}^*\text{A30P}^*\text{A53T}$ que en los WT. **B)** La infusión local de nomifensina (1-10 μM) aumentó de manera dosis-dependiente la concentración extracelular de DA estriatal, sin diferencias significativas entre ambos grupos. **C)** La infusión local de anfetamina (1-10 μM) aumentó de manera dosis-dependiente la concentración extracelular de DA estriatal, con un efecto significativamente mayor en el grupo $\alpha\text{Syn}^*\text{A30P}^*\text{A53T}$ comparado con los ratones WT. Los valores representan la media \pm SEM, $n=5-6$ ratones/grupo. *** $p<0.001$ vs grupo WT.

Adicionalmente, también medimos la concentración del metabolito DOPAC de cada fracción dializada. La concentración basal de DOPAC extracelular en CPU no mostró diferencias significativas entre ambos grupos en ninguna de las condiciones empleadas (**Tabla 11**), tal como revela el análisis t de Student (LCR: $t=1.106$, $p=0.2973$; LCR+DMSO: $t=0.4453$, $p=0.6666$).

Tabla 11. Niveles basales de DOPAC extracelular en CPu evaluados por microdialísis intracerebral en el modelo transgénico α Syn* $A30P^*A53T$.

GRUPO	CONDICIONES	DOPAC BASAL (CPu)
WT	LCR	1.23 \pm 0.15 (n=6)
	LCR + DMSO 1%	2.53 \pm 0.92 (n=6)
αSyn*$A30P^*A53T$	LCR	0.95 \pm 0.22 (n=6)
	LCR + DMSO 1%	2.04 \pm 0.46 (n=6)

Los valores representan la media de los valores basales \pm SEM, expresados en fmol DOPAC por fracción dializada de 20 min. La *n* indica el número de ratones utilizados en cada caso.

La infusión de veratridina (50 μ M) provocó una disminución de los niveles de DOPAC similar en el grupo WT (~79%) y en el grupo α Syn* $A30P^*A53T$ (~63%), respecto a los niveles basales (**Figura 43A**); el ANOVA de 2 vías junto al test *post hoc* de Bonferroni no mostró diferencias por efecto de grupo ($F_{(1,25)}=0.7963$, $p=0.3807$), por tiempo ($F_{(2,25)}=2.606$, $p=0.0938$) ni por interacción grupo-tiempo ($F_{(2,25)}=0.7122$, $p=0.5003$). La infusión de nomifensina (1-10 μ M) no provocó una respuesta dosis-dependiente en los niveles de DOPAC, ni en los ratones WT (66–54%) ni en los transgénicos (78–72%) (**Figura 43B**); el test ANOVA de 2 vías mostró un efecto de tiempo ($F_{(2,18)}=13.94$, $p=0.0002$) pero no efecto grupo ($F_{(1,9)}=1.001$, $p=0.3433$) ni interacción grupo-tiempo ($F_{(2,18)}=0.9466$, $p=0.4065$). Igualmente, la infusión de amfetamina (1-10 μ M) no condujo a una respuesta dosis-dependiente de los niveles de DOPAC respecto a los basales, ni en el grupo control (74–77%) ni en el α Syn* $A30P^*A53T$ (93–81%) (**Figura 43C**); el ANOVA de 2 vías no mostró diferencias por efecto de grupo ($F_{(1,25)}=0.7875$, $p=0.3833$), por tiempo ($F_{(2,25)}=2.373$, $p=0.1138$) ni por interacción grupo-tiempo ($F_{(2,25)}=0.5214$, $p=0.6000$).

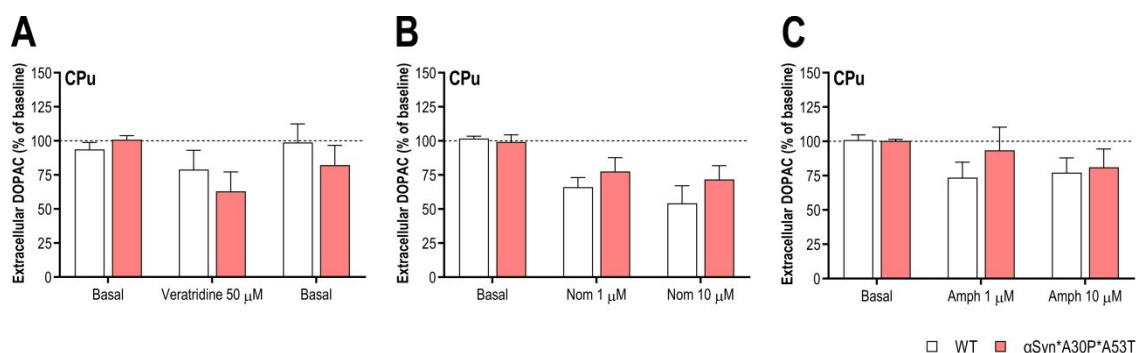


Figura 43. Niveles extracelulares de DOPAC en CPu en el modelo α Syn*A30P*A53T. Las gráficas muestran los niveles de DOPAC representados como área bajo la curva. La infusión en CPu de veratridina 50 μ M (A), nomifensina 1-10 μ M (B) o anfetamina 1-10 μ M (C) no mostró diferencias entre ambos grupos en los niveles de DOPAC extracelular. Los valores representan la media \pm SEM, n=5-6 ratones/grupo.

C. CARACTERIZACIÓN CONDUCTUAL DEL MODELO MURINO α SYN*A30P*A53T

Para examinar si la mutación *A30P*A53T de la proteína (h)- α -Syn se asocia con cambios conductuales, hemos evaluado las funciones motora y cognitivo-emocional utilizando una serie de pruebas comportamentales.

En primer lugar, examinamos la actividad motora en el **test de campo abierto**. La **Figura 44A** muestra que los ratones transgénicos tienen una menor actividad locomotora, significativamente diferente comparada con el grupo WT. Detectamos una disminución significativa en la distancia total recorrida del $68.8 \pm 9.7\%$ respecto a los ratones control, con un tiempo de reposo significativamente mayor ($178.6 \pm 28.2\%$). Además, los ratones transgénicos presentaron reducciones significativas en variables como la velocidad media del movimiento ($77.3 \pm 7.3\%$) y la duración de los movimientos rápidos ($59.5 \pm 15.1\%$), pero no se detectaron cambios en la duración de los movimientos lentos ($92.9 \pm 4.4\%$), en comparación con los ratones WT. El análisis *t* de Student mostró diferencias estadísticas entre los ratones transgénicos y los WT en la distancia total recorrida ($t=3.199$, $p=0.0035$), tiempo de reposo ($t=2.785$, $p=0.0097$), velocidad media del movimiento ($t=3.105$, $p=0.0044$) y duración de los movimientos rápidos ($t=2.675$, $p=0.0125$), pero no en la duración de los movimientos lentos ($t=1.618$, $p=0.1173$).

Además, para comprobar si los ratones α Syn*A30P*A53T presentan una asimetría motora, se llevó a cabo la **prueba del cilindro**. No detectamos diferencias significativas entre los grupos α Syn*A30P*A53T y WT en cuanto al uso de la pata izquierda respecto al total (**Figura 44B**), como reveló el test *t* de Student ($t=0.5610$, $p=0.5798$).

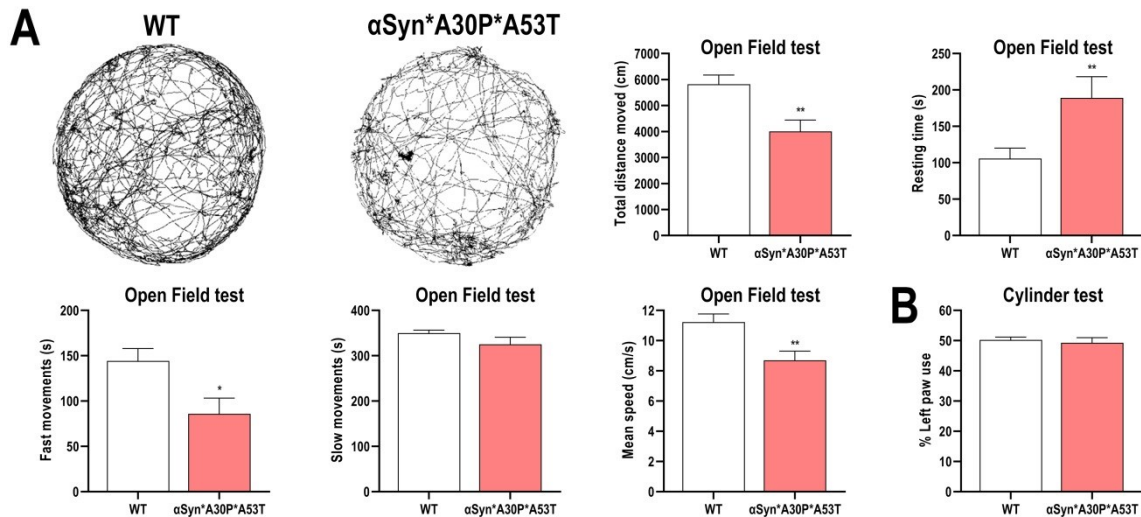


Figura 44. Alteraciones motoras en el modelo $\alpha\text{Syn}^*\text{A30P}^*\text{A53T}$. A) Test de campo abierto. Los ratones muestran una menor actividad locomotora, midiendo la distancia total recorrida, tiempo de reposo, velocidad media y duración de los movimientos rápidos, pero no presentan diferencias en la duración de los movimientos lentos. B) Test del cilindro. No se detectan diferencias en el uso de la pata delantera izquierda en los ratones $\alpha\text{Syn}^*\text{A30P}^*\text{A53T}$. Los valores representan la media \pm SEM, $n=10-15$ ratones/grupo. * $p<0.05$, ** $p<0.01$ vs grupo inyectado con vehículo.

A continuación, evaluamos el comportamiento de tipo ansioso en ambos grupos de ratones mediante el **test de la caja de luz/oscuridad**. La **Figura 45A** muestra que los ratones $\alpha\text{Syn}^*\text{A30P}^*\text{A53T}$ pasaron un tiempo significativamente menor en la cámara iluminada ($69.0 \pm 14.3\%$) respecto a los ratones WT. En otras variables evaluadas no se detectaron diferencias entre ambos grupos; en los ratones $\alpha\text{Syn}^*\text{A30P}^*\text{A53T}$ la latencia hasta el primer cruce fue $106.0 \pm 24.2\%$, y el número de entradas en la cámara iluminada $76.5 \pm 14.8\%$, en relación al grupo WT. El análisis t de Student reveló diferencias significativas entre ambos grupos en el tiempo transcurrido en la cámara iluminada ($t=2.162$, $p=0.0404$), pero no en la latencia hasta el primer cruce ($t=0.2471$, $p=0.8068$) ni en el número de entradas ($t=1.591$, $p=0.1242$).

Además, también examinamos el fenotipo depresivo mediante el **test de suspensión por la cola**. La **Figura 45B** muestra que los ratones transgénicos presentaron un tiempo de inmovilidad del $91.3 \pm 5.9\%$ en relación con los ratones WT. El análisis t de Student no muestra diferencias significativas entre ambos grupos ($t=1.474$, $p=0.1536$).

Por último, utilizamos el **test de reconocimiento de objetos novedosos** para evaluar la memoria a corto plazo en los ratones $\alpha\text{Syn}^*\text{A30P}^*\text{A53T}$, midiendo el tiempo de exploración de ambos objetos. Durante el pre-test, ambos grupos mostraron una preferencia similar por los mismos objetos. En la **Figura 45C** se muestra que los dos grupos exploraron el objeto novedoso durante un tiempo significativamente mayor (WT: $944.5 \pm 191.8\%$; $\alpha\text{Syn}^*\text{A30P}^*\text{A53T}$: $1016.2 \pm 168.7\%$), en comparación con el tiempo de exploración del objeto familiar; el test ANOVA de 2 vías muestra diferencias estadísticas por efecto de objeto ($F_{(1,59)}=48.31$, $p<0.001$), pero no por efecto de grupo ($F_{(1,59)}=0.8320$, $p=0.3654$) ni por interacción grupo–objeto ($F_{(1,59)}=0.6327$, $p=0.4295$). Además, los ratones $\alpha\text{Syn}^*\text{A30P}^*\text{A53T}$ mostraron un índice de discriminación del objeto novedoso del $128.1 \pm 16.5\%$ respecto al grupo WT, y mediante el test *t* de Student no se detectan diferencias significativas entre ambos grupos ($t=1.699$, $p=0.1017$).

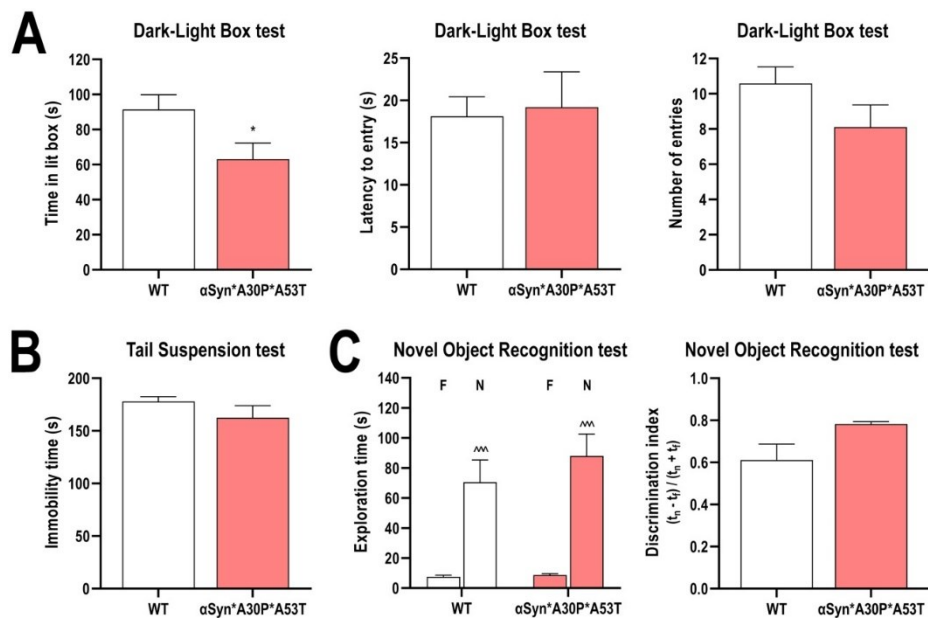


Figura 45. Alteraciones cognitivo-emocionales en el modelo $\alpha\text{Syn}^*\text{A30P}^*\text{A53T}$. A)

Test de la caja de luz/oscuridad. Los ratones transgénicos pasaron un menor tiempo en la cámara iluminada en comparación con el grupo WT, pero no mostraron diferencias en la latencia de entrada ni el número de entradas. **B)** Test de suspensión por la cola. No se detectaron diferencias en el tiempo de inmovilidad entre ambos grupos de ratones. **C)** Test de reconocimiento de objetos novedosos. Ambos grupos de ratones mostraron una mayor preferencia por el objeto novedoso con tiempos de exploración similares, y no se detectaron diferencias entre ambos grupos en el índice de discriminación entre objetos. F = Objeto familiar, N = Objeto novedoso. Los valores representan la media \pm SEM, $n=10-15$ ratones/grupo. * $p<0.05$, ** $p<0.01$ vs grupo WT; ^^^ $p<0.001$ vs objeto familiar.

2. EFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN INTRACEREBROVENTRICULAR DE IND-1233-ASO CONTRA α -SINUCLEÍNA EN EL MODELO α Syn*A30P*A53T

Una vez caracterizado el modelo transgénico α Syn*A30P*A53T desde un punto de vista histológico, neuroquímico y conductual, evaluamos la eficacia del tratamiento con IND-1233-ASO para reducir la expresión de la forma mutada *A30P*A53T de (h)- α Syn. Previamente, la molécula IND-1233-ASO fue evaluada en ratones normales y en monos Rhesus envejecidos, y en ambos modelos animales esta secuencia fue eficaz para silenciar la expresión de α -Syn selectivamente en las neuronas monoaminérgicas (Alarcón-Arís *et al.*, 2018; 2020 *en revisión*). La secuencia del oligonucleótido 1233-ASO fue diseñada de tal modo que muestra homología para el mRNA de α -Syn de ratón, rata, mono y humano (Alarcón-Arís *et al.*, 2018). Por lo tanto, para evaluar la eficacia de IND-1233-ASO en el modelo α Syn*A30P*A53T, dos grupos de ratones transgénicos fueron administrados aleatoriamente con LCR o con IND-1233-ASO (100 μ g/día) en el ventrículo lateral durante 28 días utilizando minibombas osmóticas. Al finalizar el tratamiento se evaluó la eficacia de reducción de la expresión de (h)- α Syn, la función DA y el fenotipo conductual.

A. REDUCCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LA FORMA HUMANA DE α -SINUCLEÍNA EN EL MODELO α SYN*A30P*A53T INDUCIDA POR IND-1233-ASO

El tratamiento con IND-1233-ASO (100 μ g/día) durante 28 días redujo significativamente la expresión del mRNA de (h)- α Syn en SNc/VTA de los ratones α Syn*A30P*A53T en comparación comparado con el grupo de ratones transgénicos que recibió vehículo (**Figura 46A**). La disminución de los niveles del mRNA de (h)- α Syn en SNc/VTA fue de $61.2 \pm 1.8\%$, pero no se detectaron cambios en la expresión de α -Syn endógena en SNc/VTA, que tuvo niveles del $134.1 \pm 12.8\%$ respecto al grupo administrado con vehículo (**Figura**

46C). El análisis ANOVA de 2 vías seguido del test *post-hoc* de Tukey reveló diferencias significativas por efecto de tratamiento ($F_{(1,12)}=10.16$, $p=0.0078$), por efecto de ortólogo de α -Syn ($F_{(1,12)}=98.66$, $p<0.0001$) y por interacción tratamiento-ortólogo ($F_{(1,12)}=31.78$, $p=0.0001$). Además, las comparaciones múltiples revelaron diferencias en la expresión de (h)- α -Syn entre los grupos tratados con vehículo y con IND-1233-ASO ($p=0.0002$), pero no en la expresión de α -Syn murina entre ambos grupos ($p=0.3501$).

De modo similar, el tratamiento con IND-1233-ASO también redujo significativamente la expresión de (h)- α -Syn en LC de los ratones α Syn*A30P*A53T, en comparación con aquellos administrados con vehículo (**Figura 46B**). La disminución del mRNA de (h)- α -Syn fue de $76.5 \pm 7.1\%$, pero tampoco se detectaron cambios en el mRNA de la α -Syn endógena en LC, con niveles del $126.7 \pm 8.5\%$ (**Figura 46D**). El análisis ANOVA de 2 vías reveló diferencias significativas por efecto de ortólogo de α -Syn ($F_{(1,12)}=141.8$, $p<0.0001$) y por interacción tratamiento-ortólogo ($F_{(1,12)}=9.769$, $p=0.0088$), pero no por efecto de tratamiento ($F_{(1,12)}=2.815$, $p=0.1192$). Las comparaciones múltiples revelaron diferencias en la expresión de (h)- α -Syn entre los grupos tratados con vehículo y con IND-1233-ASO ($p=0.0237$), pero no en la expresión de α -Syn murina entre ambos grupos ($p=0.7392$).

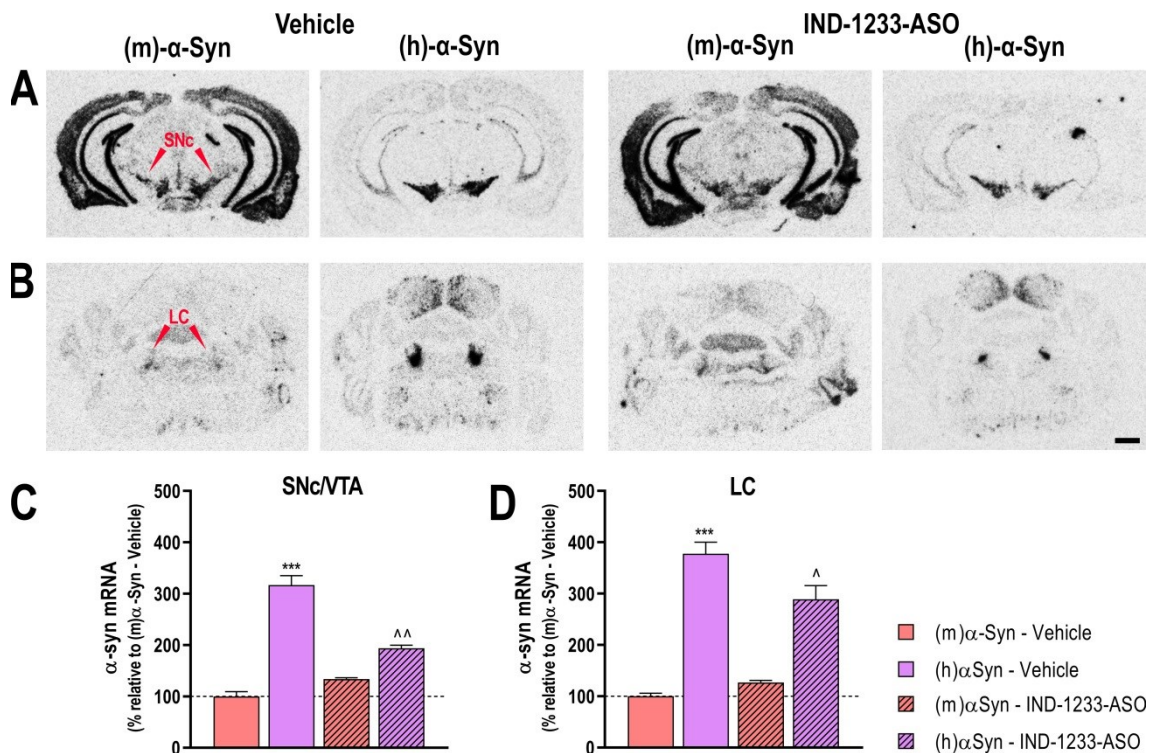


Figura 46. Efectos de la administración de IND-1233-ASO en el modelo α Syn*A30P*A53T. A,B) Autorradiografías de secciones coronales de cerebro de ratón mostrando la expresión de la α -Syn murina y la humana mutada en la SNc/VTA y LC, respectivamente, de grupos de ratones α Syn*A30P*A53T tratados con vehículo y con IND-ASO-1233. Escala: 1 mm. C,D) Cuantificación densitométrica en la SNc/VTA y el LC, respectivamente. Las barras muestran una reducción significativa en la expresión de (h)- α -Syn tras el tratamiento, pero no muestran cambios en la expresión de la forma endógena de α -Syn, en comparación con el grupo tratado con vehículo. Los valores representan la media \pm SEM, n=5-6 ratones/grupo. *p<0.05, **p<0.01 vs expresión de (m)- α -Syn en grupo LCR, ^p<0.05, ^^p<0.01 vs expresión de (h)- α -Syn en grupo administrado con vehículo.

El análisis de la proteína (h)- α -Syn sólo se llevó a cabo en la SNc/VTA de los ratones α Syn*A30P*A53T tratados con vehículo o IND-1233-ASO mediante IHC, utilizando un anticuerpo específico para (h)- α -Syn (**Figura 47A**). En los ratones transgénicos tratados con IND-1233-ASO se apreció una reducción del número de células positivas para (h)- α -Syn, de $84.2 \pm 5.2\%$ en comparación con los ratones administrados con vehículo (**Figura 47B**); mediante el test *t* de Student se apreció una diferencia significativa entre ambos grupos ($t=3.035$, $p=0.0230$). Además, en las células positivas para (h)- α -Syn de los ratones tratados con IND-1233-ASO también se detectó una disminución de la intensidad del marcaje por IHC, de $84.3 \pm 2.2\%$ en relación al grupo administrado con vehículo (**Figura 47C**); el análisis *t* de Student mostró diferencias estadísticas entre ambos grupos ($t=7.163$, $p=0.0004$).

Por otra parte, también se llevó a cabo la detección de las células TH⁺ en la SNc/VTA de los ratones α Syn*A30P*A53T tratados con IND-1233-ASO y vehículo, mediante IHC. En este caso, no se detectaron cambios en el número de células TH⁺ en los ratones α Syn*A30P*A53T tratados con IND-1233-ASO ($118.1 \pm 10.7\%$), en comparación con el grupo administrado con vehículo ($100.0 \pm 6.0\%$) (**Figura 47D**). El test *t* de Student no mostró diferencias significativas entre ambos grupos ($t=1.473$, $p=0.1912$).

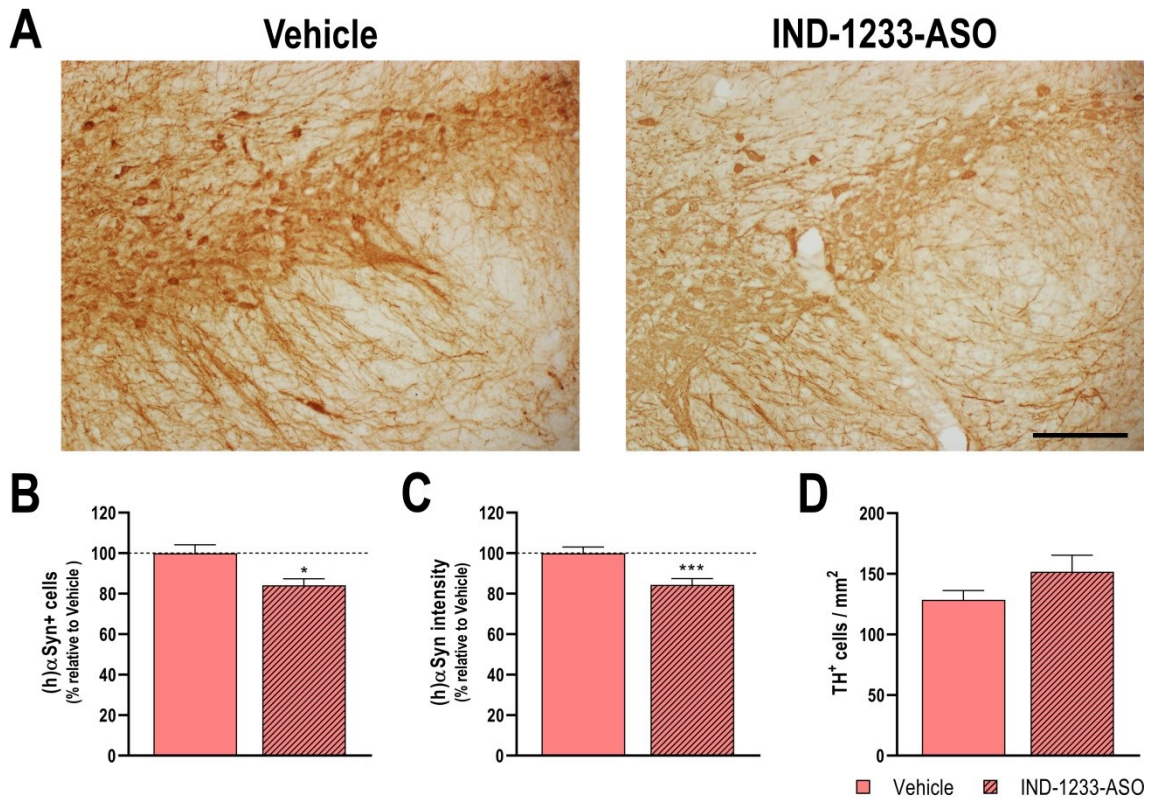


Figura 47. Reducción de la proteína (h)-α-Syn por la administración de IND-1233-ASO en el modelo αSyn* A30P* A53T. **A)** Imágenes de microscopía óptica mostrando la localización por IHC de (h)-α-Syn en la SNc/VTA de dos grupos de ratones del modelo αSyn* A30P* A53T administrados con vehículo o IND-1233-ASO. Escala: 100 μm. **B)** Cuantificación de células positivas para (h)-α-Syn en la SNc/VTA. Las barras muestran una reducción de las células (h)-α-Syn⁺ en el grupo tratado con IND-1233-ASO en comparación con el grupo tratado con vehículo. **C)** Cuantificación de la intensidad del marcaje por IHC contra (h)-α-Syn en la SNc/VTA. Las barras muestran una reducción significativa de la intensidad en el grupo administrado con IND-1233-ASO, en relación con el grupo administrado con vehículo. **D)** Cuantificación de las células TH⁺ en la SNc/VTA de los ratones αSyn* A30P* A53T tratados con vehículo o IND-1233-ASO; no se detectaron diferencias significativas entre ambos grupos. Los valores representan la media ± SEM, n=5 ratones/grupo. *p<0.05, ***p<0.001 grupo administrado con vehículo.

B. EL TRATAMIENTO CON IND-1233-ASO MODIFICÓ LA NEUROTRANSMISIÓN DA EN EL MODELO α SYN*A30P*A53T

En los ratones α Syn*A30P*A53T administrados con IND-1233-ASO y vehículo se llevaron a cabo experimentos de microdialísis para evaluar el efecto del tratamiento sobre la neurotransmisión DA en el CPu. La **concentración basal de DA extracelular** no mostró diferencias entre ambos grupos en ninguna de las condiciones utilizadas (**Tabla 12**). El análisis *t* de Student no mostró diferencias estadísticas con LCR ($t=0.8557$, $p=0.4550$) ni LCR + DMSO ($t=0.0009$, $p=0.9932$).

Tabla 12. Niveles basales de DA extracelular en CPu evaluados por microdialísis intracerebral en los ratones α Syn*A30P*A53T administrados con IND-1233-ASO y vehículo.

GRUPO	CONDICIONES	DA BASAL (CPU)
Vehículo	LCR	2.7 ± 0.3 (n=5)
	LCR + DMSO 1%	4.6 ± 1.6 (n=5)
IND-1233-ASO	LCR	3.1 ± 0.6 (n=5)
	LCR + DMSO 1%	3.6 ± 1.2 (n=5)

Los valores representan la media de los valores basales ± SEM, expresados en fmol DA por fracción dializada de 20 min. La *n* indica el número de ratones utilizados en cada caso.

La infusión local de veratridina (50 μ M) aumentó la liberación de DA estriatal en ambos grupos. Este aumento fue significativamente mayor en los ratones α Syn*A30P*A53T tratados con IND-1233-ASO (~5248%) en comparación con el grupo tratado con vehículo (~2062%) (**Figura 48A**). El análisis ANOVA de 2 vías seguido del test *post hoc* de Bonferroni mostró diferencias por efecto de tiempo ($F_{(15,80)}=10.23$, $p<0.0001$) y por interacción grupo-tiempo ($F_{(15,80)}=2.021$, $p=0.0235$), pero no por efecto de grupo ($F_{(1,80)}=2.416$, $p=0.1240$).

Por otro lado, la administración local de amfetamina (1-10 μ M) aumentó de modo dosis-dependiente de la concentración extracelular de DA en el CPu. El aumento en el grupo tratado con vehículo alcanzó un nivel máximo del ~626% respecto a sus valores basales, mientras que el nivel máximo en los ratones tratados con IND-1233-ASO fue del ~166% (**Figura 48B**). El ANOVA de 2 vías reveló diferencias entre ambos grupos por efecto de

tiempo ($F_{(17,68)}=6.225$, $p<0.0001$) y por interacción grupo-tiempo ($F_{(17,86)}=3.172$, $p=0.0004$), pero no por efecto de grupo ($F_{(1,4)}=3.250$, $p=0.1458$).

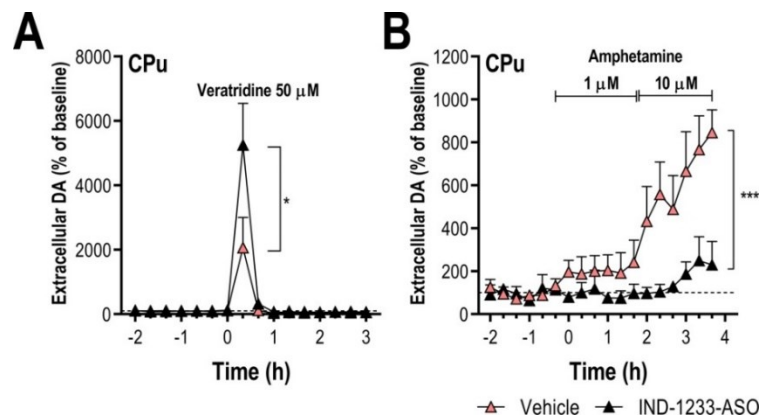


Figura 48. Efectos de la administración de IND-1233-ASO en la neurotransmisión DA nigroestriatal del modelo α Syn* A30P* A53T. **A)** La infusión local de veratridina (50 μ M) aumentó la liberación de DA extracelular en el CPU, con efectos menos pronunciados en los ratones tratados con IND-1233-ASO que en los que recibieron vehículo. **B)** La infusión local de anfetamina (1-10 μ M) aumentó de manera dosis-dependiente la concentración extracelular de DA estriatal, con un efecto significativamente menor en el grupo tratado con IND-1233-ASO que en el administrado con vehículo. Los valores representan la media \pm SEM, $n=5$ ratones/grupo. * $p<0.05$, *** $p<0.001$ vs grupo α Syn* A30P* A53T administrado con vehículo.

Adicionalmente, también cuantificamos la concentración de DOPAC de cada fracción dializada. La concentración basal de DOPAC extracelular en CPU no mostró diferencias entre ambos grupos en ninguna condición utilizada (**Tabla 13**), tal como revela el análisis *t* de Student (LCR: $t=2.729$, $p=0.0525$; LCR+DMSO: $t=2.190$, $p=0.0937$).

La infusión de veratridina (50 μ M) no provocó una variación significativa de los niveles de DOPAC en ninguno de los grupos, respecto a los niveles basales (**Figura 49A**); el ANOVA de 2 vías no mostró diferencias por efecto de grupo ($F_{(1,4)}=0.0088$, $p=0.9300$), por tiempo ($F_{(2,8)}=2.300$, $p=0.1625$) ni por interacción grupo-tiempo ($F_{(2,8)}=0.1723$, $p=0.8448$). Igualmente, la infusión de anfetamina (1-10 μ M) no condujo a una respuesta dosis-dependiente de los niveles de DOPAC respecto a los basales en ninguno de los grupos (**Figura 49B**); el ANOVA de 2 vías no mostró diferencias por efecto de grupo ($F_{(1,4)}=0.3045$, $p=0.6104$), por tiempo ($F_{(2,8)}=1.816$, $p=0.2238$) ni por interacción grupo-tiempo ($F_{(2,4)}=0.3978$, $p=0.6844$).

Tabla 13. Niveles basales de DOPAC extracelular en CPu evaluados por microdialísis intracerebral en los ratones α Syn**A30P***A53T* administrados con IND-1233-ASO y vehículo

GRUPO	CONDICIONES	DOPAC BASAL (CPu)
Vehículo	LCR	1.01 ± 0.15 (n=5)
	LCR + DMSO 1%	1.54 ± 0.22 (n=5)
IND-1233-ASO	LCR	0.39 ± 0.2 (n=5)
	LCR + DMSO 1%	0.79 ± 0.16 (n=5)

Los valores representan la media de los valores basales ± SEM, expresados en fmol DOPAC por fracción dializada de 20 min. La *n* indica el número de ratones utilizados en cada caso.

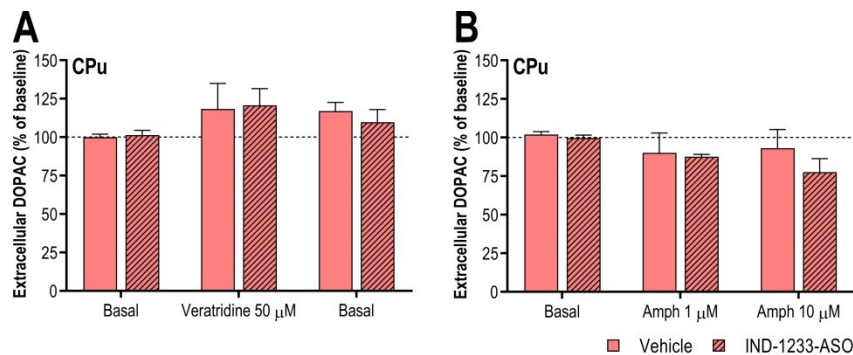


Figura 49. Niveles extracelulares de DOPAC en CPu en los ratones α Syn**A30P***A53T* tratados con IND-1233-ASO o vehículo. Las gráficas muestran los niveles de DOPAC representados como área bajo la curva. La infusión en CPu de veratridina 50 μM (A), o anfetamina 1-10 μM (B) no mostró diferencias entre ambos grupos en los niveles de DOPAC extracelular. Los valores representan la media ± SEM, n=5 ratones/grupo.

C. EL TRATAMIENTO CON IND-1233-ASO NO MODIFICÓ EL DÉFICIT MOTOR NI EL COMPORTAMIENTO DE TIPO ANSIOSO EN EL MODELO α SYN*A30P*A53T

En los ratones α Syn*A30P*A53T administrados con IND-1233-ASO y vehículo también se llevaron a cabo pruebas de comportamiento para comprobar el efecto del tratamiento sobre el fenotipo conductual.

En el **test de campo abierto** comprobamos que el tratamiento con IND-1233-ASO durante 28 días no fue capaz de revertir los déficits motores en los ratones α Syn*A30P*A53T. La **Figura 50A** muestra que los ratones administrados con IND-1233-ASO presentaron una actividad motora similar, con una distancia total recorrida de $90.3 \pm 11.2\%$ y un tiempo de reposo de $109.4 \pm 13.1\%$ en comparación con el grupo administrado con vehículo. El grupo tratado con IND-1233-ASO también presentó niveles similares al vehículo en el resto de variables cuantificadas: duración de los movimientos rápidos ($81.5 \pm 26.0\%$) y movimientos lentos ($96.3 \pm 7.4\%$), y velocidad media ($93.1 \pm 6.5\%$). El análisis *t* de Student no mostró diferencias significativas entre ambos grupos en ninguna de las variables analizadas: distancia total ($t=0.8585$, $p=0.4107$), tiempo de reposo ($t=0.7182$, $p=0.4891$), duración de movimientos rápidos ($t=0.7110$, $p=0.4933$) y lentos ($t=0.5087$, $p=0.6220$) y velocidad media ($t=1.056$, $p=0.3158$).

También evaluamos el comportamiento de tipo ansioso en ambos grupos de ratones mediante el **test de la caja de luz/oscuridad**, pero el tratamiento con IND-1233-ASO no fue capaz de revertir este fenotipo en los ratones α Syn*A30P*A53T. La **Figura 50B** muestra que los ratones α Syn*A30P*A53T administrados con IND-1233-ASO pasaron un tiempo similar en la cámara iluminada que los administrados con vehículo, del $110.0 \pm 27.0\%$. Además, tampoco detectamos cambios en los ratones administrados con IND-1233-ASO en la latencia hasta la primera entrada ($137.3 \pm 18.6\%$) ni el número de entradas ($58.4 \pm 30.9\%$), en comparación con los tratados con vehículo. El test *t* de Student no reveló diferencias estadísticas entre ambos grupos en el tiempo en la cámara iluminada ($t=0.1743$, $p=0.8651$), la latencia hasta la primera entrada ($t=2.005$, $p=0.0850$) ni el número de entradas ($t=1.346$, $p=0.2151$).

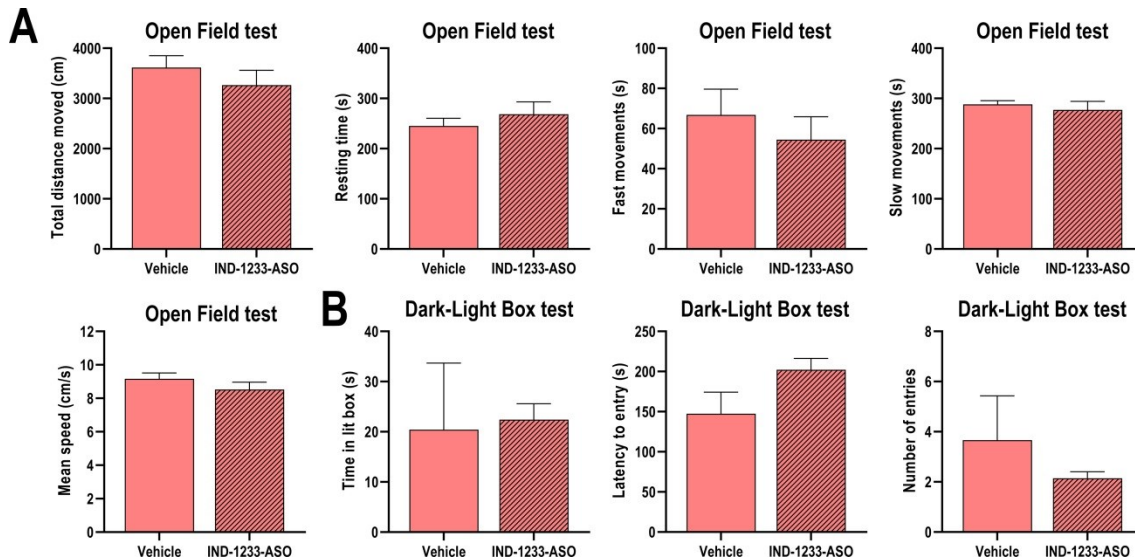


Figura 50. Efectos de la administración de IND-1233-ASO sobre el fenotipo conductual del modelo α Syn* A30P* A53T. A) Test de campo abierto. Los ratones transgénicos tratados con IND-1233-ASO no mostraron diferencias en ninguna de las variables analizadas (distancia total recorrida, tiempo de reposo, velocidad media y duración de los movimientos rápidos), en relación con el grupo tratado con vehículo. B) Test de la caja de luz/oscuridad. Ambos grupos de ratones no mostraron diferencias en el tiempo transcurrido en la cámara iluminada, la latencia hasta el primer cruce ni el número de cruces. Los valores representan la media \pm SEM, n=10 ratones/grupo.

3. CARACTERIZACIÓN DEL MODELO MURINO TRANSGÉNICO LRRK2*G2019S

Para cumplir con los objetivos 3 y 4, nosotros también examinamos la eficacia de la molécula IND-1233-ASO utilizando el modelo murino LRRK2 con la mutación G2019S. Previamente, caracterizamos el perfil de expresión del mRNA de α -Syn endógena, el fenotipo conductual y la neurotransmisión DA en el modelo LRRK2*G2019S, en comparación con el grupo WT.

A. PERFIL DE EXPRESIÓN DE α -SINUCLEÍNA

Inicialmente, se examinó el **patrón de expresión de la α -Syn endógena** en diferentes áreas cerebrales de los ratones transgénicos y controles. Mediante ISH se detectaron los siguientes niveles de expresión del mRNA de α -Syn en los ratones LRRK2*G2019S: mPFC, $105.6 \pm 6.5\%$; CPu, $97.3 \pm 10.9\%$; HPC, $93.7 \pm 6.3\%$; SNc/VTA, $122.9 \pm 6.1\%$; DR, $97.4 \pm 12.2\%$; LC, $102.5 \pm 6.5\%$, en comparación con los niveles de expresión en los ratones controles (**Figura 51**). El análisis *t* de Student mostró diferencias significativas en la expresión de α -Syn en SNc/VTA entre ambos grupos ($t=3.731$, $p=0.0039$), pero no reveló diferencias estadísticas en el resto de áreas analizadas (mPFC: $t=0.8663$, $p=0.4066$; CPu: $t=0.2463$, $p=0.8105$; HPC: $t=0.9905$, $p=0.3453$; DR: $t=0.2146$, $p=0.8344$; LC: $t=0.3753$, $p=0.7153$).

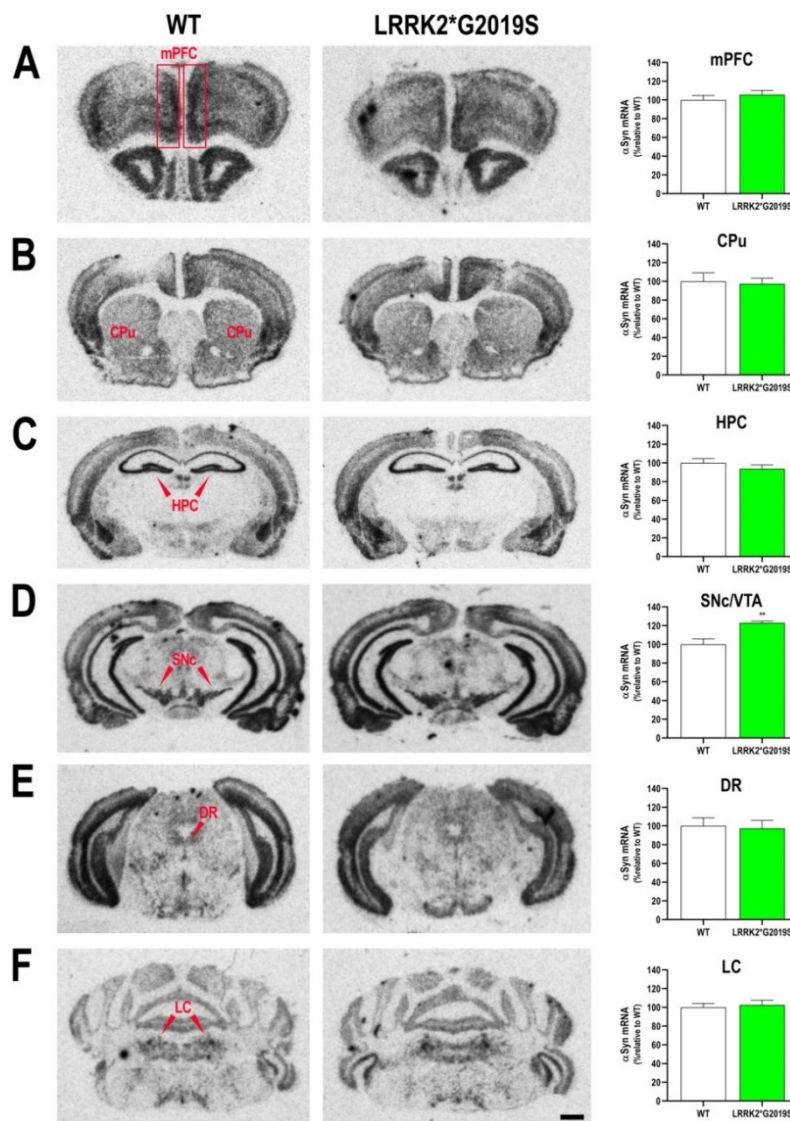


Figura 51. Expresión de α -Syn en el modelo murino LRRK2*G2019S. Autorradiografías de secciones coronales de cerebro de ratón mostrando la expresión de α -Syn murina en mPFC (A), CPu (B), HPC (C), SNc/VTA (D), DR (E) y LC (F). Escala: 1 mm. Las cuantificaciones densitométricas muestran un nivel mayor de expresión de α -Syn en la SNc/VTA de los ratones LRRK2*G2019S en comparación con el grupo WT, pero no se detectan diferencias en el resto de áreas analizadas. Los valores representan la media \pm SEM, n=5/6 ratones/grupo.

B. EVALUACIÓN DE LA NEUROTRANSMISIÓN DA EN EL MODELO LRRK2*G2019S

En los experimentos de microdiálisis, la evaluación de la **concentración basal de DA extracelular** en CPu no mostró diferencias entre los grupos WT y LRRK2*G2019S, en ninguna de las condiciones experimentales utilizadas (**Tabla 14**). El análisis estadístico no mostró diferencias significativas con LCR ($t=0.8593$, $p=0.4103$) ni LCR+DMSO ($t=2.095$, $p=0.0626$).

Tabla 14. Niveles basales de DA extracelular en CPu evaluados por microdiálisis intracerebral en el modelo transgénico LRRK2*G2019S.

GRUPO	CONDICIONES	DA BASAL (CPu)
WT	LCR	11.7 \pm 3.4 (n=6)
	LCR + DMSO 1%	6.5 \pm 1.0 (n=6)
LRRK2*G2019S	LCR	8.4 \pm 2.0 (n=6)
	LCR + DMSO 1%	4.6 \pm 0.6 (n=6)

Los valores representan la media de los valores basales \pm SEM, expresados en fmol DA por fracción dializada de 20 min. La n indica el número de ratones utilizados en cada caso.

La infusión local de veratridina (50 μ M) por diálisis reversa incrementó de manera similar la liberación de DA en CPu en ratones WT y LRRK*G2019S, alcanzando valores de \sim 4775% y \sim 3723%, respectivamente (**Figura 52A**). El análisis ANOVA de 2 vías seguido del test *post hoc* de Bonferroni mostró una diferencia significativa entre ambos grupos por efecto del tiempo ($F_{(15,135)}=8.254$, $p<0.0001$), pero no por efecto de grupo ($F_{(1,9)}=0.0001$, $p=0.9928$) ni por la interacción grupo-tiempo ($F_{(15,135)}=0.2088$, $p=0.9994$).

Además, la infusión local de nomifensina (1-10 μM) aumentó de manera dosis-dependiente la concentración extracelular de DA en el CPu. Este aumento fue significativamente mayor en el grupo LRRK2*G2019S comparado con el grupo WT, alcanzando un valor máximo de $\sim 268\%$ y $\sim 166\%$ respectivamente a la máxima concentración evaluada (10 μM) (**Figura 52B**). El análisis ANOVA de 2 vías reveló diferencias por efecto de grupo ($F_{(1,9)}=6.036$, $p=0.0363$), por tiempo ($F_{(17,153)}=11.24$, $p<0.0001$) y por interacción grupo-tiempo ($F_{(17,153)}=2.447$, $p=0.0021$).

La administración local de anfetamina (1-10 μM) también aumentó de modo dosis-dependiente la concentración extracelular de DA en el CPu. En ambos grupos se alcanzaron niveles máximos similares en la mayor dosis evaluada (10 μM), de $\sim 1304\%$ en los ratones WT y $\sim 1498\%$ en los ratones LRRK2*G2019S (**Figura 52C**). El ANOVA de 2 vías mostró diferencias por efecto de tiempo ($F_{(17,170)}=16.39$, $p<0.0001$), pero no por efecto de grupo ($F_{(1,10)}=0.3898$, $p=0.5464$) ni por interacción grupo-tiempo ($F_{(17,170)}=0.2624$, $p=0.9987$).

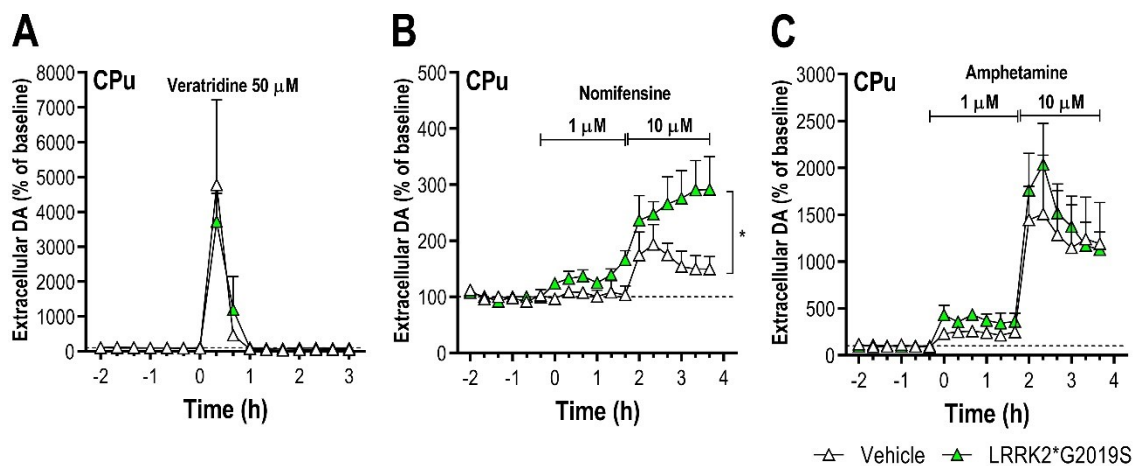


Figura 52. Efectos sobre la neurotransmisión DA nigroestriatal en el modelo LRRK2*G2019S. A) La infusión local de veratridina (50 μM) aumentó la liberación de DA extracelular en el CPu de manera similar en ambos grupos. B) La infusión local de nomifensina (1-10 μM) aumentó de manera dosis-dependiente la concentración extracelular de DA estriatal, con niveles más elevados en los ratones LRRK2*G2019S. C) La infusión local de anfetamina (1-10 μM) aumentó de manera dosis-dependiente la concentración extracelular de DA estriatal de manera similar en ratones WT y transgénicos. Los valores representan la media \pm SEM, $n=5-6$ ratones/grupo. * $p<0.05$ vs grupo WT.

Adicionalmente, también medimos la concentración de DOPAC en cada fracción dializada. La concentración basal de DOPAC extracelular en CPu no mostró diferencias significativas en ambos grupos en ninguna de las condiciones empleadas (**Tabla 15**), tal como revela el test *t* de Student (LCR: $t=0.2024$, $p=0.8437$; LCR+DMSO: $t=0.2931$, $p=0.7754$).

Tabla 15. Niveles basales de DOPAC extracelular en CPu evaluados por microdialísis intracerebral en el modelo transgénico LRRK2*G2019S.

GRUPO	CONDICIONES	DOPAC BASAL (CPu)
WT	LCR	1.74 ± 0.24 (n=6)
	LCR + DMSO 1%	1.39 ± 0.25 (n=6)
LRRK2*G2019S	LCR	1.65 ± 0.33 (n=6)
	LCR + DMSO 1%	1.27 ± 0.30 (n=6)

Los valores representan la media de los valores basales ± SEM, expresados en fmol DOPAC por fracción dializada de 20 min. La *n* indica el número de ratones utilizados en cada caso.

La infusión de veratridina (50 μM) provocó una disminución de los niveles de DOPAC similar en el grupo WT (~73%) y en el grupo LRRK2*G2019S (~68%), respecto a los niveles basales (**Figura 53A**); el ANOVA de 2 vías mostró diferencias por efecto de tiempo ($F_{(2,25)}=20.63$, $p<0.0001$) pero no por efecto de grupo ($F_{(1,25)}=2.007$, $p=0.1689$) ni por interacción grupo-tiempo ($F_{(2,25)}=0.5068$, $p=0.6085$). La infusión de nomifensina (1-10 μM) no provocó una respuesta dosis-dependiente en los niveles de DOPAC, ni en los ratones WT (77-59%) ni en los transgénicos (92-74%) (**Figura 53B**); el test ANOVA de 2 vías mostró un efecto de tiempo ($F_{(1,23)}=24.76$, $p<0.0001$) pero no efecto grupo ($F_{(1,23)}=2.309$, $p=0.1422$) ni interacción grupo-tiempo ($F_{(2,23)}=0.3454$, $p=0.7115$). Igualmente, la infusión de amfetamina (1-10 μM) no condujo a una respuesta dosis-dependiente de los niveles de DOPAC, ni en el grupo control (76-72%) ni en el LRRK2*G2019S (89-70%) (**Figura 53C**); el ANOVA de 2 vías mostró diferencias por efecto tiempo ($F_{(2,14)}=29.62$, $p<0.0001$) pero no por grupo ($F_{(1,7)}=1.467$, $p=0.2651$) ni por interacción grupo-tiempo ($F_{(2,14)}=0.6668$, $p=0.5289$).

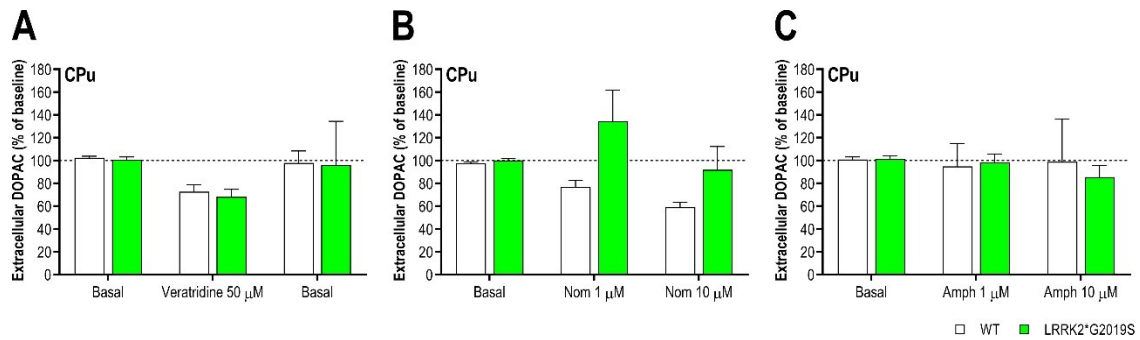


Figura 53. Niveles extracelulares de DOPAC en CPu en el modelo LRRK2*G2019S.

Las gráficas muestran los niveles de DOPAC representados como área bajo la curva. La infusión en CPu de veratridina 50 μ M (A), nomifensina 1-10 μ M (B) o anfetamina 1-10 μ M (C) no mostró diferencias entre ambos grupos en los niveles de DOPAC extracelular. Los valores representan la media \pm SEM, n=5-6 ratones/grupo.

C. CARACTERIZACIÓN CONDUCTUAL DEL MODELO MURINO LRRK2*G2019S

Para examinar si la mutación G2019S de la proteína LRRK2 se asocia con cambios conductuales, hemos evaluado la función motora y la cognitivo-emocional empleando una serie de pruebas comportamentales.

En primer lugar, evaluamos la función motora en el **test de campo abierto**. Los ratones LRRK2*G2019S no mostraron ninguna diferencia en la actividad locomotora en comparación con los ratones WT. La distancia total recorrida por el grupo transgénico fue del $108.9 \pm 6.4\%$ en comparación con el grupo control (**Figura 54A**). El test *t* de Student no mostró diferencias estadísticas entre ambos grupos ($t=1.401$, $p=0.1721$). Igualmente, tampoco se detectaron diferencias estadísticas en el resto de variables analizadas: tiempo de reposo ($t=1.475$, $p=0.1514$), duración de los movimientos rápidos ($t=1.350$, $p=0.1879$) y lentos ($t=0.3065$, $p=0.7615$), y velocidad media ($t=0.8760$, $p=0.3885$).

Además, también evaluamos la asimetría utilizando la **prueba del cilindro**. Los ratones LRRK2*G2019S se comportaron de modo similar al grupo WT (**Figura 54B**), y no se detectaron diferencias significativas entre ambos grupos referidas al uso de la pata izquierda respecto al total ($t=0.3558$, $p=0.7246$).

Ambos grupos, LRRK2*G2019S y WT, también fueron evaluados en el **test de la caja de luz/oscuridad**. La **Figura 54C** muestra que los ratones LRRK2*G2019S pasaron un tiempo similar a los WT en la cámara iluminada ($124.3 \pm 15.9\%$). El grupo transgénico también tuvo un comportamiento similar al WT en la latencia hasta la primera entrada ($110.2 \pm 22.4\%$) y el número de entradas ($109.8 \pm 18.1\%$). El análisis *t* de Student no mostró diferencias estadísticas entre ambos grupos en ninguna de las variables analizadas: tiempo en la cámara iluminada ($t=1.534$, $p=0.1363$), latencia hasta el primer cruce ($t=0.4555$, $p=0.6524$) ni número de entradas ($t=0.5406$, $p=0.5930$).

Para evaluar el fenotipo depresivo se utilizó el **test de suspensión por la cola**, y se midió el tiempo de inmovilidad. Ambos grupos de ratones, LRRK2*G2019S y WT, mostraron un comportamiento similar, con un tiempo de inmovilidad del $91.3 \pm 5.9\%$ en los ratones transgénicos respecto a los WT (**Figura 54D**), y no se detectaron diferencias significativas entre ambos grupos ($t=1.722$, $p=0.0962$).

Por último, del mismo modo que en el modelo transgénicos de *A30P*53T, evaluamos la memoria a corto plazo utilizando el test de **reconocimiento de objetos novedosos**. Durante el pre-test, ambos grupos mostraron una preferencia similar por los mismos objetos. En la **Figura 54E** se muestra que los dos grupos exploraron el objeto novedoso durante un tiempo significativamente mayor (WT: $735.3 \pm 120.7\%$; LRRK2*G2019S: $687.8 \pm 52.0\%$), en comparación con el tiempo de exploración del objeto familiar; sin embargo, el tiempo de exploración del objeto novedoso por parte de los ratones LRRK2*G2019S fue significativamente menor en comparación con los ratones WT ($72.9 \pm 13.3\%$). El test ANOVA de 2 vías muestra diferencias significativas por efecto de objeto ($F_{(1,40)}=119.3$, $p<0.0001$) y por efecto de grupo ($F_{(1,40)}=4.880$, $p=0.0330$), pero no por interacción grupo-objeto ($F_{(1,40)}=3.128$, $p=0.0846$). Por otro lado, los ratones LRRK2*G2019S mostraron un índice de discriminación del objeto novedoso del $95.1 \pm 4.5\%$ respecto al grupo WT, y mediante el test *t* de Student no se revelaron diferencias estadísticas en esta variable entre ambos grupos ($t=1.090$, $p=0.2888$).

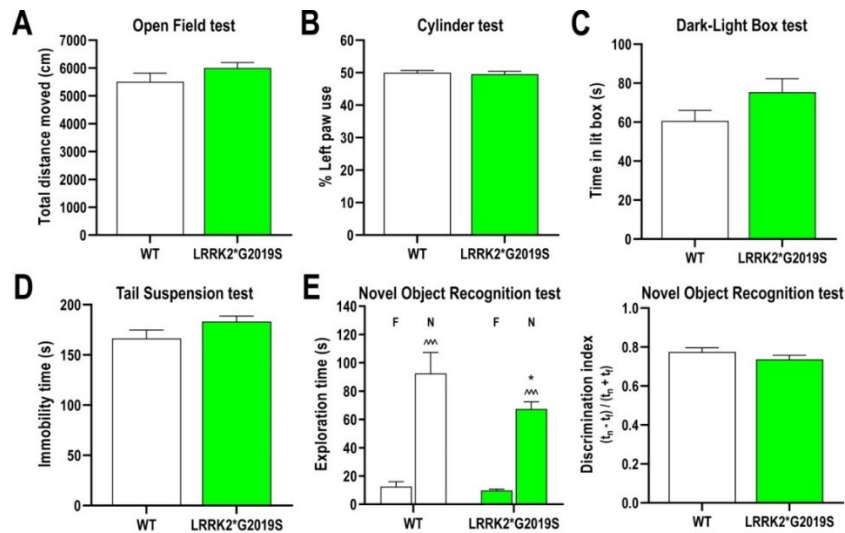


Figura 54. Alteraciones conductuales en el modelo LRRK2*G2019S. A) Test de campo abierto. No se detectaron diferencias en la distancia total recorrida entre ambos grupos. B) Test del cilindro. No se detectan diferencias en el uso de la pata delantera izquierda en los ratones LRRK2*G2019S. C) Test de la caja de luz/oscuridad. Los ratones transgénicos y los WT no mostraron diferencias en el tiempo transcurrido en la cámara iluminada. D) Test de suspensión por la cola. No se detectaron diferencias en el tiempo de inmovilidad entre ambos grupos de ratones. E) Test de reconocimiento de objetos novedosos. Ambos grupos de ratones mostraron una mayor preferencia por el objeto novedoso que por el familiar, pero los ratones LRRK2*G2019S exploraron durante un menor tiempo el objeto novedoso en comparación con el grupo WT. F = Objeto familiar, N = Objeto novedoso. Los valores representan la media \pm SEM, n=10-15 ratones/grupo. * $p < 0.05$ vs grupo WT; ^^ $p < 0.001$ vs objeto familiar.

D. EFECTOS DEL TRATAMIENTO SOSTENIDO CON IND-1233-ASO CONTRA α -SYN EN EL MODELO LRRK2*G2019S

A continuación, evaluamos la eficacia del tratamiento con IND-1233-ASO para inhibir la síntesis de α -Syn en el modelo transgénico LRRK2*G2019S. Para ello, dos grupos de ratones transgénicos fueron tratados con LCR o IND-1233-ASO (100 μ g/día) en el ventrículo lateral durante 28 días utilizando minibombas osmóticas. Mediante ISH, detectamos que el nivel de α -Syn endógena en la SNc/VTA de los ratones LRRK2*G2019S tratados con IND-1233-ASO fue similar al grupo LRRK2*G2019S tratado con vehículo, y los niveles de α -Syn

en ambos grupos transgénicos fueron significativamente mayores que los del grupo WT. Los niveles de mRNA en los grupos transgénicos fueron de $120.5 \pm 8.4\%$ en los tratados con vehículo y de $120.2 \pm 5.9\%$ en los tratados con IND-1233-ASO, en relación al grupo WT (**Figura 55**). El test ANOVA de una vía indicó diferencias significativas por efecto de grupo ($F_{(2,13)}=8.347$, $p=0.0047$), con diferencias del grupo WT con el grupo LRRK2*G2019S administrado con vehículo ($p=0.0252$) y con el grupo administrado con IND-1233-ASO ($p=0.0073$), pero no entre ambos grupos LRRK2*G2019S ($p=0.9989$). En conjunto, estos datos muestran que IND-1233-ASO no es una opción de tratamiento en el modelo murino LRRK2*G2019S.

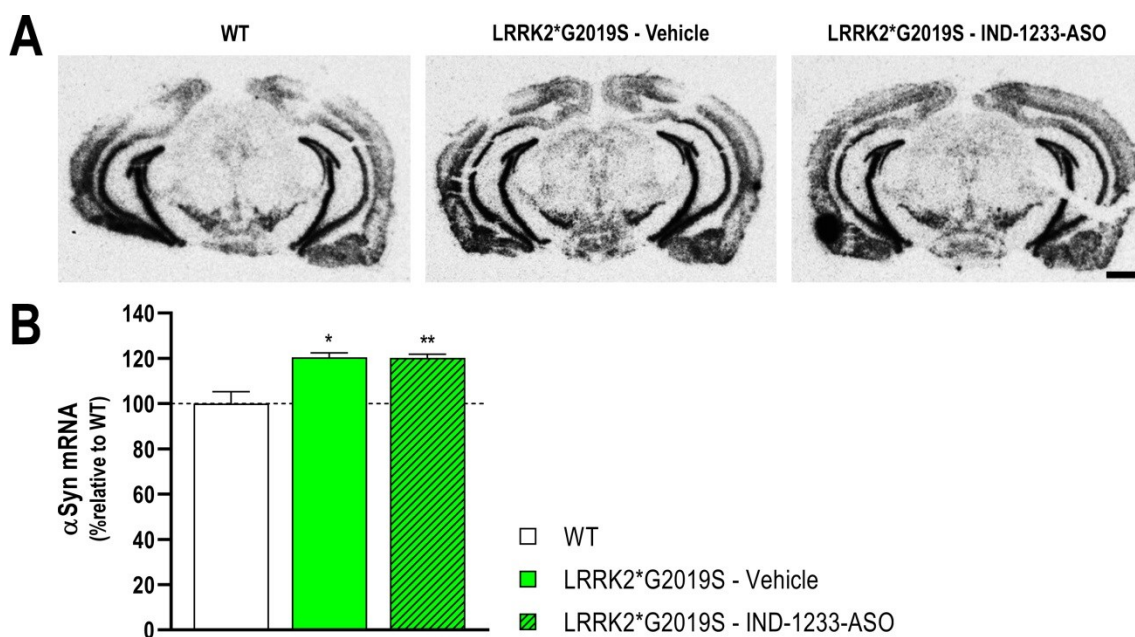


Figura 55. Efectos de la administración de IND-1233-ASO en el modelo LRRK2*G2019S. A) Autorradiografías de secciones coronales de cerebro de ratón mostrando la expresión de la α -Syn en la SNc/VTA de ratones WT y ratones LRRK2*G2019S tratados con vehículo o con IND-ASO-1233. Escala: 1 mm. B) Cuantificación densitométrica en la SNc/VTA. Las barras muestran un mayor nivel de expresión del mRNA de α -Syn en los ratones LRRK2*G2019S en relación con el grupo WT, pero no se detectaron diferencias entre los dos grupos transgénicos tratados con vehículo o IND-1233-ASO. Los valores representan la media \pm SEM, $n=5-6$ ratones/grupo. * $p<0.05$, ** $p<0.01$ vs expresión de α -Syn en el grupo WT.

A. CONSIDERACIONES GENERALES

La enfermedad de Parkinson fue descrita hace más de 200 años, y su relación con los LB se descubrió hace más de 100, pero actualmente siguen sin conocerse las causas precisas de la degeneración de las neuronas DA y la acumulación de una de las principales proteínas como es α -Syn (Goedert *et al.*, 2013). Los síntomas motores de la enfermedad continúan tratándose con L-DOPA, pero el resto de síntomas no motores no suelen incluirse entre los tratamientos habituales, y la investigación está lejos aún de encontrar soluciones para las otras sinucleinopatías, lo cual conduce a importantes pérdidas personales y económicas cada año (Findley, 2007; Maresova *et al.*, 2017). Además, pese a los numerosos estudios sobre las sinucleínas y sus patologías, todavía no se conoce con exactitud la función fisiológica precisa, siendo α -Syn una de las proteínas citoplasmáticas más abundantes en neuronas con niveles cercanos al 1% del total de proteínas (Goedert *et al.*, 2017).

Considerando los resultados previos del grupo de investigación, así como la poca información disponible sobre γ -Syn en el contexto de las sinucleinopatías, el **trabajo 1** de esta tesis se ha centrado en el estudio de γ -Syn, en especial de su rol biológico sobre la neurotransmisión DA. Teniendo en cuenta que no existen compuestos capaces de modular directamente la función de las sinucleínas, gran parte de esta tesis consistió en el desarrollo y caracterización de modelos murinos basados en la alteración de la expresión endógena de γ -Syn en el cerebro. En primer lugar, se desarrolló un modelo de sobreexpresión de la forma murina de γ -Syn en la SNc/VTA mediante un vector vírico AAV10, que como se discutirá a continuación reprodujo algunas características observadas en las fases tempranas de las sinucleinopatías, como la alteración de la neurotransmisión DA y la presencia de déficits motores y cognitivos. Además, y en el sentido opuesto, también se caracterizó un modelo de ratón con una reducción parcial de la expresión de γ -Syn selectivamente en la SNc/VTA mediante un oligonucleótido antisentido conjugado con indatralina (inhibidor triple con afinidad por DAT, NET y SERT). La conjugación de oligonucleótidos (ASO, siRNA) con inhibidores de los transportadores de monoaminas para acumular estos oligonucleótidos en neuronas monoaminérgicas ha sido caracterizada detalladamente en el grupo de investigación (Bortolozzi *et al.*, 2012; Ferrés-Coy *et al.*, 2013, 2016; Alarcón-Arís *et al.*, 2018; Fullana *et al.*, 2019). Utilizando este procedimiento, se

redujo de forma reversible el nivel de expresión de γ -Syn en las neuronas DA de la SNc/VTA y se observaron efectos contrarios sobre la neurotransmisión DA comparados con el modelo de sobreexpresión de γ -Syn inducido por AAV10.

En el **trabajo 2** de esta tesis se evaluó la eficacia de la secuencia IND-1233-ASO como un tratamiento potencial para PD capaz de reducir los niveles de síntesis de α -Syn, utilizando dos modelos murinos portadores de las formas humanas mutadas de α -Syn (doble mutación A30P-A53T) y de LRRK2 (G2019S), siendo ambas mutaciones frecuentes en los casos genéticos de PD. Previamente, nosotros reportamos que la secuencia IND-1233-ASO reduce selectivamente la expresión de α -Syn en las neuronas monoaminérgicas de ratones normales y de monos Rhesus envejecidos (Alarcón-Arís *et al.*, 2018, 2020 *en revisión*).

Brevemente, en el segundo trabajo se describió que el modelo α Syn*A30P*A53T mostró incrementos de 3-4 veces el nivel de expresión de α -Syn humana en la SNc/VTA y en LC, y consecuentemente los ratones presentaron alteraciones de la neurotransmisión DA nigroestriatal, y déficits motores. Por su parte, el modelo LRRK2*G2019S mostró un incremento ligero, pero significativo, de la expresión de α -Syn en la SNc/VTA acompañado de una alteración de la función de DAT y un deterioro de la memoria a corto plazo. La administración intracerebroventricular de IND-1233-ASO durante 28 días redujo significativamente los niveles de α -Syn en el modelo α Syn*A30P*A53T, restaurando la neurotransmisión DA, aunque no se vieron efectos de recuperación sobre la función motora. Sin embargo, el tratamiento con IND-1233-ASO fue incapaz de reducir la expresión de α -Syn en el modelo LRRK2*G2019S.

En general, los resultados obtenidos en esta tesis aportan información novedosa sobre el papel *in vivo* de γ -Syn en la neurotransmisión DA nigroestriatal y mesocortical, y su rol en la función motora y cognitiva, confirmando que γ -Syn, al igual que α -Syn, actúan como reguladores negativos de la neurotransmisión monoaminérgica, como previamente se demostró utilizando modelos *in vitro* (Oaks & Sidhu, 2011). Además, la inhibición de la síntesis de α -Syn inducida por IND-1233-ASO en las neuronas de DA puede aliviar los déficits tempranos de la función DA, mostrando el alto valor traslacional de los ASOs como terapia de modificación de la enfermedad para la PD y otras sinucleinopatías relacionadas.

B. EXPRESIÓN PREFERENCIAL DE γ -SINUCLEÍNA EN LOS NÚCLEOS MONOAMINÉRGICOS Y EN LA HABÉNULA LATERAL DE RATÓN

La expresión y función de la proteína γ -Syn ha sido muy poco estudiada en el cerebro. No fue hasta el año 2000 cuando se describió la presencia del mRNA de γ -Syn en la SNc/VTA de ratones, así como en el cerebro en desarrollo (Abeliovich *et al.*, 2000; George, 2002). Además, la mayor parte de los estudios relacionados con la γ -Syn tanto en humanos y animales se han enfocado sobre sus efectos oncogénicos, principalmente como un marcador de la progresión de tumores (Bruening *et al.*, 2000; Ahmad *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2007). Aun así, en estos últimos diez años existe más información sobre la función patológica de γ -Syn, desde que han sido identificadas interacciones entre α - y γ -Syn que promueven la agregación de cada una de ellas (Surgucheva *et al.*, 2012; Surguchov, 2013). Por lo tanto, uno de los primeros objetivos de esta tesis consistió en la caracterización de la expresión cerebral de γ -Syn. Analizando la localización y distribución de su transcrito se ha podido demostrar que γ -Syn no sólo se expresa de manera abundante y selectiva en los núcleos dopaminérgicos (SNc, VTA) (Abeliovich *et al.*, 2000), sino también en los núcleos serotoninérgicos del DR y noradrenérgicos del LC de ratón, sugiriendo un papel clave de γ -Syn como un regulador de la función monoaminérgica. Curiosamente, el mRNA de γ -Syn también se expresa de modo abundante y selectivo en los núcleos laterales de la habénula (LHb). Los LHb han sido recientemente implicados en la fisiopatología de la depresión y en la codificación de la sintomatología negativa (Li *et al.*, 2013; Lecca *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2018). De hecho, las neuronas glutamatérgicas de la LHb proyectan hacia el DR y VTA, regulando negativamente la actividad de las neuronas 5-HT y DA, respectivamente, a través de la activación de interneuronas GABAérgicas en el DR o VTA (Li *et al.*, 2011; Zhou *et al.*, 2017). Aunque alejados de los objetivos propuestos en la presente tesis, γ -Syn podría tener un papel clave en la regulación de la neurotransmisión en el circuito LHb-DR/VTA y ser una diana de acción terapéutica para los síntomas no motores de la PD y otras sinucleinopatías.

El perfil de expresión de γ -Syn contrasta con la expresión de α -Syn, siendo más abundante ésta última y detectada en zonas corticales y subcorticales, así como con la del mRNA de β -Syn casi ubicuo en todo el cerebro, incluyendo los núcleos monoaminérgicos (Lavedan,

1998; *presente tesis*). Estos resultados aportan una información relevante en cuanto a la localización de γ -Syn, ya que anteriormente la proteína γ -Syn en roedores sólo se había detectado en neuronas de la médula espinal, aunque en humanos sí se había descrito su localización en médula y neocórtex (Giasson *et al.*, 2001b).

En conjunto, estos resultados confirmaron la presencia selectiva de γ -Syn en las áreas monoaminérgicas, sugiriendo un posible rol fisiológico de la proteína γ -Syn sobre la regulación de la actividad y la neurotransmisión de monoaminas. De acuerdo con esto, estudios previos *in vitro* utilizando modelos celulares han encontrado que γ -Syn modula el tráfico, expresión y función de los transportadores DAT, NET y SERT (Jeannotte *et al.*, 2009a; Wersinger & Sidhu, 2009; Oaks & Sidhu, 2011). Por otro lado, la detección específica de γ -Syn en los núcleos laterales de la habénula sugiere un potencial nexo a explorar entre los sistemas DA y 5-HT que contribuyen en la sintomatología depresiva en la PD (Han *et al.*, 2014; Luo *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2019).

C. MODELO MURINO DE SOBREENPRESIÓN Y DE SILENCIAMIENTO DE γ -SINUCLEÍNA EN SNc/VTA

Considerando la carencia de compuestos agonistas o antagonistas capaces de modular directamente la función de γ -Syn, decidimos intervenir sobre el nivel de expresión del gen endógeno de γ -Syn en la SNc/VTA empleando herramientas como los vectores AAV o estrategias no virales que incluyen la utilización de oligonucleótidos inhibitorios. En relación con el constructo AAV10-CMV para la sobreexpresión de γ -Syn endógena, éste se eligió por varias ventajas en comparación con otros métodos para la sobreexpresión. Los vectores víricos aprovechan los mecanismos biológicos naturales de los virus para introducir genes exógenos en las células, pero en su diseño se debe considerar la forma de mantener la eficiencia de la entrada en las células diana y la expresión del transgén, minimizando la patogenicidad del virus. En concreto, los vectores basados en adenovirus y lentivirus no requieren la división celular para su replicación, al contrario que los retrovirus, de modo que son idóneos para su uso en células post-mitóticas como las neuronas (Pereira *et al.*, 1997, Daya & Berns, 2008).

Además, los vectores víricos adenoasociados presentan ciertas ventajas en comparación con otros vectores. Su expresión es estable y sostenida en el tiempo, a diferencia de otros vectores víricos cuya expresión desaparece algunas semanas después de la administración. Los vectores AAV también han sido sofisticados suficientemente para introducir transgenes de gran tamaño, pese al pequeño tamaño del genoma del AAV, y además tampoco contienen genes propios del adenovirus (Bak & Porteus, 2017). Uno de los mayores problemas en el uso de vectores víricos para la introducción de genes es la repuesta inmunológica del receptor. Sin embargo, en humanos y modelos animales no se han encontrado respuestas inmunológicas perjudiciales a causa de la administración de vectores AAV, aunque esto depende del sitio de administración y la dosis viral empleada (Zaiss & Muruve, 2005).

En algunos serotipos de AAV se han identificado sus correspondientes receptores en la superficie celular, lo cual ha permitido diseñar vectores con mayor eficiencia en la infección de ciertos tejidos, combinando la maquinaria genómica y la cápside de distintos serotipos (Akache *et al.*, 2006, **Zinn *et al.*, 2015**). Previamente a esta tesis, se comparó la eficiencia de expresión de GFP en neuronas DA de la SNc/VTA de tres serotipos AAV (5, 9 y 10). Así, comprobamos que el serotipo AAV10 presenta una mayor eficiencia en cuanto al número de células positivas para GFP y la intensidad de la expresión, en comparación con AAV5 y AAV9, por lo cual decidimos emplear este serotipo para el desarrollo del modelo de sobreexpresión de γ -Syn. El serotipo AAV10 fue identificado en 2004 en monos *Cynomolgus*, presentando una mayor similitud con el serotipo AAV8, aunque todavía no se han identificado con exactitud sus receptores en la superficie celular (Mori *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2006; Pillay & Carette, 2017).

Por otra parte, elegimos diseñar el plásmido con el cDNA de γ -Syn de ratón bajo el control del promotor de citomegalovirus (CMV). En vectores AAV se ha demostrado que el promotor CMV permite una expresión elevada y sostenida en el tiempo de los transgenes, tanto en modelos animales como celulares, en comparación con otros promotores constitutivos y con promotores de tipos celulares específicos (Liu *et al.*, 2007; Damdindorj *et al.*, 2014).

Utilizando el constructo AAV10-CMV- γ -Syn hemos conseguido duplicar los niveles del mRNA endógeno de γ -Syn y de la proteína en las neuronas DA de la SNc/VTA de los

ratones. Esto resalta la utilidad del vector elegido para estudiar la función biológica de γ -Syn sin alteraciones por la aparición de toxicidad; por el contrario, empleando otros constructos con diferentes promotores o serotipos se puede llegar a niveles más de 4 veces superiores a los fisiológicos, incluso alejados de la condición patológica, como se ha observado en otros modelos de sobreexpresión de α -Syn (Gorbatyuk *et al.*, 2008, 2010, Oliveras-Salvá *et al.*, 2013).

Además, la sobreexpresión de γ -Syn alcanza su máximo nivel a partir de las 4 semanas post-inyección, que se mantiene al menos hasta las 16 semanas. Esta característica del modelo ofrece la ventaja de proporcionar un sistema estable en el tiempo para poder estudiar la función de γ -Syn en la neurotransmisión DA y sus implicaciones conductuales. La estabilidad de la sobreexpresión también evita la necesidad de la intervención continuada sobre los ratones que requieren los modelos de sobreexpresión inducible.

Por otra parte, hemos demostrado que la sobreexpresión mediante el constructo AAV10-CMV no induce toxicidad en las células DA de la SNc/VTA, de modo que no hemos encontrado pérdida de células TH⁺ ni alteraciones en la expresión de DAT. Esto nos ha permitido explorar la función de γ -Syn a nivel fisiológico y se puede confirmar que las alteraciones en el modelo murino se deben a la sobreexpresión de la proteína, y no a alteraciones tóxicas o neurodegeneración de las neuronas DA. De este modo, examinamos específicamente el rol biológico de γ -Syn, y no sus posibles efectos patológicos que se manifiestan en la mayoría de modelos de sobreexpresión de α -Syn por AAV (Ulusoy *et al.*, 2010; Volpicelli-Daley *et al.*, 2016).

Adicionalmente, también hemos demostrado que el hecho de utilizar un vector AAV10 tampoco influye en los resultados observados en el modelo de sobreexpresión de γ -Syn. Por un lado, no hemos detectado cambios en los niveles de mRNA de γ -Syn al inyectar el mismo vector AAV10 vacío en la SNc/VTA, y por otro, los ratones con el vector vacío no presentan alteraciones motoras en los mismos tiempos post-inyección en los que se ha evaluado el modelo AAV10-CMV- γ -Syn.

La sobreexpresión de γ -Syn tampoco ha tenido efectos en los niveles de expresión de α -Syn en la SNc/VTA. Algunas funciones de las sinucleínas son redundantes en la familia a causa de su homología, y se ha especulado que la alteración en la función de alguna de ellas

puede ser compensada por las otras. Sin embargo, hasta el momento no se ha demostrado que la modificación de los niveles de expresión de α -Syn en neuronas conduzca a una alteración en el sentido opuesto en los niveles de γ -Syn, o viceversa, tanto en modelos de sobreexpresión como *knock-down* (Ninkina *et al.*, 2009; Greten-Harrison *et al.*, 2010; Connor-Robson *et al.*, 2016; Ninkina *et al.*, 2020).

Debido al uso del promotor constitutivo CMV, otra característica observada en este modelo ha sido la difusión de la expresión de γ -Syn a otras áreas cerebrales distintas a la SNc/VTA como la formación reticular, el núcleo parabraquial, el campo prerubral y otras regiones del mesencéfalo. A pesar la expansión de la sobreexpresión, los niveles de expresión de γ -Syn en la SNc/VTA siguieron siendo 2 veces superiores a partir de las 4 semanas post-inyección. Sin embargo, debe considerarse esta limitación en el modelo, que lleva a que células y regiones no DA pasen a expresar γ -Syn cuando en condiciones fisiológicas no está presente en las mismas, de modo que γ -Syn puede alterar la función de estas neuronas. Dado que hemos demostrado la no toxicidad del modelo en las células TH⁺, es probable que la difusión de la expresión de γ -Syn no tenga efectos perjudiciales en los tiempos post-inyección en que se ha evaluado, pero deberá tenerse en cuenta cuando se examinen efectos no relacionados con la función DA de la SNc/VTA. A pesar del extenso volumen de difusión del constructo, hemos demostrado que la expresión de γ -Syn no se ha visto alterada en otras áreas monoaminérgicas como el DR o LC.

Considerando todas estas características, el modelo AAV10-CMV- γ -Syn ha demostrado que resulta útil para lograr un aumento sostenido en el tiempo de la expresión de γ -Syn en la SNc/VTA, sin alteraciones tóxicas. Por tanto, se puede afirmar que el modelo murino desarrollado constituye una herramienta idónea para explorar el rol funcional de γ -Syn sobre la neurotransmisión DA y sus consecuencias conductuales.

Por otra parte, para estudiar el rol funcional de γ -Syn también hemos utilizado estrategias de silenciamiento de genes basadas en siRNAs/ASOs. Ambas moléculas comparten un mismo principio, la unión a un RNA diana para inhibir su traducción. Previamente, usando esta metodología fuimos capaces de reducir selectivamente la expresión *in vivo* de genes en neuronas monoaminérgicas (Ferrés-Coy *et al.*, 2016; Alarcón-Arís *et al.*, 2018).

Por un lado, hemos empleado siRNAs, secuencias de doble hebra de RNA capaces de activar los mecanismos celulares para bloquear la traducción del mRNA, y que en los últimos años se han empleado como herramientas para el silenciamiento de la expresión génica de genes específicos. Normalmente se emplean dúplex de RNA sintéticos de 19-22 pares de bases, un tamaño suficiente para que el siRNA sea reconocido por el complejo RISC evitando la mayoría de respuestas inflamatorias. Una vez dentro de la célula, las moléculas se unen a las proteínas del complejo RISC, que separan la doble hebra del siRNA obteniendo moléculas de RNA de simple cadena. De este modo, el conjunto RISC-RNA se une al mRNA complementario y la proteína *Argonaut* del complejo corta el transcrito para inhibir su traducción mediante los propios mecanismos de la célula (degradación por *P-bodies*, represión de la traducción ribosomal, etc.) (Siomi & Siomi, 2009; Carthew & Sontheimer, 2010; Dana *et al.*, 2017).

Por su parte, los ASOs son oligonucleótidos de DNA de simple cadena, también complementarias a regiones de mRNAs de genes específicos. Esto permite que los ASOs formen híbridos DNA-RNA que son reconocidos por la RNasa H para degradar el transcrito, de modo que se inhibe la traducción de los mismos (Wu *et al.*, 2004; Croke, 2017; Schoch & Miller, 2017; Scoles *et al.*, 2019). El procesamiento catalítico de la RNasa se puede potenciar mediante modificaciones químicas de los ASOs como las que presenta el empleado en este modelo, en este caso la adición de nucleótidos modificados en los extremos del oligonucleótido para aumentar la resistencia a nucleasas y aumentar la afinidad por las secuencias diana (Watts & Corey, 2011).

En comparación con los ASOs, los siRNAs suelen resultar más efectivos en modelos celulares, tanto por la potencia de su silenciamiento como porque no requieren de modificaciones químicas como los ASOs. Sin embargo, la decisión en modelos animales presenta mayor complejidad y actualmente se emplean ambas opciones en la investigación preclínica (Ferrari *et al.*, 2006; Summerton *et al.*, 2007). En nuestro caso, basándonos en estudios previos del grupo, decidimos emplear la opción de los ASOs para el desarrollo del modelo de silenciamiento de γ -Syn. En relación con los siRNAs, los ASOs presentan ciertas ventajas, como es su naturaleza de cadena simple, de modo que sólo se requiere la mitad del peso molecular y permite una producción más sencilla y económica. Además, en modelos *in vivo*, los siRNAs presentan el riesgo de competir por la unión al

complejo RISC con otros miRNAs endógenos, e incluso pueden inducir respuestas inflamatorias por la activación de la astrogliá, la microglía o la elevación de citoquinas proinflamatorias (Judge *et al.*, 2006; Bortolozzi *et al.*, 2012). Por el contrario, los ASOs presentan un menor riesgo de toxicidad *in vivo*, pues no se ha reportado que induzcan respuestas inflamatorias o competencia por la unión a la RNasa H (Grimm *et al.*, 2006; Koller *et al.*, 2006; Southwell *et al.*, 2012).

Pese a que no se conoce con exactitud el mecanismo de incorporación de los oligonucleótidos tras la infusión local, varias evidencias señalan que la endocitosis no específica y la microlesión quirúrgica favorecen la entrada celular de los oligonucleótidos (Doherty & McMahon, 2009; Howes *et al.*, 2010; Juliano *et al.*, 2013). De hecho, previamente hemos descrito estos mecanismos como los responsables para la entrada de siRNAs no conjugados en las células serotoninérgicas o en los astrocitos (Ferrés-Coy *et al.*, 2013a,b; Fullana *et al.*, 2019).

Además, muchos tipos celulares expresan receptores en sus membranas a los que pueden unirse los ASOs para ser internalizados (Koller *et al.*, 2011). Por esto, no podemos descartar el mecanismo de endocitosis no específico para la entrada de IND-1415-ASO en las células DA de la SNc/VTA, pero basándonos en estudios previos del grupo podemos afirmar que la conjugación del oligonucleótido con indatralina facilita la entrada mediada por los transportadores de monoaminas DAT, NAT y SERT. De hecho, el bloqueo previo de los transportadores de monoaminas con inhibidores selectivos impide la acumulación de los oligonucleótidos en las respectivas neuronas monoaminérgicas, indicando que la entrada necesita de transportadores funcionalmente activos (Bortolozzi *et al.*, 2012; Ferrés-Coy *et al.*, 2016; Alarcón-Arís *et al.*, 2018).

A pesar de que no está clara la ruta exacta para la internalización de los IND-ASOs a través de su unión a los receptores de monoaminas, estudios previos también han mostrado que siRNAs conjugados colocalizan con los marcadores endosomales Rab5 y Rab7. Esto apuntaría a que los oligonucleótidos estarían siendo endocitados junto a los transportadores de monoaminas e incorporados en las células a través del tráfico endosomal, del cual deberían salir para ser activos en el silenciamiento (Juliano *et al.*, 2013; Ferrés-Coy *et al.*, 2016).

Mediante la administración local de IND-1415-ASO en las neuronas DA de la SNc/VTA hemos conseguido reducir un 20-25% los niveles de expresión de la γ -Syn endógena y de la proteína, y además esta reducción se mantiene estable al menos hasta 72 h después de la administración. Estos niveles de silenciamiento son similares a los alcanzados en estudios previos del grupo empleando este tipo de moléculas conjugadas (Ferrés-Coy *et al.*, 2016; Alarcón-Arís *et al.*, 2018).

La estabilidad del silenciamiento que observamos nos estaría indicando que estamos alcanzando el máximo nivel de silenciamiento *in vivo* mediante este tipo de molécula y tratamiento. Posiblemente, esto se deba a la saturación de los mecanismos de silenciamiento del mRNA y/o a la misma degradación de los ASOs. No obstante, esta estrategia para la reducción de γ -Syn resulta útil en comparación con otras metodologías de silenciamiento como los shRNA administrados mediante AAV. En este caso, la reducción de la expresión puede llegar al 80-90%, de modo que no resultan útiles para estudiar las funciones fisiológicas de las proteínas de interés, e incluso en el caso de α -Syn puede llegar a provocar efectos tóxicos por la pérdida de función de la misma (Cookson, 2009; Gorbatyuk *et al.*, 2010; Khodr *et al.*, 2011; Collier *et al.*, 2016; Benskey *et al.*, 2018).

También hemos demostrado que el silenciamiento por IND-1415-ASO no induce toxicidad en las células DA de la SNc/VTA, ya que no hemos observado pérdida de células TH⁺. Además, hemos comprobado que el uso de un IND-ASO sin homología con el genoma murino no conduce a cambios en la expresión de γ -Syn, por lo que podemos afirmar que los efectos observados en el modelo de silenciamiento se deben a la propia reducción de la γ -Syn endógena y no a efectos tóxicos por el uso de este tipo de molécula.

Además, hemos comprobado que el silenciamiento con IND-1415-ASO es selectivo únicamente para γ -Syn, ya que la administración local de la molécula no ha tenido efectos sobre los niveles de expresión de α -Syn en la SNc/VTA. Esta especificidad demuestra la eficacia del diseño de la molécula IND-1415-ASO; el silenciamiento mediante ASOs suele presentar la limitación de que dosis elevadas pueden conducir al silenciamiento de genes no deseados, por una homología parcial de sus transcritos con el ASO (Watts & Corey, 2011). También, la demostración de que la expresión de α -Syn no se ve alterada esto nos permite afirmar que la alteración de la expresión de γ -Syn no conduce a ninguna compensación en la α -Syn de las neuronas DA. Del mismo modo, el silenciamiento local

de γ -Syn en la SNc/VTA tampoco ha conducido a cambios en su expresión en los otros núcleos monoaminérgicos del DR y LC.

Por otra parte, la administración del IND-1415-ASO por vía intracerebroventricular consiguió un silenciamiento de hasta el 40%, con una reducción similar después de 7 y de 14 días de tratamiento. Aunque se alcanzan niveles mayores de silenciamiento en comparación con la administración aguda, esto indica nuevamente que estamos alcanzando un nivel máximo de reducción a través de la administración sostenida. Además, también hemos detectado el silenciamiento de γ -Syn en los núcleos del DR y el LC, en los que también está siendo internalizado el IND-1415-ASO.

A pesar de que éste sea un experimento piloto, la estabilidad que observamos en el silenciamiento confiere una gran utilidad a la estrategia de administración intracerebroventricular en comparación con la inyección local. Este método ofrece un rango de tiempo suficiente para poder examinar las consecuencias de la menor expresión de γ -Syn, tanto a nivel de comportamiento como en la plasticidad sináptica. De este modo, se puede profundizar el estudio del rol de γ -Syn no sólo en las neuronas DA sino en el resto de núcleos monoaminérgicos. Además, la administración sostenida de IND-1415-ASO mantiene las ventajas del modelo de silenciamiento local, de modo que se alcanza un nivel máximo de reducción de la expresión sin llegar a la depleción drástica de la proteína.

Otra consecuencia destacable del silenciamiento sostenido de la expresión de γ -Syn ha sido el aumento de la expresión de β -Syn en los núcleos monoaminérgicos, un efecto que ya se ha detectado en estudios con modelos *knock-out* de γ -Syn y/o α -Syn (Robertson *et al.*, 2004). En las sinucleinopatías, β -Syn ha sido estudiada por su capacidad de inhibir la agregación de α -Syn y algunos de sus efectos tóxicos (Jensen *et al.*, 1997; Galvin *et al.*, 2000; Hashimoto *et al.*, 2001; Mor *et al.*, 2003; Brown *et al.*, 2016). Debido a esto, el silenciamiento sostenido de γ -Syn podría aportar un efecto beneficioso al modelo por el aumento de β -Syn, en especial si en un futuro se emplea para el estudio de las sinucleinopatías.

En conjunto, tanto el modelo de sobreexpresión como el de silenciamiento mediante las estrategias de esta tesis han mostrado ser herramientas muy útiles para el estudio de la función biológica de proteínas para las cuales no existen compuestos que modulen su expresión (Davidson *et al.*, 2004; Hoyer *et al.*, 2006; Borel *et al.*, 2016; Scoles *et al.*, 2017;

Evers *et al.*, 2018; Juliano, 2018; Smith & Zain, 2019). En concreto, el uso de IND-1415-ASO puede resultar una estrategia beneficiosa para reducir la expresión de γ -Syn en modelos de sinucleinopatías, en las cuales la acumulación de las sinucleínas supone un elemento clave en la patología (Lashuel *et al.*, 2013; Sardi *et al.*, 2018). Utilizando estos modelos, en las siguientes secciones discutiremos el rol funcional de γ -Syn en la neurotransmisión DA.

D. REGULACIÓN DE LA NEUROTRANSMISIÓN DA NIGROESTRIATAL Y MESOCORTICAL POR γ -SINUCLEÍNA

La función fisiológica de γ -Syn en el sistema nervioso central sigue siendo desconocida, así como su posible interacción con los elementos sinápticos, aunque los datos acerca de su distribución en las áreas cerebrales la sitúan como una proteína de alto interés en la regulación de la neurotransmisión. En relación con la función monoaminérgica, en modelos *in vitro* se ha demostrado que las sinucleínas y en concreto γ -Syn regulan la expresión y función de los transportadores de monoaminas, así como su tráfico y transporte hacia la superficie celular (Sidhu *et al.*, 2004; Oaks & Sidhu, 2004). En la presente tesis se han estudiado *in vivo* estas implicaciones en el sistema nigroestriatal y mesocortical de ratones, a través de la modificación de los niveles de expresión de γ -Syn mediante modelos de sobreexpresión y silenciamiento en la SNc/VTA.

El hecho de que los cambios en el nivel de expresión de γ -Syn no se traducen en una modificación de los niveles basales extracelulares de DA en CPU o en mPFC indicaría que γ -Syn actuaría como un regulador “fino” (*fine tune*) del mecanismo de neurotransmisión, que se evidencia después de la administración de agentes que modifican la homeostasis de la función DA.

Es conocido que la proteína α -Syn participa en los procesos de exocitosis y endocitosis, así como en la recarga de la población de vesículas sinápticas liberables, inhibiendo la acción de las proteínas involucradas en la fusión o post-fusión vesicular del complejo SNARE

(VAMP2, SNAP-25, syntaxina), de modo que su silenciamiento conlleva una mayor liberación sináptica (Goedert, 2001; Di Rosa *et al.*, 2003; Sulzer, 2010; Oaks & Sidhu, 2011; Alarcón-Arís *et al.*, 2018). Teniendo esto en consideración y dada la homología del 55-62% entre α -Syn y γ -Syn (George, 2002; Mouradian *et al.*, 2012), sería esperable que los cambios en los niveles de expresión de γ -Syn condujesen a un efecto similar frente a estímulos que conlleven la descarga sináptica, como la infusión del agente despolarizante veratridina. Sin embargo, en el modelo de silenciamiento por IND-1415-ASO no se han observado alteraciones en la liberación de DA tras la diálisis con este fármaco, ni en el CPu ni la mPFC.

De esta forma, γ -Syn presentaría un rol diferente a α -Syn en relación a su modulación de la liberación sináptica, pese a su homología con α -Syn. En este sentido, observaciones en modelos *in vitro* han indicado que γ -Syn es capaz de unirse a vesículas sinápticas uniéndose directamente a sus membranas, pero no interaccionar con las proteínas del complejo SNARE (Lytkina *et al.*, 2014). Sin embargo, en el modelo de sobreexpresión por el vector AAV10- γ -Syn sí se ha detectado una menor liberación de DA estriatal frente a la acción de la veratridina. Considerando que γ -Syn no puede interactuar con el complejo SNARE, esta diferencia podría deberse a la capacidad de γ -Syn a unirse a las vesículas sinápticas mediante su extremo C-terminal, que de modo similar a α -Syn podrían estar regulando el tráfico y la acumulación de vesículas en las reservas distales de la sinapsis (Auluck *et al.*, 2010; Venda *et al.*, 2010; Lytkina *et al.*, 2014).

Posteriormente, en los modelos de sobreexpresión y silenciamiento de γ -Syn se evaluó si la alteración de su expresión conlleva algún cambio en la función de DAT. El transportador DAT, se expresa en más de un 90% en las neuronas DA, donde su función principal consiste en la recaptación de la DA extracelular liberada en las sinapsis para mantener la concentración fisiológica en la hendidura sináptica y reciclar el neurotransmisor en las neuronas (Torres *et al.*, 2003). Por esto, DAT es uno de los componentes primarios que mantienen la integridad del tono dopaminérgico.

La relación funcional entre γ -Syn y DAT se conoce con menor exactitud que en el caso de α -Syn y existen pocos estudios sobre ello. En modelos de sobreexpresión y silenciamiento mediante lentivirus en rata se ha demostrado que γ -Syn puede interactuar con DAT

conduciendo a una menor disponibilidad de DAT en las membranas sinápticas, de modo que reduce la recaptación de DA (Boyer & Dreyer, 2008; Oaks & Sidhu, 2011).

En este trabajo hemos comprobado mediante modelos murinos de sobreexpresión y silenciamiento que γ -Syn actúa como un modulador negativo de DAT, tal como se evidencia con la habilidad del inhibidor no selectivo de DAT/NAT, nomifensina, para aumentar de manera dosis-dependiente los niveles de DA extracelular. De este modo, la mayor expresión de γ -Syn reduciría la disponibilidad de DAT en la membrana sináptica y su función de recaptación de DA, mientras que el silenciamiento de γ -Syn estaría aumentando el tráfico y la función de DAT.

Esto demuestra la hipótesis de que γ -Syn modula negativamente la neurotransmisión DA, en este caso interactuando con el transportador DAT para modificar su disponibilidad a nivel de la superficie celular, al igual que se ha descrito para α -Syn (Oaks & Sidhu, 2011; Butler *et al.*, 2017; Alarcón-Arís *et al.*, 2018). Pese a la falta de estudios acerca de esta interacción, debido a esta homología entre α - y γ -Syn también es esperable que la modulación de γ -Syn sobre DAT también tenga lugar mediante la unión a su dominio central hidrofóbico (Wersinger & Sidhu, 2005; Jeannotte & Sidhu, 2007; Jeannotte *et al.*, 2008, 2009).

Respecto al modelo de sobreexpresión por AAV10, hemos obtenido los mismos resultados a las 4 y 12 semanas post-inyección, con unos menores niveles de liberación de DA y un aumento menos pronunciado frente al bloqueo de DAT. Esto evidencia nuevamente la utilidad y la estabilidad del modelo AAV10-CMV- γ -Syn para el estudio del rol biológico de γ -Syn en la función DA.

Adicionalmente, en el modelo de silenciamiento por IND-1415-ASO también se ha examinado la respuesta frente a la administración de amfetamina. Este fármaco conduce a la reversión del flujo de los transportadores vesiculares (VMAT2) y de los recaptadores de monoaminas (DAT y NAT); así, su administración produce una liberación de DA y NA desde las vesículas al espacio citosólico, y a continuación a la hendidura sináptica (Eiden & Weihe, 2011; Miller, 2011). De este modo, hemos comprobado que la menor expresión de γ -Syn conduce a una mayor respuesta frente a la amfetamina. Esto reafirma nuevamente el papel de γ -Syn como modulador negativo de DAT, tanto de su función

como su tráfico hacia la membrana sináptica; sin embargo, no se puede descartar que γ -Syn también tenga algún rol en la modulación de VMAT2 y el almacenamiento vesicular, como sí se ha demostrado respecto a α -Syn (Yavich *et al.*, 2004; Surguchov, 2008; Chadchankar *et al.*, 2011; Alarcón-Arís *et al.*, 2018).

Otro descubrimiento destacable acerca del modelo IND-1415-ASO ha sido la reducción de la expresión del transcrito de DAT en la SNc/VTA, correlacionada con el silenciamiento de γ -Syn. Este fenómeno no se ha observado anteriormente, en ningún estudio previo *in vitro* o *in vivo* sobre γ -Syn ni sobre el resto de sinucleínas, e incluso tampoco lo hemos detectado en nuestro modelo de sobreexpresión inducido por AAV10-CMV. Sin embargo, este efecto confirma la capacidad de γ -Syn para modular la transcripción de otras proteínas, como se ha descrito en los estudios sobre sus efectos oncogénicos (Surguchov *et al.*, 1999, 2001a; Surgucheva *et al.*, 2003, 2006). No obstante, tampoco es descartable que la modificación en la expresión de DAT se deba a efectos indirectos por la interacción de γ -Syn con otras proteínas o vías de señalización (Jiang *et al.*, 2003, 2004; Al Sweidi *et al.*, 2012).

Los principales efectos sobre la neurotransmisión DA de la sobreexpresión o silenciamiento de γ -Syn en SNc/VTA se encontraron en la vía nigroestriatal; sin embargo, también se han observado algunas alteraciones menores en la vía mesocortical. Aunque no podemos descartar los efectos directos relacionados con el nivel de expresión de γ -Syn en las neuronas DA de la SNc o la VTA, obtenidos después de la sobreexpresión o el silenciamiento, también es importante tener en cuenta las características diferenciales de las neuronas DA y sus proyecciones (Anderegg *et al.*, 2015).

Se ha reportado que las neuronas DA del mesencéfalo no son homogéneas, sino que tienen características distintivas en cuanto a sus propiedades electrofisiológicas, función y vulnerabilidad (Surmeier *et al.*, 2011, Schiemann *et al.*, 2012). De hecho, utilizando técnicas de resolución de célula única (*single cell resolution*) se han encontrado perfiles de expresión génica heterogéneos (Chung *et al.*, 2005; Brichta *et al.*, 2015). Esto podría ser plausible con los diferentes efectos observados entre la neurotransmisión DA nigroestriatal y mesocortical, después de la alteración por sobreexpresión y silenciamiento de los niveles de γ -Syn.

En este aspecto, también cabe considerar la función de las neuronas noradrenérgicas del LC, cuyas proyecciones en la mPFC presentan mucha mayor densidad en comparación con las fibras DA de la VTA (Schroeter *et al.*, 2000; Miner *et al.*, 2003). Mediante la estimulación eléctrica de estas neuronas noradrenérgicas se ha comprobado que son capaces de co-liberar NA y DA en la mPFC, pero no en el cuerpo estriado dorsal (Devoto *et al.*, 2001, 2005; Masana *et al.*, 2011, 2012). En la presente tesis, tanto la administración de nomifensina como de anfetamina condujo a un incremento similar de los niveles de DA en la mPFC de los ratones tratados con IND-1415-ASO o vehículo. Esto sugeriría que la gran contribución de DA extracelular proveniente de las proyecciones noradrenérgicas desde el LC hasta la mPFC estaría enmascarando el efecto del silenciamiento selectivo de γ -Syn en las neuronas DA de la SNc/VTA.

En conjunto, los resultados sobre la neurotransmisión DA evaluada *in vivo* indican y apoyan datos previos que muestran que tanto γ -Syn como α -Syn son moduladores negativos de la plasticidad monoaminérgica, alterando la función de los transportadores de monoaminas como DAT, así como los mecanismos de liberación del neurotransmisor (Abeliovich *et al.*, 2000; Cabin *et al.*, 2002; Anwar *et al.*, 2011; Alarcón-Arís *et al.*, 2018). Sin embargo, existen algunas diferencias respecto al nivel y vías de regulación de la función DA mediada por α - y γ -Syn que será necesario explorar en futuros estudios. Además, la eficacia del silenciamiento de γ -Syn inducido por IND-1415-ASO sugiere un potencial terapéutico como una nueva aproximación para la reducción de γ -Syn en las neuronas monoaminérgicas o en las glutamatérgicas de la habénula, con un alto valor traslacional en el tratamiento de las sinucleinopatías.

E. LA SOBREENPRESIÓN DE γ -SINUCLEÍNA EN LA SNc/VTA CONDUCE A ALTERACIONES MOTORAS Y COGNITIVAS

Una de las ventajas que se han expuesto sobre el modelo de sobreexpresión AAV10-CMV- γ -Syn es que permite el aumento de la expresión de γ -Syn en la SNc/VTA de modo estable y sostenido. Por esto, también se aprovechó para caracterizar las posibles alteraciones conductuales que pudieran estar relacionadas con el aumento de los niveles de γ -Syn.

En primer lugar se evaluaron las capacidades motoras de los ratones AAV10 en diferentes tiempos post-inyección. En la actividad locomotora y el uso de las patas delanteras no se detectó ningún tipo de alteración en los ratones con sobreexpresión, a pesar de sus diferencias en la neurotransmisión nigroestriatal. No existen estudios previos en modelos animales en los que se examine la influencia del aumento de γ -Syn en la función motora. Sin embargo, en modelos *knock-out* para γ -Syn no se han detectado alteraciones en las pruebas de campo abierto (Senior *et al.*, 2008); esto apuntaría a que la alteración de los niveles de γ -Syn no tendría implicaciones en la actividad locomotora normal, tal como se demuestra mediante este modelo de sobreexpresión.

No obstante, los ratones con sobreexpresión sí que presentaron una peor coordinación motora en el test *RotaRod* acelerado. Este paradigma es relevante porque requiere un entrenamiento previo y además es usado habitualmente para evaluar la sintomatología en los modelos animales de PD, ya que se asocia a la función DA nigroestriatal (Ulusoy *et al.*, 2012; Decressac *et al.*, 2012; Oliveras-Salvá *et al.*, 2013; Cunha *et al.*, 2016; Ghosh *et al.*, 2016). Esta peor coordinación motora concuerda con la reducción de la función DA nigroestriatal que se ha expuesto anteriormente, y confirma de nuevo el papel de γ -Syn como un modulador fino de la neurotransmisión, de modo que las consecuencias a nivel motor de su sobreexpresión se pondrían en evidencia frente a paradigmas de mayor complejidad como el *RotaRod*, con necesidad de entrenamiento previo.

En relación con la función cognitiva, los ratones con sobreexpresión también pasaron por varias pruebas para evaluar sus capacidades de memoria y aprendizaje. Existen múltiples evidencias que apuntan a que la función DA modular las funciones cognitivas relacionadas con el aprendizaje o la memoria a través de las proyecciones hacia zonas corticales o

subcorticales (Ott & Nieder, 2019; Conn *et al.*, 2020). De este modo, es esperable que para unas funciones cognitivas óptimas se requiera una neurotransmisión DA óptima.

En varios estudios se ha demostrado que las alteraciones la neurotransmisión DA hacia la mPFC o en elementos sinápticos de los terminales corticales pueden conducir a un empeoramiento de la memoria a corto plazo o la memoria espacial en modelos murinos (Glickstein *et al.*, 2002; Puig *et al.*, 2014; Duvarci *et al.*, 2018). Esto concuerda con los resultados en la función cognitiva de nuestro modelo AAV10, en el que hemos demostrado una menor neurotransmisión DA; así, en los ratones con sobreexpresión de γ -Syn mostraron una peor memoria a corto plazo, evaluada mediante el test de reconocimiento de objetos novedosos, y también en la memoria condicionada por miedo. Además, los ratones AAV10 también presentaron una peor capacidad de aprendizaje espacial, tal como se evaluó en el laberinto acuático de Morris.

En otros estudios con modelos de γ -Syn se ha comprobado que su delección en ratones se relaciona con una mejora en la memoria a corto plazo en el test de evitación pasiva y con un mejor aprendizaje espacial en el laberinto de Morris (Kokhan *et al.*, 2013, 2018); de este modo, en nuestro modelo demostramos la implicación de γ -Syn a través de su sobreexpresión, con resultados opuestos en la función cognitiva.

En las funciones cognitivas, en especial en el aprendizaje espacial, también se debe considerar la modulación que ejerce el sistema DA sobre la función del hipocampo. En concreto, se ha demostrado que la señalización DA contribuye en la plasticidad sináptica del giro dentado y la codificación de la memoria, de modo que la alteración de la neurotransmisión DA también puede tener consecuencias en esta región (Calabresi *et al.*, 2013; Du *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2017). En este modelo no se ha comprobado qué consecuencias tiene la sobreexpresión de γ -Syn sobre el hipocampo; sin embargo, estudios previos del grupo han mostrado que la sobreexpresión de la forma humana de α -Syn en la SNc/VTA mediante vectores AAV conduce a alteraciones en las fibras DA observadas como engrosamientos axonales, que entre otras zonas también se han detectado en el hipocampo y podrían constituir un indicio de alteración en la modulación DA de funciones como la memoria o el aprendizaje espacial (Alarcón-Arís *et al.*, 2020 *en revisión*).

En general, la evaluación del fenotipo conductual en el modelo de sobreexpresión de γ -Syn se correlacionan con las alteraciones neuroquímicas observadas anteriormente, tanto en el sistema nigroestriatal como el mesocortical. Además, se ha comprobado que en este modelo las alteraciones neuroquímicas aparecen antes que los déficits conductuales. Este patrón temporal también puede observarse en modelos de sobreexpresión de α -Syn, tanto en las células DA de la SNc/VTA como en las serotoninérgicas del DR (Alarcón-Arís *et al.*, 2020 *en revisión*; Alarcón-Arís *et al.*, 2020 *en preparación*). Además, también hemos demostrado que estas alteraciones en la función motora y cognitiva no se puede atribuir a la muerte de células TH⁺ en el sistema DA nigroestriatal, sino a la alteración de las neuronas funcionalmente dañadas, que por tanto deberán ser consideradas como un objetivo para los futuros tratamientos. Por tanto, el modelo AAV10- γ -Syn también representaría una aproximación útil para el estudio del papel de γ -Syn en el contexto de la PD y otras sinucleinopatías, en especial de sus fases tempranas, considerando que la aparición de las alteraciones del modelo de sobreexpresión presenta el mismo perfil temporal que la aparición de síntomas en los pacientes (Kalia & Lang, 2015; Poewe *et al.*, 2017).

F. LAS MUTACIONES *A30P*A53T DE α -SYN Y G2019S DE LRRK2 INDUCEN ALTERACIONES DE LA NEUROTRANSMISIÓN DA Y DÉFICITS DEL COMPORTAMIENTO EN RATONES

En el **trabajo 2** de esta tesis utilizamos dos modelos murinos portadores de formas humanas mutadas de α -Syn (α Syn***A30P*A53T**) y LRRK2 (LRRK2***G2019S**), para evaluar en ellos la eficacia de la molécula IND-1233-ASO como un tratamiento potencial para la PD, capaz de reducir la síntesis de α -Syn.

En este trabajo hemos descrito que el modelo α Syn***A30P*A53T** presenta una expresión de (h)- α -Syn en SNc/VTA y LC entre 3-4 veces mayor a la forma endógena de α -Syn; además, presentaron alteraciones en la neurotransmisión DA nigroestriatal y déficits motores. La

administración de IND-1233-ASO redujo sus niveles de α -Syn, restaurando la neurotransmisión DA, pero sin efectos sobre la función motora. Por su parte, el modelo LRRK2*G2019S presentó un ligero aumento de α -Syn en la SNc/VTA, junto con una alteración en la función DAT y una peor memoria a corto plazo, pero el IND-1233-ASO no fue capaz de reducir la expresión de α -Syn en este modelo.

I. MODELO ASYN*A30P*A53T

En primer lugar, hemos caracterizado la expresión de las sinucleínas en el modelo α Syn*A30P*A53T. Hasta la fecha se han desarrollado varios modelos transgénicos con formas mutadas de α -Syn, sobre todo con las mutaciones A30P y/o A53T, pero sus manifestaciones fenotípicas dependen en gran medida del promotor usado en el transgén y de los niveles de expresión de la α -Syn (Hatami & Chesselet, 2015). En el caso de nuestro modelo, el transgén de (h)- α -Syn se encuentra bajo el promotor de TH; otros modelos desarrollados también han empleado este promotor para la introducción de formas WT o mutadas de α -Syn en ratones, de modo que se centran en la especial vulnerabilidad de las neuronas DA en la patología de la PD (Richfield *et al.* 2002; Thiruchelvam *et al.*, 2004; Wakamatsu *et al.* 2008).

Así, en los ratones α Syn*A30P*A53T sólo hemos detectado la forma transgénica mutada de α -Syn en los núcleos catecolaminérgicos (SNc/VTA y LC), cuyas células son positivas para TH. Además, hemos demostrado que la expresión de la variante transgénica de α -Syn es entre 3 y 4 veces mayor en la SNc/VTA y el LC, en comparación con los niveles de α -Syn murina en estas áreas, mientras que no observamos cambios en la expresión de la α -Syn murina endógena. Ambas características concuerdan con estudios previos sobre este modelo que confirman la mayor expresión de la (h)- α -Syn transgénica, así como la ausencia de alteraciones en la α -Syn endógena (Richfield *et al.*, 2002; Unger *et al.*, 2006). Por tanto, esto apunta a que las alteraciones observadas en los ratones transgénicos sólo estarían relacionadas con la presencia de la α -Syn transgénica.

No obstante, también cabe destacar la ligera disminución de los niveles de expresión de γ -Syn en SNc/VTA y LC, donde se ha localizado la (h)- α -Syn. Actualmente no hay estudios

que muestren alteraciones en la expresión de γ -Syn en modelos animales con las mutaciones A30P y/o A53T, por lo que no podemos descartar la contribución de la menor expresión de γ -Syn en las alteraciones conductuales y neuroquímicas que hemos evaluado en el modelo α Syn*A30P*A53T.

Paralelamente, también comprobamos que en los ratones α Syn*A30P*A53T no hay ninguna pérdida de células TH⁺ en la SNc/VTA, al menos hasta los 4-5 meses de edad en los que fueron examinados. La expresión de α -Syn transgénica bajo el promotor TH sólo se ha asociado con la pérdida de células TH⁺ en pocos estudios (Thiruchelvam *et al.*, 2004; Wakamatsu *et al.*, 2008); no obstante, en el caso del modelo α Syn*A30P*A53T sí se ha apreciado una reducción del número de neuronas DA a partir de los 12 meses de edad (Kilpeläinen *et al.*, 2019). En este trabajo, la ausencia de pérdida de neuronas en la SNc/VTA de los ratones transgénicos también nos permite asegurar que los cambios fenotípicos que observamos en el modelo se deben a la alteración de neuronas funcionalmente dañadas, y no a la neurodegeneración.

Cuando caracterizamos la neurotransmisión DA nigroestriatal en los ratones α Syn*A30P*A53T comprobamos que presentaron alteraciones en la liberación de DA, de modo que mostraron una menor concentración de DA estriatal tras la infusión de un agente despolarizante como la veratridina. Esto concuerda con la función propuesta para α -Syn como un modulador negativo de los procesos de exocitosis y recarga de vesículas sinápticas (Sidhu *et al.*, 2004; Oaks & Sidhu, 2011). En este caso, el nivel de expresión aumentado de (h)- α -Syn estaría aumentando la inhibición del tráfico vesicular y de los procesos de anclaje y fusión de las vesículas mediados por las proteínas del complejo SNARE (Burré *et al.*, 2010; Nemani *et al.*, 2010; Sulzer *et al.*, 2010; Venda *et al.*, 2010; Almandoz-Gil *et al.*, 2018). De este modo, los ratones presentarían esta menor liberación de DA estriatal, al igual que se ha comprobado en estudios previos con la sobreexpresión de la forma WT de (h)- α -Syn (Alarcón-Arís *et al.*, 2018).

Además, también cabe considerar el efecto de las mutaciones en la (h)- α -Syn en la regulación de las proteínas del complejo SNARE. No se han reportado cambios en la interacción entre la forma mutada α -Syn*A53T y las proteínas de anclaje y fusión sinápticas (Burré *et al.*, 2012), pero en modelos portadores de la forma α -Syn*A30P se ha descrito una menor interacción, que dificultaría el ensamblaje del complejo SNARE y el

anclaje de las vesículas sinápticas (Piltonen *et al.*, 2013). Por esto, no podemos descartar que esta mutación en el modelo $\alpha\text{Syn}^*\text{A30P}^*\text{A53T}$ esté contribuyendo a la disfunción en la liberación de DA que observamos.

Por otra parte, los ratones $\alpha\text{Syn}^*\text{A30P}^*\text{A53T}$ presentaron una mayor respuesta frente a la infusión de anfetamina, con unos niveles de DA extracelular más elevados en CPu. Este resultado coincide con varios estudios que han examinado la respuesta ante la administración de anfetamina en este modelo murino, y que demuestran que los ratones $\alpha\text{Syn}^*\text{A30P}^*\text{A53T}$ presentan una mayor liberación de DA en edades tempranas, a pesar de que sus niveles de DA basal extracelular y de DAT estriatal son normales (Richfield *et al.*, 2002; Kilpeläinen *et al.*, 2019).

Algunos estudios indican que la forma mutada A30P de (h)- αSyn tendría una menor interacción con las vesículas sinápticas, y por tanto se reduciría su función de regulación del tráfico vesicular (Yavich *et al.*, 2004, 2005; Piltonen *et al.*, 2013). Además, la forma A30P puede modular la función y tráfico del transportador DAT de modo similar a la (h)- αSyn WT (Wersinger *et al.*, 2003), pero se ha descrito que la mutación A53T impide la interacción de (h)- αSyn con DAT, de modo que no puede ejercer su papel de modulación sobre el transportador (Wersinger & Sidhu, 2003, 2005; Unger *et al.*, 2006; Oaks *et al.*, 2013). Así, ambas observaciones apuntan a que la forma mutada de (h)- αSyn no sería capaz de ejercer su papel modulador en los terminales DA, lo cual concuerda con la respuesta más pronunciada que hemos observado durante la administración de anfetamina.

Estos resultados apoyan nuevamente el rol de αSyn como un regulador de la función de proteínas sinápticas como DAT o VMAT2 y del tráfico vesicular, e indican que se requieren unos niveles de expresión normales y una función correcta de αSyn para mantener la homeostasis en la neurotransmisión DA.

Por otro lado, en los ratones del modelo $\alpha\text{Syn}^*\text{A30P}^*\text{A53T}$ hemos detectado una menor actividad locomotora en el test de campo abierto, lo que coincide con los estudios que han utilizado concretamente este modelo (Rockenstein *et al.*, 2002; Ikeda *et al.*, 2009; Kilpeläinen *et al.*, 2019). Del mismo modo, en estudios con ratones transgénicos portadores de la (h)- αSyn con las mutaciones A30P o A53T también se han descrito

déficits en su actividad y coordinación motora (Sotiriou *et al.*, 2010; Oaks *et al.*, 2013; Paumier *et al.*, 2013; Piltonen *et al.*, 2013; Blesa & Przedborski, 2014).

Además, los ratones $\alpha\text{Syn}^*\text{A30P}^*\text{A53T}$ también han mostrado un comportamiento de tipo ansioso en la caja de luz/oscuridad. Esta alteración concuerda con los resultados descritos en este modelo (Rockenstein *et al.*, 2002; Kilpeläinen *et al.*, 2019), y también con las alteraciones de ratones portadores de (h)- αSyn con las mutaciones A30P o A53T (Graham & Sidhu, 2010; Oaks *et al.*, 2013). Los mecanismos involucrados en el comportamiento de tipo ansioso todavía no están claros, pero se ha descrito la implicación de la función DA en los mismos (Pogorelov *et al.*, 2005), de modo que los déficits en la síntesis y liberación de DA conducen a un mayor comportamiento de tipo ansioso en los ratones (Farrell *et al.*, 2014).

En general, los ratones portadores de formas mutadas A30P o A53T de (h)- αSyn no desarrollan neurodegeneración nigroestriatal, pero se han descrito algunas alteraciones patológicas en sus neuronas DA, a causa de la toxicidad *in vivo* de la (h)- αSyn (Tanji *et al.*, 2010; Tsika *et al.*, 2010; Blesa *et al.*, 2012; Farrell *et al.*, 2013); sin embargo, en edades tempranas (3-6 meses) no se ha detectado esta patología en los ratones transgénicos (Unger *et al.*, 2006; Graham & Sidhu, 2010; Farrell *et al.*, 2014). De este modo, los déficits motores o la conducta de tipo ansiosa que observamos en los ratones $\alpha\text{Syn}^*\text{A30P}^*\text{A53T}$ de 4-5 meses de edad sólo pueden atribuirse a la alteración de la neurotransmisión nigroestriatal, a causa de la disfunción de las neuronas DA.

La mayoría de los modelos transgénicos portadores de formas mutadas de (h)- αSyn presentan la limitación de que sus déficits conductuales sólo se han observado en edades avanzadas, mientras que la presencia de estas mutaciones en pacientes de PD conduce a una aparición más temprana de los síntomas (Stefanis, 2012). Sin embargo, en este estudio demostramos que los ratones $\alpha\text{Syn}^*\text{A30P}^*\text{A53T}$ no sólo presentan cambios conductuales tempranos sino también alteraciones en la función DA. Esto indicaría que la toxicidad de la forma doblemente mutada de (h)- αSyn empieza a edades tempranas, de modo similar a otros estudios con estos ratones transgénicos (Ikeda *et al.*, 2008; Kilpeläinen *et al.*, 2019). Así, estos resultados indican que el modelo $\alpha\text{Syn}^*\text{A30P}^*\text{A53T}$ reproduce varios de los síntomas tempranos de la PD y resulta una herramienta de especial utilidad frente al desarrollo de terapias modificadoras de las sinucleinopatías.

II. MODELO LRRK2*G2019S

En este trabajo de tesis también se evaluaron los efectos sobre la neurotransmisión DA y sobre el comportamiento en el modelo de ratón transgénico portador de la forma humana de la proteína LRRK2 con la mutación G2019S, a los 4-5 meses de edad.

La mutación del gen *LRRK2* es la causa genética más común en los pacientes de PD, presente en el 1-2% del total (Healy *et al.*, 2008; Paisán-Ruiz *et al.*, 2013; Rudenko & Cookson, 2014; Konno *et al.*, 2016). Las mutaciones más frecuentes de LRRK2 son G2019S y R1441C, aunque sus efectos en la patología son heterogéneos y en la mayoría de portadores de dichas mutaciones no llega a desarrollarse la enfermedad (Lee *et al.*, 2017; Domingo & Klein, 2018).

LRRK2 se ha visto implicada principalmente en la regulación del tráfico vesicular y la dinámica de membranas y en las respuestas inmunológicas (Alessi & Sammler, 2018). Las mutaciones G2019S y R1441C afectan a los dominios kinasa y GTPasa de la proteína LRRK2, respectivamente, de modo que su actividad enzimática se ve potenciada y se desarrollan alteraciones en la dinámica vesicular y en los mecanismos autofágicos y lisosomales (Roosen & Cookson, 2016; Liu *et al.*, 2018; Purlyte *et al.*, 2018). Concretamente, LRRK2 puede modular estos procesos fosforilando las GTPasas Rab, que dirigen la formación y el movimiento de vesículas a lo largo del citoesqueleto, así como los procesos de anclaje y fusión (Steger *et al.*, 2016, 2017). En modelos celulares se ha comprobado que la fosforilación de las proteínas Rab por parte de LRRK2 reduce la función de éstas en la regulación del tráfico de membranas, lo cual se ha asociado con la degeneración neuronal (Jeong *et al.*, 2018; Seol *et al.*, 2019). Además, hay evidencias en pacientes de que la disrupción de la función de varias proteínas de la familia Rab y otros elementos implicados en la regulación de membranas se asocian causalmente con el desarrollo de PD (Lai *et al.*, 2015; Domingo & Klein, 2018; Purlyte *et al.*, 2018).

En ratones se ha comprobado que LRRK2 se localiza principalmente en axones y dendritas del CPU, el tubérculo olfatorio y la corteza, áreas que se encuentran reguladas por el sistema DA a través de sus vías nigroestriatal, mesolímbica y mesocortical (Melrose *et al.*,

2006, 2007; Lee *et al.*, 2010). A pesar de esto, los ratones *knock-out* para LRRK2 son viables y no desarrollan alteraciones en su función DA ni ninguna característica patológica (Andrés-Mateos 2009; Lin *et al.*, 2009; Tong *et al.*, 2010). Además, la mayoría de los modelos portadores de formas como LRRK2*G2019S o LRRK2*R1441C tampoco presentan alteraciones en la cantidad o estructura de las neuronas DA de la SNc o las neuronas noradrenérgicas del LC (Blesa & Przedborski, 2014). No obstante, en estudios previos con nuestro modelo -portador de la forma LRRK2*G2019S humana introducida mediante el sistema BAC-, sí se ha descrito una reducción moderada de la DA estriatal junto a déficits motores en edades avanzadas (Li *et al.*, 2009, 2010; Melrose *et al.*, 2010; Winner *et al.*, 2011).

En nuestro modelo hemos comprobado que la expresión de α -Syn presenta niveles de expresión ligeramente elevados en la SNc/VTA de los ratones LRRK2*G2019S. Teniendo en cuenta todas las consecuencias descritas a causa de la presencia de la proteína LRRK2 mutada, es especialmente relevante la detección de los niveles de expresión aumentados de α -Syn, que por su función moduladora en la neurotransmisión DA podría estar contribuyendo a las alteraciones desarrolladas en estos ratones. En nuestro estudio hemos examinado los ratones transgénicos en edades tempranas; no obstante, también cabe destacar que en ratones LRRK2*G2019S envejecidos se ha descrito que la mutación puede aumentar la toxicidad inducida por α -Syn (Longo *et al.*, 2017; Novello *et al.*, 2018; Bieri *et al.*, 2019).

Cuando evaluamos la función DA nigroestriatal en los ratones LRRK2*G2019S observamos una alteración en la función de DAT, de modo que la administración de nomifensina provocó un aumento mayor de la DA en CPu. En varios modelos murinos con formas mutadas de LRRK2 se han descrito alteraciones moderadas en las neuronas DA de la SNc/VTA y en los niveles de DA estriatal, aunque los resultados varían en función de la edad de los ratones (Li *et al.*, 2010; Melrose *et al.*, 2010; Herzig *et al.*, 2011; Blesa & Przedborski, 2014; Volta *et al.*, 2017). Concretamente, se ha descrito que los niveles de DAT se encuentran aumentados en los terminales DA estriatales de ratones LRRK2*G2019S (Karuppagounder *et al.*, 2016; Longo *et al.*, 2017), lo cual concuerda con la mayor capacidad de nomifensina para aumentar los niveles de DA extracelular que hemos observado en este trabajo. Incluso, esta alteración en nuestro modelo reproduce la mayor

recaptación de DA estriatal que se ha detectado en humanos portadores de la mutación G2019S en el gen *LRRK2*, previamente a la aparición de síntomas de PD (Sossi *et al.*, 2010).

Por otro lado, en los ratones *LRRK2**G2019S no hemos observado alteraciones en sus funciones motoras ni un comportamiento de tipo ansioso o depresivo. En los modelos murinos portadores de formas mutadas de *LRRK2* hay una alta variabilidad en las evaluaciones conductuales, lo cual dificulta su interpretación (Volta & Melrose, 2017). En el comportamiento motor, nuestros resultados concuerdan con estudios en los que no se detectan diferencias en la actividad locomotora o en la coordinación motora de ratones *LRRK2**G2019S (Lin *et al.*, 2009; Herzig *et al.*, 2012), aunque en algunos casos se ha detectado una hiperactividad moderada en edades avanzadas de los ratones (Melrose *et al.*, 2010; Volta *et al.*, 2015).

No obstante, sí hemos detectado una menor memoria a corto plazo en los ratones *LRRK2**G2019S, evidenciada en el test de reconocimiento de objetos novedosos. A pesar de la importancia de la sintomatología no motora en la PD, hay pocos estudios que examinen las funciones cognitivas en estos modelos, pero sí se ha descrito un deterioro en la memoria de reconocimiento en el modelo *LRRK2**G2019S con el potenciador BAC (Beccano-Kelly *et al.*, 2015; Volta *et al.*, 2015), lo cual es consistente con las anormalidades en la función DA estriatal que hemos descrito anteriormente. Además, en el déficit cognitivo que observamos tampoco podemos descartar la contribución de las alteraciones en la plasticidad sináptica hipocámpal que se han descrito en estos ratones (Sweet *et al.*, 2015; Adeosun *et al.*, 2017).

En conjunto, el estudio de los ratones *LRRK2**G2019S también ha aportado información sobre el rol de *LRRK2* y las consecuencias de su mutación en la función DA y el comportamiento. Aunque los modelos *LRRK2* aún presentan limitaciones como la ausencia de neurodegeneración dependiente de la edad, sus características permiten explorar los mecanismos más tempranos de la patología y explorar nuevas terapias modificadoras de la PD, especialmente en las fases preclínicas de la enfermedad.

G. LA ADMINISTRACIÓN DE IND-1233-ASO EN EL MODELO MURINO α SYN*A30P*A53T REVIERTE LAS ALTERACIONES EN LA NEUROTRANSMISIÓN DA, PERO NO EL FENOTIPO CONDUCTUAL

Los modelos murinos transgénicos α Syn*A30P*A53T y LRRK2*G2019S también se usaron para evaluar la eficacia del tratamiento con IND-1233-ASO. Esta molécula fue diseñada para presentar homología con el mRNA de α -Syn de ratón, rata, mono y humano; en estudios previos del grupo de investigación ha sido evaluada en ratones normales y monos Rhesus envejecidos, y en ambos casos su administración ha permitido silenciar la expresión de α -Syn selectivamente en las neuronas monoaminérgicas (Alarcón Arís *et al.*, 2018). Además, usando la misma estrategia también se ha diseñado un ASO conjugado, IND-1337-ASO, capaz de reducir exclusivamente la expresión de la (h)- α -Syn clonada en un modelo de sobreexpresión inducido por AAV5-CBA-(h)- α -Syn en las neuronas DA de la SNc/VTA (Alarcón-Arís *et al.*, 2020 *en revisión*), y también en las neuronas serotoninérgicas del DR (Alarcón-Arís *et al.*, 2020 *en preparación*).

En los ratones α Syn*A30P*A53T, el tratamiento con IND-1233-ASO durante 28 días por vía intracerebroventricular permitió una reducción selectiva de alrededor del 40% de los niveles de expresión del mRNA de (h)- α -Syn en la SNc/VTA y el LC, y también una disminución de los niveles de proteína (h)- α -Syn en la SNc/VTA. De este modo, hemos demostrado la capacidad de IND-1233-ASO para reducir la expresión de la forma humana de α -Syn, y en este caso de su forma mutada *A30P*A53T. También hemos observado que no se han producido cambios en la expresión de la forma endógena de α -Syn en estos ratones, a pesar de la homología de IND-1233-ASO por ambas formas. Sin embargo, la expresión de (h)- α -Syn es 3-4 veces superior a la forma endógena de α -Syn, de modo que es esperable que la mayoría de moléculas ASO internalizadas por las neuronas DA y NA estén siendo procesadas para el silenciamiento del transcrito de (h)- α -Syn.

Por otro lado, en estudios previos hemos reportado la seguridad biológica de la molécula IND-1233-ASO empleada para el silenciamiento de la α -Syn murina (Alarcón-Arís *et al.*, 2018). En el modelo α Syn*A30P*A53T no hemos apreciado ninguna modificación en el número de células TH⁺ de la SNc/VTA en los ratones administrados con IND-1233-ASO, de

modo que la reducción del 40% de los niveles de (h)- α -Syn tampoco estaría induciendo neurotoxicidad en la SNc/VTA. Estos resultados contrastan con estudios en los que se alcanza una reducción más pronunciada de α -Syn empleando shRNA mediante vectores AAV, ya que en estos casos sí se ha reportado degeneración de las neuronas DA y denervación de los terminales estriatales (Gorbatyuk *et al.*, 2010; Khodr *et al.*, 2011; Collier *et al.*, 2016). Así, nuestros resultados aportan una información importante en el contexto del desarrollo de terapias modificadoras de las sinucleinopatías, y confirman evidencias previas de que la terapia con oligonucleótidos antisentido no basados en vectores víricos para modificar la expresión de (h)- α -Syn resulta biológicamente más segura y menos inmunogénica que las aproximaciones con AAV (Hardee *et al.*, 2017).

Por otra parte, el silenciamiento de (h)- α -Syn en los ratones α Syn* $A30P^*A53T$ también ha conseguido revertir las alteraciones en la neurotransmisión DA nigroestriatal. Así, en los ratones transgénicos tratados con IND-1233-ASO ha aumentado la liberación de DA dependiente de despolarización, y se ha observado un menor aumento de DA extracelular durante la administración de anfetamina. Considerando el papel de α -Syn sobre la neurotransmisión DA, la administración sostenida de IND-1233-ASO muestra así su eficacia para revertir los déficits en la función DA nigroestriatal, en este caso inducidos por la expresión de (h)- α -Syn con las mutaciones * $A30P^*A53T$. En estudios previos del grupo también se han observado estos mismos resultados en un modelo de sobreexpresión AAV5-(h)- α -Syn, empleando un oligonucleótido específico para la forma clonada de (h)- α -Syn en el vector vírico (IND-1337-ASO) (Alarcón-Arís *et al.*, 2020 *en revisión*; 2020 *en preparación*).

No obstante, la administración de IND-1233-ASO no consiguió revertir las alteraciones en la función motora y el comportamiento de tipo ansioso en los ratones α Syn* $A30P^*A53T$. No hay estudios previos que examinen las consecuencias conductuales de la reducción de (h)- α -Syn en este modelo transgénico. Debe tenerse en consideración que el transgén de α Syn* $A30P^*A53T$ bajo el promotor de TH se expresa en las neuronas DA y NA de los ratones desde el nacimiento y no en un momento puntual de la edad adulta como en los modelos utilizando vectores AAV, lo cual sugiere adaptaciones de los circuitos DA y NA. Estos resultados evidencian la limitación de la administración de IND-1233-ASO para

modificar el fenotipo comportamental, al menos en las dosis y/o tiempo de administración empleadas en este trabajo.

Para finalizar, también se aplicó el mismo tratamiento con IND-1233-ASO sobre el modelo LRRK2*G2019S, en los que la expresión de α -Syn se encuentra aumentada en la SNc/VTA. Sin embargo, tras 28 días de administración no se observó ningún cambio en la expresión de la α -Syn endógena respecto a los transgénicos tratados con vehículo.

No obstante, teniendo en consideración que la proteína LRRK2 se ha visto implicada principalmente en la dinámica de membranas y el tráfico endosomal (Roosen *et al.*, 2016; Blanca-Ramírez *et al.*, 2017; Hur *et al.*, 2019), es posible que la mutación LRRK2*G2019S también esté afectando la acumulación e internalización de IND-1233-ASO en las neuronas monoaminérgicas, conduciendo a la ausencia de efecto del oligonucleótido para reducir la síntesis de α -Syn endógena en las mismas. De hecho, en ratones normales y en monos envejecidos, nosotros demostramos que la molécula IND-1233-ASO fue capaz de reducir la expresión de α -Syn endógena en los núcleos monoaminérgicos con una función normal de las proteínas Rab, e incluso hemos identificado ASOs conjugados colocalizando con las proteínas Rab5 y Rab7 en endosomas tempranos y tardíos (Alarcon-Aris *et al.*, 2018, 2020). Por lo tanto, puede considerarse que la acción de la forma mutada de LRRK2 en el modelo murino esté alterando la internalización del IND-1233-ASO e impidiendo su efecto de silenciamiento.

En conjunto, el **trabajo 2** ha proporcionado información relevante sobre el efecto de las mutaciones A30P y A53T en el gen de α -Syn y de la mutación G2019S en LRKK2 en el contexto de los modelos de sinucleinopatías. Además, al menos en el modelo α Syn*A30P*A53T también se ha demostrado el potencial terapéutico y las limitaciones del IND-1233-ASO sobre la (h)- α -Syn, mostrando que es capaz de reducir su expresión en las neuronas monoaminérgicas y revertir sus efectos sobre la función DA, aunque no sus consecuencias conductuales.

1. γ -Syn se expresa de manera abundante y selectiva en los núcleos monoaminérgicos de la *substantia nigra* compacta, área tegmental ventral, rafe dorsal y *locus coeruleus*, así como en el núcleo lateral de la habénula de ratón. Sin embargo, los niveles del mRNA de γ -Syn son escasos o nulos en el resto de regiones corticales o subcorticales.
2. La proteína γ -Syn regula la neurotransmisión DA nigroestriatal y en menor medida la mesocortical, interactuando al menos con las vesículas sinápticas y el transportador DAT. Mientras que el incremento de la expresión de γ -Syn reduce la liberación vesicular de DA y altera el mecanismo de recaptación de DA mediado por DAT, la disminución de los niveles celulares de γ -Syn facilita la función de DAT.
3. La administración local aguda de la molécula IND-1415-ASO reduce selectivamente la expresión de γ -Syn en las neuronas DA de la SNc/VTA. La administración intracerebroventricular sostenida de IND-1415-ASO reduce la expresión de γ -Syn en las neuronas monoaminérgicas de la SNc/VTA, DR y LC.
4. El silenciamiento de la expresión de γ -Syn se correlaciona con la reducción de los niveles de expresión de DAT en la SNc/VTA. Además, la reducción sostenida de los niveles de γ -Syn durante 14 días en los núcleos monoaminérgicos conduce a un aumento de la expresión de β -Syn en estas áreas.

5. La sobreexpresión de la forma murina de γ -Syn en la SNc/VTA de ratón mediante un vector AAV10 recapitula algunos síntomas de la PD y las sinucleinopatías como una menor neurotransmisión DA y el posterior deterioro en las funciones motoras y cognitivo-afectivas. Aunque el modelo no presenta indicios de neurodegeneración, muestra utilidad para examinar nuevas dianas de acción terapéuticas en fases tempranas de las sinucleinopatías.

6. La expresión de de (h)- α -Syn con las mutaciones A30P y A53T en ratones transgénicos conduce a alteraciones en la liberación y recaptación de DA en el circuito nigroestriatal junto con deterioros de la actividad motora y el fenotipo emocional. La administración intracerebroventricular de IND-1233-ASO reduce la expresión de la (h)- α -Syn en este modelo murino, revirtiendo el fenotipo neuroquímico pero no las deficiencias conductuales.

7. La expresión de la forma humana del gen *LRRK2* con la mutación G2019S en ratones transgénicos deja niveles ligeramente aumentados de α -Syn en la SNc/VTA, junto con la alteración de la recaptación de DA en el sistema nigroestriatal y un empeoramiento de memoria a corto plazo. La administración sostenida de IND-1233-ASO no modifica la expresión de de α -Syn.

REFERENCIAS

REFERENCIAS

REFERENCIAS

REFERENCIAS

REFERENCIAS

REFERENCIAS

REFERENCIAS

REFERENCIAS

REFERENCIAS

REFERENCIAS

REFERENCIAS

REFERENCIAS

PUBLICACIONES Y PRESENTACIONES

Durante el desarrollo de la presente tesis se han presentado sus resultados en los siguientes congresos, conferencias y trabajos:

Pavia-Collado, R., Ruiz-Bronchal, E., Campa, L., Artigas, F., & Bortolozzi, A. (2016, October 6-7). *Regulation of nigrostriatal dopamine neurotransmission by gamma-synuclein: down- and over-expression mouse models* [Poster communication]. X Simposi de Neurobiologia (Societat Catalana de Biologia), Barcelona, Spain.

Pavia-Collado, R., Alarcón-Arís, D., Artigas, F., & Bortolozzi, A. (2017, June 1-2). *Rol de alfa- y gamma-sinucleína sobre la neurotransmisión dopaminérgica. Implicación en las habilidades cognitivas* [Oral communication]. V Laboratorio de Ideas para jóvenes investigadores (CIBERSAM), Santander, Spain.

Pavia-Collado, R., Ruiz-Bronchal, E., Campa, L., Artigas, F., & Bortolozzi, A. (2017, September 27-30). *Regulation of nigrostriatal dopamine neurotransmission by gamma-synuclein: down- and over-expression mouse models* [Poster communication]. XVII Congreso de la Sociedad Española de Neurociencia, Alicante, Spain.

Pavia-Collado, R., Alarcón-Arís, D., Ruiz-Bronchal, E., Artigas, F., & Bortolozzi, A. (2017, November 11-15). *Short- and long-term memory impairment in mice overexpressing alpha- and gamma-synuclein in the dopamine neurons. Implication in Parkinson's disease* [Poster communication]. Neuroscience 2017 (Society for Neuroscience), Washington D.C., USA.

Pavia-Collado, R., Alarcón-Arís, D., Ruiz-Bronchal, E., Artigas, F., & Bortolozzi, A. (2018, March 15-18). *Impairment of learning and memory in mice overexpressing alpha- and gamma-synuclein in dopaminergic neurons. Implication in Parkinson's disease* [Poster communication]. ECNP Workshop for Junior Scientists in Europe, Nice, France.

Rodríguez-Aller, R. (2018). *Gamma-synuclein as a possible therapeutic target for Parkinson's disease*. (Master's thesis). Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain.

Ruiz-Bronchal, E., Pavia-Collado, R., Alarcón-Arís, D., Coppola, V., Revilla, R., Montefeltro, A., Artigas, F., & Bortolozzi, A. (2018, July 7-11). *Differential effects on neurotransmission and behavior in mouse models overexpressing human wild-type or mutated alpha-synuclein or mutated*

- LRRK2 protein* [Poster communication]. 11th Forum of Neuroscience (Federation of Europea Neurosciences Societies), Berlin, Germany.
- Pavia-Collado, R., Alarcón-Arís, D., Ruiz-Bronchal, E., Coppola, V., Revilla, R., Montefeltro, A., Artigas, F., & Bortolozzi, A. (2018, October 6-9). *Differential effects on neurotransmission and behavior in mouse models overexpressing human wild-type or mutated alpha-synuclein or mutated LRRK2 protein* [Poster communication & Jam Session]. 31st European College of Neuropsychopharmacology Congress, Barcelona, Spain.
- Pavia-Collado, R., Alarcón-Arís, D., Ruiz-Bronchal, E., Coppola, V., Miquel-Rio, L., Revilla, R., Montefeltro, A., Artigas, F., & Bortolozzi, A. (2018, November 12-13). *Overexpression of human wild-type or mutated alpha-synuclein or LRRK2 in mice results in differential dopaminergic neurotransmission, and motor, cognitive and emotional behaviors* [Poster communication]. XI Simposi de Neurobiologia (Societat Catalana de Neurobiologia), Barcelona, Spain.
- Pavia-Collado, R. (2019, January 18). *Overexpression of human wild-type or mutated alpha-synuclein or LRRK2 in mice results in differential dopaminergic neurotransmission, and motor, cognitive and emotional behaviors* [Oral communication]. 3rd BioMed PhD Day (Universitat de Barcelona), Barcelona, Spain.
- Pavia-Collado, R. (2019, February 4). *Advances in new models of Parkinson's disease through antisense therapies* [Flash Talk]. VII Jornada d'Investigadors Predoctorals Interdisciplinària, Barcelona, Spain.
- Pavia-Collado, R., Alarcón-Arís, D., Ruiz-Bronchal, E., Coppola, V., Revilla, R., Montefeltro, A., Artigas, F., & Bortolozzi, A. (2019, September 4-6). *Differential effects on neurotransmission and behavior in mouse models overexpressing human wild-type or mutated alpha-synuclein or mutated LRRK2 protein* [Poster communication]. XVIII Congreso de la Sociedad Española de Neurociencia, Santiago de Compostela, Spain.

Durante el desarrollo de la presente tesis también se ha colaborado en los siguientes trabajos de investigación:

Alarcon-Aris, D., Recasens, A., Galofre, M., Carballo-Carbajal, I., Zacchi, N., Ruiz-Bronchal, E., Pavia-Collado, R., Chica, R., Ferrés-Coy, A., Santos, M., Revilla, R., Montefeltro, A., Farinas, I., Artigas, F., Vila, M., & Bortolozzi, A. (2018). Selective alpha-Synuclein Knockdown in Monoamine Neurons by Intranasal Oligonucleotide Delivery: Potential Therapy for Parkinson's Disease. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*, 26(2), 550–567.

Alarcón-Arís, D., Pavia-Collado, R., Coppola-Segovia, V., Miquel-Rio, L., Ferrés-Coy, A., Ruiz-Bronchal, E., Galofré, M., Paz, V., Campa, L., Revilla, R., Montefeltro, A., Kordower, J. H., Vila, M., Artigas, F., Bortolozzi, A. (2020). *Anti- α -synuclein ASO-therapeutic delivered to monoamine neurons prevents α -synuclein accumulation along the brain connectome* [Manuscript submitted for publication]. Departament de Neuroquímica i Neurofarmacologia, Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona (CSIC).

Alarcón-Arís, D., Pavia-Collado, R., Ferrés-Coy, A., Ruiz-Bronchal, E., Coppola-Segovia, V., Miquel-Rio, L., Paz, V., Campa, L., Revilla, R., Montefeltro, A., Vila, M., Artigas, F., Bortolozzi, A. (2020). *Human α -synuclein overexpression in mouse raphe nuclei induces Parkinson's disease pathology. Reversal by conjugated antisense therapy*. [Unpublished Manuscript]. Departament de Neuroquímica i Neurofarmacologia, Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona (CSIC).

BIBLIOGRAFÍA

A

- Aarsland, D., Zuccai, J., & Brayne, C. (2005). A systematic review of prevalence studies of dementia in Parkinson's disease. *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*, 20(10), 1255–1263.
- Abbott, R. A., Cox, M., Markus, H., & Tomkins, A. (1992). Diet, body size and micronutrient status in Parkinson's disease. *European Journal of Clinical Nutrition*, 46(12), 879–884.
- Abbott, R. D., Ross, G. W., Petrovitch, H., Masaki, K. H., Launer, L. J., Nelson, J. S., White, L. R., & Tanner, C. M. (2016). Midlife milk consumption and substantia nigra neuron density at death. *Neurology*, 86(6), 512–519.
- Abe, K., Kobayashi, N., Sode, K., & Ikebukuro, K. (2007). Peptide ligand screening of alpha-synuclein aggregation modulators by in silico panning. *BMC Bioinformatics*, 8, 451.
- Abeliovich, A., Schmitz, Y., Farinas, I., Choi-Lundberg, D., Ho, W. H., Castillo, P. E., Shinsky, N., Verdugo, J. M., Armanini, M., Ryan, A., Hynes, M., Phillips, H., Sulzer, D., & Rosenthal, A. (2000). Mice lacking alpha-synuclein display functional deficits in the nigrostriatal dopamine system. *Neuron*, 25(1), 239–252.
- Adeosun, S. O., Hou, X., Zheng, B., Melrose, H. L., Mosley, T., & Wang, J. M. (2017). Human LRRK2 G2019S mutation represses post-synaptic protein PSD95 and causes cognitive impairment in transgenic mice. *Neurobiology of Learning and Memory*, 142(Pt B), 182–189.
- Adler, C. H., & Beach, T. G. (2016). Neuropathological basis of nonmotor manifestations of Parkinson's disease. *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*, 31(8), 1114–1119.
- Ahlskog, J. E. (2011). Does vigorous exercise have a neuroprotective effect in Parkinson disease? *Neurology*, 77(3), 288–294.
- Ahmad, M., Attoub, S., Singh, M. N., Martin, F. L., & El-Agnaf, O. M. a. (2007). Gamma-synuclein and the progression of cancer. *The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 21(13), 3419–3430.
- Ahn, M., Kim, S., Kang, M., Ryu, Y., & Kim, T. D. (2006). Chaperone-like activities of alpha-synuclein: alpha-synuclein assists enzyme activities of esterases. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 346(4), 1142–1149.
- Aizawa, H. (2013). Habenula and the asymmetric development of the vertebrate brain. *Anatomical Science International*, 88(1), 1–9.
- Aizawa, H., Cui, W., Tanaka, K., & Okamoto, H. (2013). Hyperactivation of the habenula as a link between depression and sleep disturbance. *Frontiers in Human Neuroscience*, 7, 826.
- Akache, B., Grimm, D., Pandey, K., Yant, S. R., Xu, H., & Kay, M. A. (2006). The 37/67-kilodalton laminin receptor is a receptor for adeno-associated virus serotypes 8, 2, 3, and 9. *Journal of Virology*, 80(19), 9831–9836.
- Al Sweidi, S., Sanchez, M. G., Bourque, M., Morissette, M., Dluzen, D., & Di Paolo, T. (2012). Oestrogen receptors and signalling pathways: implications for neuroprotective effects of sex steroids in Parkinson's disease. *Journal of Neuroendocrinology*, 24(1), 48–61.
- Alam, P., Bousset, L., Melki, R., & Otzen, D. E. (2019). α -synuclein oligomers and fibrils: a spectrum of species, a spectrum of toxicities. *Journal of Neurochemistry*, 150(5), 522–534.
- Alarcón-Arís, D., Pavia-Collado, R., Coppola-Segovia, V., Miquel-Rio, L., Ferrés-Coy, A., Ruiz-Bronchal, E., Galofré, M., Paz, V., Campa, L., Revilla, R., Montefeltro, A., Kordower, J. H., Vila, M., Artigas, F., Bortolozzi, A. (2020). *Anti- α -synuclein ASO-therapeutic delivered to monoamine neurons prevents α -synuclein accumulation along the brain connectome* [Manuscript submitted for publication]. Departament de Neuroquímica i Neurofarmacologia, Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona (CSIC).
- Alarcón-Arís, D., Pavia-Collado, R., Ferrés-Coy, A., Ruiz-Bronchal, E., Coppola-Segovia, V., Miquel-Rio, L., Paz, V., Campa, L., Revilla, R., Montefeltro, A., Vila, M., Artigas, F., Bortolozzi, A. (2020). *Human α -synuclein overexpression in mouse raphe nuclei induces Parkinson's disease pathology. Reversal by conjugated antisense therapy*. [Unpublished Manuscript]. Departament de Neuroquímica i Neurofarmacologia, Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona (CSIC).
- Alarcon-Aris, D., Recasens, A., Galofre, M., Carballo-Carbajal, I., Zacchi, N., Ruiz-Bronchal, E., Pavia-Collado, R., Chica, R., Ferrés-Coy, A., Santos, M., Revilla, R., Montefeltro, A., Farinas, I., Artigas, F., Vila, M., & Bortolozzi, A. (2018). Selective alpha-Synuclein Knockdown in Monoamine Neurons by Intranasal Oligonucleotide Delivery: Potential Therapy for Parkinson's Disease. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*, 26(2), 550–567.

- Albin, R. L., Koeppe, R. A., Bohnen, N. I., Wernette, K., Kilbourn, M. A., & Frey, K. A. (2008). Spared caudal brainstem SERT binding in early Parkinson's disease. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 28(3), 441–444.
- Alerte, T. N. M., Akinfolarin, A. A., Friedrich, E. E., Mader, S. A., Hong, C.-S., & Perez, R. G. (2008). Alpha-synuclein aggregation alters tyrosine hydroxylase phosphorylation and immunoreactivity: lessons from viral transduction of knockout mice. *Neuroscience Letters*, 435(1), 24–29.
- Alessi, D. R., & Sammler, E. (2018). LRRK2 kinase in Parkinson's disease. *Science (New York, N.Y.)*, 360(6384), 36–37.
- Almadoz-Gil, L., Persson, E., Lindstrom, V., Ingelsson, M., Erlandsson, A., & Bergstrom, J. (2018). In Situ Proximity Ligation Assay Reveals Co-Localization of Alpha-Synuclein and SNARE Proteins in Murine Primary Neurons. *Frontiers in Neurology*, 9, 180.
- Alves Da Costa, C., Paitel, E., Vincent, B., & Checler, F. (2002). Alpha-synuclein lowers p53-dependent apoptotic response of neuronal cells. Abolishment by 6-hydroxydopamine and implication for Parkinson's disease. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(52), 50980–50984.
- Amer, D. A. M., Irvine, G. B., & El-Agnaf, O. M. A. (2006). Inhibitors of alpha-synuclein oligomerization and toxicity: a future therapeutic strategy for Parkinson's disease and related disorders. *Experimental Brain Research*, 173(2), 223–233.
- Anand, V. S., & Braithwaite, S. P. (2009). LRRK2 in Parkinson's disease: biochemical functions. *The FEBS Journal*, 276(22), 6428–6435.
- Anderegg, A., Poulin, J.-F., & Awatramani, R. (2015). Molecular heterogeneity of midbrain dopaminergic neurons—Moving toward single cell resolution. *FEBS Letters*, 589(24 Pt A), 3714–3726.
- Andres-Mateos, E., Mejias, R., Sasaki, M., Li, X., Lin, B. M., Biskup, S., Zhang, L., Banerjee, R., Thomas, B., Yang, L., Liu, G., Beal, M. F., Huso, D. L., Dawson, T. M., & Dawson, V. L. (2009). Unexpected lack of hypersensitivity in LRRK2 knock-out mice to MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine). *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 29(50), 15846–15850.
- Angot, E., & Brundin, P. (2009). Dissecting the potential molecular mechanisms underlying alpha-synuclein cell-to-cell transfer in Parkinson's disease. *Parkinsonism & Related Disorders*, 15 Suppl 3, S143-7.
- Angot, E., Steiner, J. A., Lema Tome, C. M., Ekstrom, P., Mattsson, B., Bjorklund, A., & Brundin, P. (2012). Alpha-synuclein cell-to-cell transfer and seeding in grafted dopaminergic neurons in vivo. *PloS One*, 7(6), e39465.
- Anwar, S., Peters, O., Millership, S., Ninkina, N., Doig, N., Connor-Robson, N., Threlfell, S., Kooner, G., Deacon, R. M., Bannerman, D. M., Bolam, J. P., Chandra, S. S., Cragg, S. J., Wade-Martins, R., & Buchman, V. L. (2011). Functional alterations to the nigrostriatal system in mice lacking all three members of the synuclein family. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 31(20), 7264–7274.
- Appel-Cresswell, S., Vilarino-Guell, C., Encarnacion, M., Sherman, H., Yu, I., Shah, B., Weir, D., Thompson, C., Szu-Tu, C., Trinh, J., Aasly, J. O., Rajput, A., Rajput, A. H., Jon Stoessl, A., & Farrer, M. J. (2013). Alpha-synuclein p.H50Q, a novel pathogenic mutation for Parkinson's disease. *Movement Disorders*, 28(6), 811–813.
- Aquino, C. C., & Fox, S. H. (2015). Clinical spectrum of levodopa-induced complications. *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*, 30(1), 80–89.
- Arai, T., Ueda, K., Ikeda, K., Akiyama, H., Haga, C., Kondo, H., Kuroki, N., Niizato, K., Iritani, S., & Tsuchiya, K. (1999). Argypophilic glial inclusions in the midbrain of patients with Parkinson's disease and diffuse Lewy body disease are immunopositive for NACP/alpha-synuclein. *Neuroscience Letters*, 259(2), 83–86.
- Arbez, N., He, X., Huang, Y., Ren, M., Liang, Y., Nucifora, F. C., Wang, X., Pei, Z., Tassarolo, L., Smith, W. W., & Ross, C. A. (2020). G2019S-LRRK2 mutation enhances MPTP-linked Parkinsonism in mice. *Human Molecular Genetics*, 29(4), 580–590.
- Arima, K., Ueda, K., Sunohara, N., Arakawa, K., Hirai, S., Nakamura, M., Tonzuka-Uehara, H., & Kawai, M. (1998a). NACP/alpha-synuclein immunoreactivity in fibrillary components of neuronal and oligodendroglial cytoplasmic inclusions in the pontine nuclei in multiple system atrophy. *Acta Neuropathologica*, 96(5), 439–444.
- Arima, K., Ueda, K., Sunohara, N., Hirai, S., Izumiyama, Y., Tonzuka-Uehara, H., & Kawai, M. (1998b). Immunoelectron-microscopic demonstration of NACP/alpha-synuclein-epitopes on the filamentous component of Lewy bodies in Parkinson's disease and in dementia with Lewy bodies. *Brain Research*, 808(1), 93–100.
- Artigas, F., & Bortolozzi, A. (2017). Therapeutic Potential of Conjugated siRNAs for the Treatment of Major Depressive Disorder. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 42(1), 371.
- Ascherio, A., Zhang, S. M., Hernan, M. A., Kawachi, I., Colditz, G. A., Speizer, F. E., & Willett, W. C. (2001). Prospective study of caffeine consumption and risk of Parkinson's disease in men and women. *Annals of Neurology*, 50(1), 56–63.

- Ascherio, A., Chen, H., Weisskopf, M. G., O'Reilly, E., McCullough, M. L., Calle, E. E., Schwarzschild, M. A., & Thun, M. J. (2006). Pesticide exposure and risk for Parkinson's disease. *Annals of Neurology*, 60(2), 197–203.
- Ascherio, A., & Schwarzschild, M. A. (2016). The epidemiology of Parkinson's disease: risk factors and prevention. *The Lancet. Neurology*, 15(12), 1257–1272.
- Ascherio, A., Weisskopf, M. G., O'Reilly, E. J., McCullough, M. L., Calle, E. E., Rodriguez, C., & Thun, M. J. (2004). Coffee consumption, gender, and Parkinson's disease mortality in the cancer prevention study II cohort: the modifying effects of estrogen. *American Journal of Epidemiology*, 160(10), 977–984.
- Asci, R., Vallefuoco, F., Andolfo, I., Bruno, M., De Falco, L., & Iolascon, A. (2013). Trasferrin receptor 2 gene regulation by microRNA 221 in SH-SY5Y cells treated with MPP(+) as Parkinson's disease cellular model. *Neuroscience Research*, 77(3), 121–127.
- Attems, J., & Jellinger, K. A. (2008). The dorsal motor nucleus of the vagus is not an obligatory trigger site of Parkinson's disease. *Neuropathology and applied neurobiology*, 34(4), 466–467.
- Auinger, P., Kiebertz, K., & McDermott, M. P. (2010). The relationship between uric acid levels and Huntington's disease progression. *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*, 25(2), 224–228.
- Auluck, P. K., Caraveo, G., & Lindquist, S. (2010). alpha-Synuclein: membrane interactions and toxicity in Parkinson's disease. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 26, 211–233.
- Ayala, A., Venero, J. L., Cano, J., & Machado, A. (2007). Mitochondrial toxins and neurodegenerative diseases. *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library*, 12, 986–1007.
- Azeredo da Silveira, S., Schneider, B. L., Cifuentes-Diaz, C., Sage, D., Abbas-Terki, T., Iwatsubo, T., Unser, M., & Aebischer, P. (2009). Phosphorylation does not prompt, nor prevent, the formation of alpha-synuclein toxic species in a rat model of Parkinson's disease. *Human Molecular Genetics*, 18(5), 872–887.

B

- Bak, R. O., & Porteus, M. H. (2017). CRISPR-Mediated Integration of Large Gene Cassettes Using AAV Donor Vectors. *Cell Reports*, 20(3), 750–756.
- Baldi, I., Cantagrel, A., Lebailly, P., Tison, F., Dubroca, B., Chrysostome, V., Dartigues, J.-F., & Brochard, P. (2003). Association between Parkinson's disease and exposure to pesticides in southwestern France. *Neuroepidemiology*, 22(5), 305–310.
- Ballanger, B., Strafella, A. P., van Eimeren, T., Zurowski, M., Rusjan, P. M., Houle, S., & Fox, S. H. (2010). Serotonin 2A receptors and visual hallucinations in Parkinson disease. *Archives of Neurology*, 67(4), 416–421.
- Baptista, M. J., O'Farrell, C., Daya, S., Ahmad, R., Miller, D. W., Hardy, J., Farrer, M. J., & Cookson, M. R. (2003). Co-ordinate transcriptional regulation of dopamine synthesis genes by alpha-synuclein in human neuroblastoma cell lines. *Journal of Neurochemistry*, 85(4), 957–968.
- Barichella, M., Cereda, E., & Pezzoli, G. (2009). Major nutritional issues in the management of Parkinson's disease. *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*, 24(13), 1881–1892.
- Beach, T. G., Adler, C. H., Lue, L., Sue, L. I., Bachalakuri, J., Henry-Watson, J., Sasse, J., Boyer, S., Shirohi, S., Brooks, R., Eschbacher, J., White, C. L. 3rd, Akiyama, H., Caviness, J., Shill, H. A., Connor, D. J., Sabbagh, M. N., & Walker, D. G. (2009). Unified staging system for Lewy body disorders: correlation with nigrostriatal degeneration, cognitive impairment and motor dysfunction. *Acta Neuropathologica*, 117(6), 613–634.
- Beach, T. G., Adler, C. H., Sue, L. I., Peirce, J. B., Bachalakuri, J., Dalsing-Hernandez, J. E., Lue, L. F., Caviness, J. N., Connor, D. J., Sabbagh, M. N., & Walker, D. G. (2008). Reduced striatal tyrosine hydroxylase in incidental Lewy body disease. *Acta Neuropathologica*, 115(4), 445–451.
- Beach, T. G., Adler, C. H., Sue, L. I., Vedders, L., Lue, L., White Iii, C. L., Akiyama, H., Caviness, J. N., Shill, H. A., Sabbagh, M. N., & Walker, D. G. (2010). Multi-organ distribution of phosphorylated alpha-synuclein histopathology in subjects with Lewy body disorders. *Acta Neuropathologica*, 119(6), 689–702.
- Beccano-Kelly, D. A., Volta, M., Munsie, L. N., Paschall, S. A., Tatarnikov, I., Co, K., Chou, P., Cao, L.-P., Bergeron, S., Mitchell, E., Han, H., Melrose, H. L., Tapia, L., Raymond, L. A., Farrer, M. J., & Milnerwood, A. J. (2015). LRRK2 overexpression alters glutamatergic presynaptic plasticity, striatal dopamine tone, postsynaptic signal transduction, motor activity and memory. *Human Molecular Genetics*, 24(5), 1336–1349.
- Bengoa-Vergniory, N., Roberts, R. F., Wade-Martins, R., & Alegre-Abarrategui, J. (2017). Alpha-synuclein oligomers: a new hope. *Acta Neuropathologica*, 134(6), 819–838.
- Bennett, M. C. (2005). The role of alpha-synuclein in neurodegenerative diseases. *Pharmacology and Therapeutics*, 105(3), 311–331.
- Benskey, M. J., Sellnow, R. C., Sandoval, I. M., Sortwell, C. E., Lipton, J. W., & Manfredsson, F. P. (2018). Silencing Alpha Synuclein in Mature Nigral Neurons Results in Rapid Neuroinflammation and Subsequent Toxicity. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 11, 36.

- Benson, D. L., Matikainen-Ankney, B. A., Hussein, A., & Huntley, G. W. (2018). Functional and behavioral consequences of Parkinson's disease-associated LRRK2-G2019S mutation. *Biochemical Society Transactions*, 46(6), 1697–1705.
- Benson, M. D., Waddington-Cruz, M., Berk, J. L., Polydefkis, M., Dyck, P. J., Wang, A. K., Planté-Bordeneuve, V., Barroso, F. A., Merlini, G., Obici, L., Scheinberg, M., Brannagan, T. H. 3rd, Litchy, W. J., Whelan, C., Drachman, B. M., Adams, D., Heitner, S. B., Conceição, I., Schmidt, H. H., ... Coelho, T. (2018). Inotersen Treatment for Patients with Hereditary Transthyretin Amyloidosis. *The New England Journal of Medicine*, 379(1), 22–31.
- Betarbet, R., Sherer, T. B., MacKenzie, G., Garcia-Osuna, M., Panov, A. V., & Greenamyre, J. T. (2000). Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nature Neuroscience*, 3(12), 1301–1306.
- Beyer, P. L., Palarino, M. Y., Michalek, D., Busenbark, K., & Koller, W. C. (1995). Weight change and body composition in patients with Parkinson's disease. *Journal of the American Dietetic Association*, 95(9), 979–983.
- Bhatt, M. A., Messer, A., & Kordower, J. H. (2013). Can intrabodies serve as neuroprotective therapies for Parkinson's disease? Beginning thoughts. *Journal of Parkinson's Disease*, 3(4), 581–591.
- Biere, A. L., Wood, S. J., Wypych, J., Steavenson, S., Jiang, Y., Anafi, D., Jacobsen, F. W., Jarosinski, M. A., Wu, G. M., Louis, J. C., Martin, F., Narhi, L. O., & Citron, M. (2000). Parkinson's disease-associated alpha-synuclein is more fibrillogenic than beta- and gamma-synuclein and cannot cross-seed its homologs. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(44), 34574–34579.
- Bieri, G., Brahic, M., Bousset, L., Couthouis, J., Kramer, N. J., Ma, R., Nakayama, L., Monbureau, M., Defensor, E., Schule, B., Shamloo, M., Melki, R., & Gitler, A. D. (2019). LRRK2 modifies alpha-syn pathology and spread in mouse models and human neurons. *Acta Neuropathologica*, 137(6), 961–980.
- Bisaglia, M., Mammi, S., & Bubacco, L. (2007). Kinetic and structural analysis of the early oxidation products of dopamine: analysis of the interactions with alpha-synuclein. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(21), 15597–15605.
- Blanca Ramirez, M., Madero-Perez, J., Rivero-Rios, P., Martinez-Salvador, M., Lara Ordonez, A. J., Fernandez, B., Fdez, E., & Hilfiker, S. (2017). LRRK2 and Parkinson's Disease: From Lack of Structure to Gain of Function. *Current Protein & Peptide Science*, 18(7), 677–686.
- Blandini, F., Cilia, R., Cerri, S., Pezzoli, G., Schapira, A. H. V., Mullin, S., & Lanciego, J. L. (2019). Glucocerebrosidase mutations and synucleinopathies: Toward a model of precision medicine. *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*, 34(1), 9–21.
- Blesa, J., Phani, S., Jackson-Lewis, V., & Przedborski, S. (2012). Classic and new animal models of Parkinson's disease. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, 2012, 845618.
- Blesa, J., & Przedborski, S. (2014). Parkinson's disease: animal models and dopaminergic cell vulnerability. *Frontiers in Neuroanatomy*, 8, 155.
- Bloch, A., Probst, A., Bissig, H., Adams, H., & Tolnay, M. (2006). Alpha-synuclein pathology of the spinal and peripheral autonomic nervous system in neurologically unimpaired elderly subjects. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 32(3), 284–295.
- Blum, K., Chen, A. L.-C., Braverman, E. R., Comings, D. E., Chen, T. J. H., Arcuri, V., Blum, S. H., Downs, B. W., Waite, R. L., Notaro, A., Lubar, J., Williams, L., Prihoda, T. J., Palomo, T., & Oscar-Berman, M. (2008). Attention-deficit-hyperactivity disorder and reward deficiency syndrome. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 4(5), 893–918.
- Bonini, N. M., & Giasson, B. I. (2005). Snaring the function of alpha-synuclein. *Cell*, 123(3), 359–361.
- Boot, B. P. (2015). Comprehensive treatment of dementia with Lewy bodies. *Alzheimer's Research & Therapy*, 7(1), 45.
- Booth, H. D. E., Hirst, W. D., & Wade-Martins, R. (2017). The Role of Astrocyte Dysfunction in Parkinson's Disease Pathogenesis. *Trends in Neurosciences*, 40(6), 358–370.
- Borel, F., Gernoux, G., Cardozo, B., Metterville, J. P., Toro Cabrera, G. C., Song, L., Su, Q., Gao, G. P., Elmallah, M. K., Brown, R. H. J., & Mueller, C. (2016). Therapeutic rAAVrh10 Mediated SOD1 Silencing in Adult SOD1(G93A) Mice and Nonhuman Primates. *Human Gene Therapy*, 27(1), 19–31.
- Borghi, R., Marchese, R., Negro, A., Marinelli, L., Forloni, G., Zaccheo, D., Abbruzzese, G., & Tabaton, M. (2000). Full length alpha-synuclein is present in cerebrospinal fluid from Parkinson's disease and normal subjects. *Neuroscience Letters*, 287(1), 65–67.
- Bortolozzi, a, Castañé, a, Semakova, J., Santana, N., Alvarado, G., Cortés, R., Ferrés-Coy, a, Fernández, G., Carmona, M. C., Toth, M., Perales, J. C., Montefeltro, a, & Artigas, F. (2012). New antidepressant strategy based on acute siRNA silencing of 5-HT1A autoreceptors. *Molecular Psychiatry*, 17(6), 567–567.
- Bosboom, J. L. W., Stoffers, D., & Wolters, E. C. (2004). Cognitive dysfunction and dementia in Parkinson's disease. *Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria: 1996)*, 111(10–11), 1303–1315.
- Bourdenx, M., Nioche, A., Dovero, S., Arotcarena, M.-L., Camus, S., Porras, G., Thiolat, M.-L., Rougier, N. P., Prigent, A., Aubert, P., Bohic, S., Sandt, C., Laferrière, F., Doudnikoff, E., Kruse, N., Mollenhauer, B.,

- Novello, S., Morari, M., Leste-Lasserre, T., ... Bezdard, E. (2020). Identification of distinct pathological signatures induced by patient-derived α -synuclein structures in nonhuman primates. *Science Advances*, 6(20), eaaz9165.
- Boyer, F., & Dreyer, J.-L. (2007). Alpha-synuclein in the nucleus accumbens induces changes in cocaine behaviour in rats. *The European Journal of Neuroscience*, 26(10), 2764–2776.
- Boyer, F., & Dreyer, J.-L. L. (2008). The role of gamma-synuclein in cocaine-induced behaviour in rats. *The European Journal of Neuroscience*, 27(11), 2938–2951.
- Braak, H., Del Tredici, K., Rub, U., de Vos, R. A. I., Jansen Steur, E. N. H., & Braak, E. (2003). Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiology of Aging*, 24(2), 197–211.
- Braak, H., Rub, U., & Del Tredici, K. (2006). Cognitive decline correlates with neuropathological stage in Parkinson's disease. *Journal of the Neurological Sciences*, 248(1–2), 255–258.
- Braak, H., Sastre, M., & Del Tredici, K. (2007). Development of alpha-synuclein immunoreactive astrocytes in the forebrain parallels stages of intraneuronal pathology in sporadic Parkinson's disease. *Acta Neuropathologica*, 114(3), 231–241.
- Bradbury, J. (2003). Alpha-synuclein gene triplication discovered in Parkinson's disease. *The Lancet. Neurology*, 2(12), 715.
- Brahmachari, S., Karuppagounder, S. S., Ge, P., Lee, S., Dawson, V. L., Dawson, T. M., & Ko, H. S. (2017). c-Abl and Parkinson's Disease: Mechanisms and Therapeutic Potential. *Journal of Parkinson's Disease*, 7(4), 589–601.
- Brenz Verca, M. S., Bahi, A., Boyer, F., Wagner, G. C., & Dreyer, J.-L. (2003). Distribution of alpha- and gamma-synucleins in the adult rat brain and their modification by high-dose cocaine treatment. *The European Journal of Neuroscience*, 18(7), 1923–1938.
- Breydo, L., Wu, J. W., & Uversky, V. N. (2012). A-synuclein misfolding and Parkinson's disease. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1822(2), 261–285.
- Brichta, L., Shin, W., Jackson-Lewis, V., Blesa, J., Yap, E.-L., Walker, Z., Zhang, J., Roussarie, J.-P., Alvarez, M. J., Califano, A., Przedborski, S., & Greengard, P. (2015). Identification of neurodegenerative factors using translational-regulatory network analysis. *Nature Neuroscience*, 18(9), 1325–1333.
- Brooks, A. I., Chadwick, C. A., Gelbard, H. A., Cory-Slechta, D. A., & Federoff, H. J. (1999). Paraquat elicited neurobehavioral syndrome caused by dopaminergic neuron loss. *Brain Research*, 823(1–2), 1–10.
- Brown, J. W. P., Buell, A. K., Michaels, T. C. T., Meisl, G., Carozza, J., Flagmeier, P., Vendruscolo, M., Knowles, T. P. J., Dobson, C. M., & Galvagnion, C. (2016). beta-Synuclein suppresses both the initiation and amplification steps of alpha-synuclein aggregation via competitive binding to surfaces. *Scientific Reports*, 6, 36010.
- Bruening, W., Giasson, B. I., Klein-Szanto, A. J., Lee, V. M., Trojanowski, J. Q., & Godwin, A. K. (2000). Synucleins are expressed in the majority of breast and ovarian carcinomas and in preneoplastic lesions of the ovary. *Cancer*, 88(9), 2154–2163.
- Brundin, P., Li, J.-Y., Holton, J. L., Lindvall, O., & Revesz, T. (2008). Research in motion: the enigma of Parkinson's disease pathology spread. *Nature Reviews. Neuroscience*, 9(10), 741–745.
- Brys, M., Fanning, L., Hung, S., Ellenbogen, A., Penner, N., Yang, M., Welch, M., Koenig, E., David, E., Fox, T., Makh, S., Aldred, J., Goodman, I., Pepinsky, B., Liu, Y., Graham, D., Weihofen, A., & Cedarbaum, J. M. (2019). Randomized phase I clinical trial of anti- α -synuclein antibody BIIB054. *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*, 34(8), 1154–1163.
- Bucciantini, M., Giannoni, E., Chiti, F., Baroni, F., Formigli, L., Zurdo, J., Taddei, N., Ramponi, G., Dobson, C. M., & Stefani, M. (2002). Inherent toxicity of aggregates implies a common mechanism for protein misfolding diseases. *Nature*, 416(6880), 507–511.
- Buchman, V. L., Adu, J., Pinõn, L. G., Ninkina, N. N., & Davies, A. M. (1998b). Persyn, a member of the synuclein family, influences neurofilament network integrity. *Nature Neuroscience*, 1(2), 101–103.
- Buchman, V. L., Hunter, H. J. A., Pinon, L. G. P., Thompson, J., Privalova, E. M., Ninkina, N. N., & Davies, A. M. (1998a). Persyn, a Member of the Synuclein Family, Has a Distinct Pattern of Expression in the Developing Nervous System. *J. Neurosci.*, 18(22), 9335–9341.
- Buee-Scherrer, V., Buee, L., Leveugle, B., Perl, D. P., Vermersch, P., Hof, P. R., & Delacourte, A. (1997). Pathological tau proteins in postencephalitic parkinsonism: comparison with Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. *Annals of Neurology*, 42(3), 356–359.
- Burke, R. E., Dauer, W. T., & Vonsattel, J. P. G. (2008). A critical evaluation of the Braak staging scheme for Parkinson's disease. *Annals of neurology*, 64(5), 485–491.
- Burke, W. J., Li, S. W., Williams, E. A., Nonneman, R., & Zahm, D. S. (2003). 3,4-Dihydroxyphenylacetaldehyde is the toxic dopamine metabolite in vivo: implications for Parkinson's disease pathogenesis. *Brain Research*, 989(2), 205–213.

- Burre, J., Sharma, M., & Sudhof, T. C. (2014). alpha-Synuclein assembles into higher-order multimers upon membrane binding to promote SNARE complex formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(40), E4274-83.
- Burre, J., Sharma, M., & Sudhof, T. C. (2015). Definition of a molecular pathway mediating alpha-synuclein neurotoxicity. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 35(13), 5221-5232.
- Burre, J., Sharma, M., Tsetsenis, T., Buchman, V., Etherton, M. R., & Sudhof, T. C. (2010). Alpha-synuclein promotes SNARE-complex assembly in vivo and in vitro. *Science (New York, N.Y.)*, 329(5999), 1663-1667.
- Butler, B., Sambo, D., & Khoshbouei, H. (2017). Alpha-synuclein modulates dopamine neurotransmission. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 83-84, 41-49.

C

- Caballol, N., Marti, M. J., & Tolosa, E. (2007). Cognitive dysfunction and dementia in Parkinson disease. *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*, 22 Suppl 1, S358-66.
- Cabin, D. E., Shimazu, K., Murphy, D., Cole, N. B., Gottschalk, W., McIlwain, K. L., Orrison, B., Chen, A., Ellis, C. E., Paylor, R., Lu, B., & Nussbaum, R. L. (2002). Synaptic vesicle depletion correlates with attenuated synaptic responses to prolonged repetitive stimulation in mice lacking alpha-synuclein. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 22(20), 8797-8807.
- Calabresi, P., Castrioto, A., Di Filippo, M., & Picconi, B. (2013). New experimental and clinical links between the hippocampus and the dopaminergic system in Parkinson's disease. *The Lancet. Neurology*, 12(8), 811-821.
- Calabresi, P., Picconi, B., Tozzi, A., Ghiglieri, V., & Di Filippo, M. (2014). Direct and indirect pathways of basal ganglia: a critical reappraisal. *Nature Neuroscience*, 17(8), 1022-1030.
- Callaghan, R. C., Cunningham, J. K., Sajeev, G., & Kish, S. J. (2010). Incidence of Parkinson's disease among hospital patients with methamphetamine-use disorders. *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*, 25(14), 2333-2339.
- Cardo, L. F., Coto, E., Ribacoba, R., Mata, I. F., Moris, G., Menendez, M., & Alvarez, V. (2014). The screening of the 3'UTR sequence of LRRK2 identified an association between the rs66737902 polymorphism and Parkinson's disease. *Journal of Human Genetics*, 59(6), 346-348.
- Carthew, R. W., & Sontheimer, E. J. (2009). Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*, 136(4), 642-655.
- Cascella, R., Perni, M., Chen, S. W., Fusco, G., Cecchi, C., Vendruscolo, M., Chiti, F., Dobson, C. M., & De Simone, A. (2019). Probing the Origin of the Toxicity of Oligomeric Aggregates of alpha-Synuclein with Antibodies. *ACS Chemical Biology*, 14(6), 1352-1362.
- Casey, G. (2013). Parkinson's disease: a long and difficult journey. *Nursing New Zealand (Wellington, N.Z.): 1995*, 19(7), 20-24.
- Castagnet, P. I., Golovko, M. Y., Barcelo-Coblijn, G. C., Nussbaum, R. L., & Murphy, E. J. (2005). Fatty acid incorporation is decreased in astrocytes cultured from alpha-synuclein gene-ablated mice. *Journal of Neurochemistry*, 94(3), 839-849.
- Cavallarin, N., Vicario, M., & Negro, A. (2010). The role of phosphorylation in synucleinopathies: focus on Parkinson's disease. *CNS & Neurological Disorders Drug Targets*, 9(4), 471-481.
- Chadchankar, H., Ihalaainen, J., Tanila, H., & Yavich, L. (2011). Decreased reuptake of dopamine in the dorsal striatum in the absence of alpha-synuclein. *Brain Research*, 1382, 37-44.
- Chandra, S., Chen, X., Rizo, J., Jahn, R., & Sudhof, T. C. (2003). A broken alpha-helix in folded alpha-Synuclein. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(17), 15313-15318.
- Chandra, S., Fornai, F., Kwon, H.-B., Yazdani, U., Atasoy, D., Liu, X., Hammer, R. E., Battaglia, G., German, D. C., Castillo, P. E., & Sudhof, T. C. (2004). Double-knockout mice for alpha- and beta-synucleins: effect on synaptic functions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(41), 14966-14971.
- Chandra, S., Gallardo, G., Fernandez-Chacon, R., Schluter, O. M., & Sudhof, T. C. (2005). Alpha-synuclein cooperates with CSPalpha in preventing neurodegeneration. *Cell*, 123(3), 383-396.
- Chartier-Harlin, M.-C., Kachergus, J., Roumier, C., Mouroux, V., Douay, X., Lincoln, S., Levecque, C., Larvor, L., Andrieux, J., Hulihan, M., Waucquier, N., Defebvre, L., Amouyel, P., Farrer, M., & Destee, A. (2004). Alpha-synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease. *Lancet (London, England)*, 364(9440), 1167-1169.
- Chen, H., Huang, X., Guo, X., Mailman, R. B., Park, Y., Kamel, F., Umbach, D. M., Xu, Q., Hollenbeck, A., Schatzkin, A., & Blair, A. (2010). Smoking duration, intensity, and risk of Parkinson disease. *Neurology*, 74(11), 878-884.

- Chen, H., Zhang, S. M., Hernan, M. A., Schwarzschild, M. A., Willett, W. C., Colditz, G. A., Speizer, F. E., & Ascherio, A. (2003). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and the risk of Parkinson disease. *Archives of Neurology*, 60(8), 1059–1064.
- Chen, M.-K., Kuwabara, H., Zhou, Y., Adams, R. J., Brasic, J. R., McGlothan, J. L., Verina, T., Burton, N. C., Alexander, M., Kumar, A., Wong, D. F., & Guilarte, T. R. (2008). VMAT2 and dopamine neuron loss in a primate model of Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry*, 105(1), 78–90.
- Chen, M.-L., & Wu, R.-M. (2018). LRRK2 gene mutations in the pathophysiology of the ROCO domain and therapeutic targets for Parkinson's disease: a review. *Journal of Biomedical Science*, 25(1), 52.
- Chen, X., de Silva, H. A., Pettenati, M. J., Rao, P. N., St George-Hyslop, P., Roses, A. D., Xia, Y., Horsburgh, K., Ueda, K., & Saitoh, T. (1995). The human NACP/alpha-synuclein gene: chromosome assignment to 4q21.3-q22 and TaqI RFLP analysis. *Genomics*, 26(2), 425–427.
- Cheng, H.-C., Ulane, C. M., & Burke, R. E. (2010). Clinical progression in Parkinson disease and the neurobiology of axons. *Annals of Neurology*, 67(6), 715–725.
- Cheng, S.-T. (2017). Dementia Caregiver Burden: a Research Update and Critical Analysis. *Current Psychiatry Reports*, 19(9), 64.
- Choi, W., Zibae, S., Jakes, R., Serpell, L. C., Davletov, B., Crowther, R. A., & Goedert, M. (2004). Mutation E46K increases phospholipid binding and assembly into filaments of human alpha-synuclein. *FEBS Letters*, 576(3), 363–368.
- Christopher, L., Marras, C., Duff-Canning, S., Koshimori, Y., Chen, R., Boileau, I., Segura, B., Monchi, O., Lang, A. E., Rusjan, P., Houle, S., & Strafella, A. P. (2014). Combined insular and striatal dopamine dysfunction are associated with executive deficits in Parkinson's disease with mild cognitive impairment. *Brain: A Journal of Neurology*, 137(Pt 2), 565–575.
- Chu, Y., & Kordower, J. H. (2007). Age-associated increases of alpha-synuclein in monkeys and humans are associated with nigrostriatal dopamine depletion: Is this the target for Parkinson's disease? *Neurobiology of Disease*, 25(1), 134–149.
- Chung, C. Y., Seo, H., Sonntag, K. C., Brooks, A., Lin, L., & Isacson, O. (2005). Cell type-specific gene expression of midbrain dopaminergic neurons reveals molecules involved in their vulnerability and protection. *Human Molecular Genetics*, 14(13), 1709–1725.
- Chuquilin-Arista, F., Alvarez-Avellon, T., & Menendez-Gonzalez, M. (2019). Prevalence of Depression and Anxiety in Parkinson Disease and Impact on Quality of Life: A Community-Based Study in Spain. *Journal of Geriatric Psychiatry and Neurology*, 891988719874130.
- Clayton, D. F., & George, J. M. (1998). The synucleins: a family of proteins involved in synaptic function, plasticity, neurodegeneration and disease. *Trends in Neurosciences*, 21(6), 249–254.
- Clough, R. L., & Stefanis, L. (2007). A novel pathway for transcriptional regulation of alpha-synuclein. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 21(2), 596–607.
- Cohen, A. D., Tillerson, J. L., Smith, A. D., Schallert, T., & Zigmond, M. J. (2003). Neuroprotective effects of prior limb use in 6-hydroxydopamine-treated rats: possible role of GDNF. *Journal of Neurochemistry*, 85(2), 299–305.
- Colla, E. (2019). Linking the Endoplasmic Reticulum to Parkinson's Disease and Alpha-Synucleinopathy. *Frontiers in Neuroscience*, 13, 560.
- Collier, T. J., Redmond, D. E. J., Steece-Collier, K., Lipton, J. W., & Manfredsson, F. P. (2016). Is Alpha-Synuclein Loss-of-Function a Contributor to Parkinsonian Pathology? Evidence from Non-human Primates. *Frontiers in Neuroscience*, 10, 12.
- Conn, K.-A., Burne, T.H., & Kesby, J.P. (2020). Subcortical Dopamine and Cognition in Schizophrenia: Looking Beyond Psychosis in Preclinical Models. *Frontiers in Neuroscience*, 14, 542.
- Connolly, B. S., & Lang, A. E. (2014). Pharmacological treatment of Parkinson disease: a review. *JAMA*, 311(16), 1670–1683.
- Connor-Robson, N., Peters, O. M., Millership, S., Ninkina, N., & Buchman, V. L. (2016). Combinational losses of synucleins reveal their differential requirements for compensating age-dependent alterations in motor behavior and dopamine metabolism. *Neurobiology of Aging*, 46, 107–112.
- Connors, M. H., Quinto, L., McKeith, I., Brodaty, H., Allan, L., Bamford, C., Thomas, A., Taylor, J.-P., & O'Brien, J. T. (2018). Non-pharmacological interventions for Lewy body dementia: a systematic review. *Psychological Medicine*, 48(11), 1749–1758.
- Conway, K. A., Harper, J. D., & Lansbury, P. T. (1998). Accelerated in vitro fibril formation by a mutant alpha-synuclein linked to early-onset Parkinson disease. *Nature Medicine*, 4(11), 1318–1320.
- Conway, K. A., Harper, J. D., & Lansbury, P. T. J. (2000a). Fibrils formed in vitro from alpha-synuclein and two mutant forms linked to Parkinson's disease are typical amyloid. *Biochemistry*, 39(10), 2552–2563.
- Conway, K. A., Lee, S. J., Rochet, J. C., Ding, T. T., Williamson, R. E., & Lansbury, P. T. J. (2000b). Acceleration of oligomerization, not fibrillization, is a shared property of both alpha-synuclein mutations linked to early-

- onset Parkinson's disease: implications for pathogenesis and therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(2), 571–576.
- Conway, K. A., Rochet, J. C., Bieganski, R. M., & Lansbury, P. T. J. (2001). Kinetic stabilization of the alpha-synuclein protofibril by a dopamine-alpha-synuclein adduct. *Science (New York, N.Y.)*, 294(5545), 1346–1349.
- Cookson, M. R. (2009). alpha-Synuclein and neuronal cell death. *Molecular Neurodegeneration*, 4, 9.
- Cookson, M. R., & van der Brug, M. (2008). Cell systems and the toxic mechanism(s) of alpha-synuclein. *Experimental Neurology*, 209(1), 5–11.
- Cooper, A. A., Gitler, A. D., Cashikar, A., Haynes, C. M., Hill, K. J., Bhullar, B., Liu, K., Xu, K., Strathearn, K. E., Liu, F., Cao, S., Caldwell, K. A., Caldwell, G. A., Marsischky, G., Kolodner, R. D., Labaer, J., Rochet, J.-C., Bonini, N. M., & Lindquist, S. (2006). Alpha-synuclein blocks ER-Golgi traffic and Rab1 rescues neuron loss in Parkinson's models. *Science (New York, N.Y.)*, 313(5785), 324–328.
- Costa, C., Sgobio, C., Siliquini, S., Tozzi, A., Tantucci, M., Ghiglieri, V., Di Filippo, M., Pendolino, V., de Iure, A., Marti, M., Morari, M., Spillantini, M. G., Latagliata, E. C., Pascucci, T., Puglisi-Allegra, S., Gardoni, F., Di Luca, M., Picconi, B., & Calabresi, P. (2012). Mechanisms underlying the impairment of hippocampal long-term potentiation and memory in experimental Parkinson's disease. *Brain: A Journal of Neurology*, 135(Pt 6), 1884–1899.
- Costa, J., Lunet, N., Santos, C., Santos, J., & Vaz-Carneiro, A. (2010). Caffeine exposure and the risk of Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Journal of Alzheimer's Disease: JAD*, 20 Suppl 1, S221–38.
- Cragg, S. J., Baufreton, J., Xue, Y., Bolam, J. P., & Bevan, M. D. (2004). Synaptic release of dopamine in the subthalamic nucleus. *The European Journal of Neuroscience*, 20(7), 1788–1802.
- Cremades, N., Cohen, S. I. A., Deas, E., Abramov, A. Y., Chen, A. Y., Orte, A., Sandal, M., Clarke, R. W., Dunne, P., Aprile, F. A., Bertocini, C. W., Wood, N. W., Knowles, T. P. J., Dobson, C. M., & Klenerman, D. (2012). Direct observation of the interconversion of normal and toxic forms of alpha-synuclein. *Cell*, 149(5), 1048–1059.
- Crooke, S. T. (2017). Molecular Mechanisms of Antisense Oligonucleotides. *Nucleic Acid Therapeutics*, 27(2), 70–77.
- Cuervo, A. M., Stefanis, L., Fredenburg, R., Lansbury, P. T., & Sulzer, D. (2004). Impaired degradation of mutant alpha-synuclein by chaperone-mediated autophagy. *Science (New York, N.Y.)*, 305(5688), 1292–1295.
- Cummings, J. L., & Masterman, D. L. (1999). Depression in patients with Parkinson's disease. *International Journal of Geriatric Psychiatry*, 14(9), 711–718.
- Cunha, M. P., Pazini, F. L., Lieberknecht, V., Budni, J., Oliveira, A., Rosa, J. M., Mancini, G., Mazzardo, L., Colla, A. R., Leite, M. C., Santos, A. R. S., Martins, D. F., de Bem, A. F., Goncalves, C. A. S., Farina, M., & Rodrigues, A. L. S. (2017). MPP(+)-Lesioned Mice: an Experimental Model of Motor, Emotional, Memory/Learning, and Striatal Neurochemical Dysfunctions. *Molecular Neurobiology*, 54(8), 6356–6377.
- Curtin, K., Fleckenstein, A. E., Robison, R. J., Crookston, M. J., Smith, K. R., & Hanson, G. R. (2015). Methamphetamine/amphetamine abuse and risk of Parkinson's disease in Utah: a population-based assessment. *Drug and Alcohol Dependence*, 146, 30–38.

D

- da Costa, C. A., Ancolio, K., & Checler, F. (2000). Wild-type but not Parkinson's disease-related ala-53 --> Thr mutant alpha -synuclein protects neuronal cells from apoptotic stimuli. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(31), 24065–24069.
- Damdindorj, L., Karnan, S., Ota, A., Hossain, E., Konishi, Y., Hosokawa, Y., & Konishi, H. (2014). A comparative analysis of constitutive promoters located in adeno-associated viral vectors. *PloS One*, 9(8), e106472.
- Damier, P. (1999). New aspects in the pathophysiology of dyskinesia. *Salpetriere Deep Brain Stimulation Group. Advances in Neurology*, 80, 611–617.
- Dana, H., Chalbatani, G. M., Mahmoodzadeh, H., Karimloo, R., Rezaiean, O., Moradzadeh, A., Mehmandoost, N., Moazzen, F., Mazraeh, A., Marmari, V., Ebrahimi, M., Rashno, M. M., Abadi, S. J., & Gharagouzlo, E. (2017). Molecular Mechanisms and Biological Functions of siRNA. *International Journal of Biomedical Science: IJBS*, 13(2), 48–57.
- Danzer, K. M., Kranich, L. R., Ruf, W. P., Cagsal-Getkin, O., Winslow, A. R., Zhu, L., Vanderburg, C. R., & McLean, P. J. (2012). Exosomal cell-to-cell transmission of alpha synuclein oligomers. *Molecular Neurodegeneration*, 7, 42.
- Danzer, K. M., Krebs, S. K., Wolff, M., Birk, G., & Hengerer, B. (2009). Seeding induced by alpha-synuclein oligomers provides evidence for spreading of alpha-synuclein pathology. *Journal of Neurochemistry*, 111(1), 192–203.

- Davidson, T. J., Harel, S., Arboleda, V. A., Prunell, G. F., Shelanski, M. L., Greene, L. A., & Troy, C. M. (2004). Highly efficient small interfering RNA delivery to primary mammalian neurons induces MicroRNA-like effects before mRNA degradation. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 24(45), 10040–10046.
- Davidson, W. S., Jonas, A., Clayton, D. F., & George, J. M. (1998). Stabilization of alpha-synuclein secondary structure upon binding to synthetic membranes. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(16), 9443–9449.
- Davie, C. A. (2008). A review of Parkinson's disease. *British Medical Bulletin*, 86, 109–127.
- Davis, G. C., Williams, A. C., Markey, S. P., Ebert, M. H., Caine, E. D., Reichert, C. M., & Kopin, I. J. (1979). Chronic Parkinsonism secondary to intravenous injection of meperidine analogues. *Psychiatry Research*, 1(3), 249–254.
- Daya, S., & Berns, K. I. (2008). Gene therapy using adeno-associated virus vectors. *Clinical Microbiology Reviews*, 21(4), 583–593.
- de Lau, L. M. L., & Breteler, M. M. B. (2006). Epidemiology of Parkinson's disease. *The Lancet. Neurology*, 5(6), 525–535.
- Decressac, M., Mattsson, B., Lundblad, M., Weikop, P., & Bjorklund, A. (2012). Progressive neurodegenerative and behavioural changes induced by AAV-mediated overexpression of alpha-synuclein in midbrain dopamine neurons. *Neurobiology of Disease*, 45(3), 939–953.
- Decressac, M., Mattsson, B., Weikop, P., Lundblad, M., Jakobsson, J., & Björklund, A. (2013). TFEB-mediated autophagy rescues midbrain dopamine neurons from α -synuclein toxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(19), E1817-26.
- Dereli, E. E., & Yaliman, A. (2010). Comparison of the effects of a physiotherapist-supervised exercise programme and a self-supervised exercise programme on quality of life in patients with Parkinson's disease. *Clinical Rehabilitation*, 24(4), 352–362.
- Desplats, P., Lee, H.-J., Bae, E.-J., Patrick, C., Rockenstein, E., Crews, L., Spencer, B., Masliah, E., & Lee, S.-J. (2009). Inclusion formation and neuronal cell death through neuron-to-neuron transmission of alpha-synuclein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(31), 13010–13015.
- Devoto, P., Flore, G., Pani, L., & Gessa, G. L. (2001). Evidence for co-release of noradrenaline and dopamine from noradrenergic neurons in the cerebral cortex. *Molecular Psychiatry*, 6(6), 657–664.
- Devoto, P., Flore, G., Saba, P., Fa, M., & Gessa, G. L. (2005). Co-release of noradrenaline and dopamine in the cerebral cortex elicited by single train and repeated train stimulation of the locus coeruleus. *BMC Neuroscience*, 6, 31.
- Di Fonzo, A., Rohe, C. F., Ferreira, J., Chien, H. F., Vacca, L., Stocchi, F., Guedes, L., Fabrizio, E., Manfredi, M., Vanacore, N., Goldwurm, S., Breedveld, G., Sampaio, C., Meco, G., Barbosa, E., Oostra, B. A., & Bonifati, V. (2005). A frequent LRRK2 gene mutation associated with autosomal dominant Parkinson's disease. *Lancet (London, England)*, 365(9457), 412–415.
- Di Rosa, G., Puzzo, D., Sant'Angelo, A., Trinchese, F., & Arancio, O. (2003). Alpha-synuclein: between synaptic function and dysfunction. *Histology and Histopathology*, 18(4), 1257–1266.
- Dick, F. D., De Palma, G., Ahmadi, A., Scott, N. W., Prescott, G. J., Bennett, J., Semple, S., Dick, S., Counsell, C., Mozzoni, P., Haites, N., Wettinger, S. B., Mutti, A., Otelea, M., Seaton, A., Soderkvist, P., & Felice, A. (2007). Environmental risk factors for Parkinson's disease and parkinsonism: the Geoparkinson study. *Occupational and Environmental Medicine*, 64(10), 666–672.
- Dickson, D. W., Fujishiro, H., DelleDonne, A., Menke, J., Ahmed, Z., Klos, K. J., Josephs, K. A., Frigerio, R., Burnett, M., Parisi, J. E., & Ahlskog, J. E. (2008). Evidence that incidental Lewy body disease is pre-symptomatic Parkinson's disease. *Acta Neuropathologica*, 115(4), 437–444.
- Dickson, D. W., Fujishiro, H., Orr, C., DelleDonne, A., Josephs, K. A., Frigerio, R., Burnett, M., Parisi, J. E., Klos, K. J., & Ahlskog, J. E. (2009). Neuropathology of non-motor features of Parkinson disease. *Parkinsonism & Related Disorders*, 15 Suppl 3, S1-5.
- Diederich, N. J., Fénelon, G., Stebbins, G., & Goetz, C. G. (2009). Hallucinations in Parkinson disease. *Nature Reviews. Neurology*, 5(6), 331–342.
- Ding, H., Huang, Z., Chen, M., Wang, C., Chen, X., Chen, J., & Zhang, J. (2016). Identification of a panel of five serum miRNAs as a biomarker for Parkinson's disease. *Parkinsonism & Related Disorders*, 22, 68–73.
- Dinis-Oliveira, R. J., Remiao, F., Carmo, H., Duarte, J. A., Navarro, A. S., Bastos, M. L., & Carvalho, F. (2006). Paraquat exposure as an etiological factor of Parkinson's disease. *Neurotoxicology*, 27(6), 1110–1122.
- Doder, M., Rabiner, E. A., Turjanski, N., Lees, A. J., & Brooks, D. J. (2003). Tremor in Parkinson's disease and serotonergic dysfunction: an 11C-WAY 100635 PET study. *Neurology*, 60(4), 601–605.
- Doherty, G. J., & McMahon, H. T. (2009). Mechanisms of endocytosis. *Annual Review of Biochemistry*, 78, 857–902.
- Domingo, A., & Klein, C. (2018). Genetics of Parkinson disease. *Handbook of Clinical Neurology*, 147, 211–227.

- Dopeso-Reyes, I. G., Rico, A. J., Roda, E., Sierra, S., Pignataro, D., Lanz, M., Sucunza, D., Chang-Azancot, L., & Lanciego, J. L. (2014). Calbindin content and differential vulnerability of midbrain efferent dopaminergic neurons in macaques. *Frontiers in Neuroanatomy*, 8, 146.
- Doty, R. L. (2012). Olfaction in Parkinson's disease and related disorders. *Neurobiology of Disease*, 46(3), 527–552.
- Dragicevic, E., Schiemann, J., & Liss, B. (2015). Dopamine midbrain neurons in health and Parkinson's disease: emerging roles of voltage-gated calcium channels and ATP-sensitive potassium channels. *Neuroscience*, 284, 798–814.
- Du, H., Deng, W., Aimone, J. B., Ge, M., Parylak, S., Walch, K., Zhang, W., Cook, J., Song, H., Wang, L., Gage, F. H., & Mu, Y. (2016). Dopaminergic inputs in the dentate gyrus direct the choice of memory encoding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(37), E5501–10.
- Duda, J. E., Shah, U., Arnold, S. E., Lee, V. M., & Trojanowski, J. Q. (1999). The expression of alpha-, beta-, and gamma-synucleins in olfactory mucosa from patients with and without neurodegenerative diseases. *Experimental Neurology*, 160(2), 515–522.
- Durante, P., Cardenas, C. G., Whittaker, J. A., Kitai, S. T., & Scroggs, R. S. (2004). Low-threshold L-type calcium channels in rat dopamine neurons. *Journal of Neurophysiology*, 91(3), 1450–1454.
- Duvarci, S., Simpson, E. H., Schneider, G., Kandel, E. R., Roeper, J., & Sigurdsson, T. (2018). Impaired recruitment of dopamine neurons during working memory in mice with striatal D2 receptor overexpression. *Nature Communications*, 9(1), 2822.

E

- Eiden, L. E., & Weihe, E. (2011). VMAT2: a dynamic regulator of brain monoaminergic neuronal function interacting with drugs of abuse. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1216, 86–98.
- El-Agnaf, O. M. A., Paleologou, K. E., Greer, B., Abogreïn, A. M., King, J. E., Salem, S. A., Fullwood, N. J., Benson, F. E., Hewitt, R., Ford, K. J., Martin, F. L., Harriott, P., Cookson, M. R., & Allsop, D. (2004). A strategy for designing inhibitors of alpha-synuclein aggregation and toxicity as a novel treatment for Parkinson's disease and related disorders. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 18(11), 1315–1317.
- El-Agnaf, O. M. A., Salem, S. A., Paleologou, K. E., Cooper, L. J., Fullwood, N. J., Gibson, M. J., Curran, M. D., Court, J. A., Mann, D. M. A., Ikeda, S., Cookson, M. R., Hardy, J., & Allsop, D. (2003). Alpha-synuclein implicated in Parkinson's disease is present in extracellular biological fluids, including human plasma. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 17(13), 1945–1947.
- Elbaz, A., & Moisan, F. (2008). Update in the epidemiology of Parkinson's disease. *Current Opinion in Neurology*, 21(4), 454–460.
- Elbers, R. G., Verhoef, J., van Wegen, E. E., Berendse, H. W., & Kwakkel, G. (2015). Interventions for fatigue in Parkinson's disease. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, 10, CD010925.
- Eliezer, D., Kutluay, E., Bussell, R. J., & Browne, G. (2001). Conformational properties of alpha-synuclein in its free and lipid-associated states. *Journal of Molecular Biology*, 307(4), 1061–1073.
- Ellis, C. E., Schwartzberg, P. L., Grider, T. L., Fink, D. W., & Nussbaum, R. L. (2001). alpha-synuclein is phosphorylated by members of the Src family of protein-tyrosine kinases. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(6), 3879–3884.
- Ellis, C. E., Murphy, E. J., Mitchell, D. C., Golovko, M. Y., Scaglia, F., Barcelo-Coblijn, G. C., & Nussbaum, R. L. (2005). Mitochondrial lipid abnormality and electron transport chain impairment in mice lacking alpha-synuclein. *Molecular and Cellular Biology*, 25(22), 10190–10201.
- Emadi, S., Barkhordarian, H., Wang, M. S., Schulz, P., & Sierks, M. R. (2007). Isolation of a human single chain antibody fragment against oligomeric alpha-synuclein that inhibits aggregation and prevents alpha-synuclein-induced toxicity. *Journal of Molecular Biology*, 368(4), 1132–1144.
- Emanuele, M., & Chieriegatti, E. (2015). Mechanisms of alpha-synuclein action on neurotransmission: cell-autonomous and non-cell autonomous role. *Biomolecules*, 5(2), 865–892.
- Evers, M. M., Toonen, L. J. A., & van Roon-Mom, W. M. C. (2015). Antisense oligonucleotides in therapy for neurodegenerative disorders. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 87, 90–103.

F

- Fanciulli, A., & Wenning, G. K. (2015). Multiple-system atrophy. *The New England Journal of Medicine*, 372(3), 249–263.
- Fares, M.-B., Ait-Bouziad, N., Dikiy, I., Mbefo, M. K., Jovicic, A., Kiely, A., Holton, J. L., Lee, S.-J., Gitler, A. D., Eliezer, D., & Lashuel, H. A. (2014). The novel Parkinson's disease linked mutation G51D attenuates in vitro aggregation and membrane binding of alpha-synuclein, and enhances its secretion and nuclear localization in cells. *Human Molecular Genetics*, 23(17), 4491–4509.
- Farrell, K. F., Krishnamachari, S., Villanueva, E., Lou, H., Alerte, T. N. M., Peet, E., Drolet, R. E., & Perez, R. G. (2014). Non-motor parkinsonian pathology in aging A53T alpha-synuclein mice is associated with progressive synucleinopathy and altered enzymatic function. *Journal of Neurochemistry*, 128(4), 536–546.
- Farrer, M., Kachergus, J., Forno, L., Lincoln, S., Wang, D.-S., Hulihan, M., Maraganore, D., Gwinn-Hardy, K., Wszolek, Z., Dickson, D., & Langston, J. W. (2004). Comparison of kindreds with parkinsonism and alpha-synuclein genomic multiplications. *Annals of Neurology*, 55(2), 174–179.
- Feng, Y., Jankovic, J., & Wu, Y.-C. (2015). Epigenetic mechanisms in Parkinson's disease. *Journal of the Neurological Sciences*, 349(1–2), 3–9.
- Ferrari, N., Bergeron, D., Tedeschi, A.-L., Mangos, M. M., Paquet, L., Renzi, P. M., & Damha, M. J. (2006). Characterization of antisense oligonucleotides comprising 2'-deoxy-2'-fluoro-beta-D-arabinonucleic acid (FANA): specificity, potency, and duration of activity. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1082, 91–102.
- Ferrell, B., Connor, S. R., Cordes, A., Dahlin, C. M., Fine, P. G., Hutton, N., Leenay, M., Lentz, J., Person, J. L., Meier, D. E., & Zuroski, K. (2007). The national agenda for quality palliative care: the National Consensus Project and the National Quality Forum. *Journal of Pain and Symptom Management*, 33(6), 737–744.
- Ferres-Coy, A., Galofre, M., Pilar-Cuellar, F., Vidal, R., Paz, V., Ruiz-Bronchal, E., Campa, L., Pazos, A., Caso, J. R., Leza, J. C., Alvarado, G., Montefeltro, A., Valdizan, E. M., Artigas, F., & Bortolozzi, A. (2016). Therapeutic antidepressant potential of a conjugated siRNA silencing the serotonin transporter after intranasal administration. *Molecular Psychiatry*, 21(3), 328–338.
- Ferres-Coy, A., Pilar-Cuellar, F., Vidal, R., Paz, V., Masana, M., Cortes, R., Carmona, M. C., Campa, L., Pazos, A., Montefeltro, A., Valdizan, E. M., Artigas, F., & Bortolozzi, A. (2013). RNAi-mediated serotonin transporter suppression rapidly increases serotonergic neurotransmission and hippocampal neurogenesis. *Translational Psychiatry*, 3, e211.
- Ferrés-Coy, A., Santana, N., Castañé, A., Cortés, R., Carmona, M. C., Toth, M., Montefeltro, A., Artigas, F., & Bortolozzi, A. (2013). Acute 5-HT_{1A} autoreceptor knockdown increases antidepressant responses and serotonin release in stressful conditions. *Psychopharmacology*, 225(1), 61–74.
- Findley, L. J. (2007). The economic impact of Parkinson's disease. *Parkinsonism & Related Disorders*, 13 Suppl, S8–S12.
- Fink, A. L. (2006). The aggregation and fibrillation of alpha-synuclein. *Accounts of Chemical Research*, 39(9), 628–634.
- Foltynie, T., & Langston, J. W. (2018). Therapies to Slow, Stop, or Reverse Parkinson's Disease. *Journal of Parkinson's Disease*, 8(s1), S115–S121.
- Forno, L. S. (1996). Neuropathology of Parkinson's disease. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 55(3), 259–272.
- Franklin, K. & Paxinos, G. (2008). *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates, Compact* (3rd ed.). Academic Press.
- Friedman, J. H. (2010). Parkinson's disease psychosis 2010: a review article. *Parkinsonism & Related Disorders*, 16(9), 553–560.
- Frigerio, R., Sanft, K. R., Grossardt, B. R., Peterson, B. J., Elbaz, A., Bower, J. H., Ahlskog, J. E., de Andrade, M., Maraganore, D. M., & Rocca, W. A. (2006). Chemical exposures and Parkinson's disease: a population-based case-control study. *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*, 21(10), 1688–1692.
- Fujiwara, H., Hasegawa, M., Dohmae, N., Kawashima, A., Masliah, E., Goldberg, M. S., Shen, J., Takio, K., & Iwatsubo, T. (2002). alpha-Synuclein is phosphorylated in synucleinopathy lesions. *Nature Cell Biology*, 4(2), 160–164.
- Fullana, M. N., Ruiz-Bronchal, E., Ferres-Coy, A., Juarez-Escoto, E., Artigas, F., & Bortolozzi, A. (2019). Regionally selective knockdown of astroglial glutamate transporters in infralimbic cortex induces a depressive phenotype in mice. *Glia*, 67(6), 1122–1137.
- Fung, K.-M., Rorke, L. B., Giasson, B., Lee, V. M.-Y., & Trojanowski, J. Q. (2003). Expression of alpha-, beta-, and gamma-synuclein in glial tumors and medulloblastomas. *Acta Neuropathologica*, 106(2), 167–175.
- Furukawa, K., Matsuzaki-Kobayashi, M., Hasegawa, T., Kikuchi, A., Sugeno, N., Itoyama, Y., Wang, Y., Yao, P. J., Bushlin, I., & Takeda, A. (2006). Plasma membrane ion permeability induced by mutant alpha-synuclein contributes to the degeneration of neural cells. *Journal of Neurochemistry*, 97(4), 1071–1077.

G

- Gagne, J. J., & Power, M. C. (2010). Anti-inflammatory drugs and risk of Parkinson disease: a meta-analysis. *Neurology*, 74(12), 995–1002.
- Galvin, J. E., Giasson, B., Hurtig, H. I., Lee, V. M., & Trojanowski, J. Q. (2000). Neurodegeneration with brain iron accumulation, type 1 is characterized by alpha-, beta-, and gamma-synuclein neuropathology. *The American Journal of Pathology*, 157(2), 361–368.
- Galvin, J. E., Lee, V. M., & Trojanowski, J. Q. (2001b). Synucleinopathies: clinical and pathological implications. *Archives of Neurology*, 58(2), 186–190.
- Galvin, J. E., Schuck, T. M., Lee, V. M., & Trojanowski, J. Q. (2001a). Differential expression and distribution of alpha-, beta-, and gamma-synuclein in the developing human substantia nigra. *Experimental Neurology*, 168(2), 347–355.
- Galvin, J. E., Uryu, K., Lee, V. M.-Y., & Trojanowski, J. Q. (1999). Axon pathology in Parkinson's disease and Lewy body dementia hippocampus contains alpha -, beta -, and gamma -synuclein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(23), 13450–13455.
- Games, D., Seubert, P., Rockenstein, E., Patrick, C., Trejo, M., Ubhi, K., Ettle, B., Ghassemiam, M., Barbour, R., Schenk, D., Nuber, S., & Masliah, E. (2013). Axonopathy in an α -synuclein transgenic model of Lewy body disease is associated with extensive accumulation of C-terminal-truncated α -synuclein. *The American Journal of Pathology*, 182(3), 940–953.
- Gao, X., Simon, K. C., Han, J., Schwarzschild, M. A., & Ascherio, A. (2009). Family history of melanoma and Parkinson disease risk. *Neurology*, 73(16), 1286–1291.
- Gao, X., Chen, H., Choi, H. K., Curhan, G., Schwarzschild, M. A., & Ascherio, A. (2008). Diet, urate, and Parkinson's disease risk in men. *American Journal of Epidemiology*, 167(7), 831–838.
- Garcia-Ptacek, S., & Kramberger, M. G. (2016). Parkinson Disease and Dementia. *Journal of Geriatric Psychiatry and Neurology*, 29(5), 261–270.
- Gegg, M. E., Sweet, L., Wang, B. H., Shihabuddin, L. S., Sardi, S. P., & Schapira, A. H. V. (2015). No evidence for substrate accumulation in Parkinson brains with GBA mutations. *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*, 30(8), 1085–1089.
- George, J. M. (2002). The synucleins. *Genome Biology*, 3(1), REVIEWS3002.
- George, J. M., Jin, H., Woods, W. S., & Clayton, D. F. (1995). Characterization of a novel protein regulated during the critical period for song learning in the zebra finch. *Neuron*, 15(2), 361–372.
- Gesi, M., Soldani, P., Giorgi, F. S., Santinami, A., Bonaccorsi, I., & Fornai, F. (2000). The role of the locus coeruleus in the development of Parkinson's disease. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 24(6), 655–668.
- Ghiglieri, V., Calabrese, V., & Calabresi, P. (2018). Alpha-Synuclein: From Early Synaptic Dysfunction to Neurodegeneration. *Frontiers in Neurology*, 9, 295.
- Ghoche, R. (2012). The conceptual framework of palliative care applied to advanced Parkinson's disease. *Parkinsonism & Related Disorders*, 18 Suppl 3, S2-5.
- Ghosh, A., Tyson, T., George, S., Hildebrandt, E. N., Steiner, J. A., Madaj, Z., Schulz, E., Machiela, E., McDonald, W. G., Escobar Galvis, M. L., Kordower, J. H., Van Raamsdonk, J. M., Colca, J. R., & Brundin, P. (2016). Mitochondrial pyruvate carrier regulates autophagy, inflammation, and neurodegeneration in experimental models of Parkinson's disease. *Science Translational Medicine*, 8(368), 368ra174.
- Ghosh, D., Mondal, M., Mohite, G. M., Singh, P. K., Ranjan, P., Anoop, A., Ghosh, S., Jha, N. N., Kumar, A., & Maji, S. K. (2013). The Parkinson's disease-associated H50Q mutation accelerates alpha-Synuclein aggregation in vitro. *Biochemistry*, 52(40), 6925–6927.
- Ghosh, D., Sahay, S., Ranjan, P., Salot, S., Mohite, G. M., Singh, P. K., Dwivedi, S., Carvalho, E., Banerjee, R., Kumar, A., & Maji, S. K. (2014). The newly discovered Parkinson's disease associated Finnish mutation (A53E) attenuates alpha-synuclein aggregation and membrane binding. *Biochemistry*, 53(41), 6419–6421.
- Giasson, B. I., Uryu, K., Trojanowski, J. Q., & Lee, V. M. (1999). Mutant and wild type human alpha-synucleins assemble into elongated filaments with distinct morphologies in vitro. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(12), 7619–7622.
- Giasson, B. I., Duda, J. E., Forman, M. S., Lee, V. M., & Trojanowski, J. Q. (2001). Prominent perikaryal expression of alpha- and beta-synuclein in neurons of dorsal root ganglion and in medullary neurons. *Experimental Neurology*, 172(2), 354–362.
- Giasson, B. I., Murray, I. V. J., Trojanowski, J. Q., & Lee, V. M. Y. (2001). A Hydrophobic Stretch of 12 Amino Acid Residues in the Middle of α -Synuclein Is Essential for Filament Assembly. *Journal of Biological Chemistry*, 276(4), 2380–2386.
- Giasson, B. I., Forman, M. S., Higuchi, M., Golbe, L. I., Graves, C. L., Kotzbauer, P. T., Trojanowski, J. Q., & Lee, V. M.-Y. (2003). Initiation and synergistic fibrillization of tau and alpha-synuclein. *Science*, 300(5619), 636–640.

- Gibb, W. R., Scott, T., & Lees, A. J. (1991). Neuronal inclusions of Parkinson's disease. *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*, 6(1), 2–11.
- Gilman, S., Wenning, G. K., Low, P. A., Brooks, D. J., Mathias, C. J., Trojanowski, J. Q., Wood, N. W., Colosimo, C., Durr, A., Fowler, C. J., Kaufmann, H., Klockgether, T., Lees, A., Poewe, W., Quinn, N., Revesz, T., Robertson, D., Sandroni, P., Seppi, K., & Vidailhet, M. (2008). Second consensus statement on the diagnosis of multiple system atrophy. *Neurology*, 71(9), 670–676.
- Gispert, S., Del Turco, D., Garrett, L., Chen, A., Bernard, D. J., Hamm-Clement, J., Korf, H.-W., Deller, T., Braak, H., Auburger, G., & Nussbaum, R. L. (2003). Transgenic mice expressing mutant A53T human alpha-synuclein show neuronal dysfunction in the absence of aggregate formation. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 24(2), 419–429.
- Glickstein, S. B., Hof, P. R., & Schmauss, C. (2002). Mice lacking dopamine D2 and D3 receptors have spatial working memory deficits. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 22(13), 5619–5629.
- Goedert, M. (2001). Alpha-synuclein and neurodegenerative diseases. *Nature Reviews. Neuroscience*, 2(7), 492–501.
- Goedert, M. (2015). NEURODEGENERATION. Alzheimer's and Parkinson's diseases: The prion concept in relation to assembled Abeta, tau, and alpha-synuclein. *Science (New York, N.Y.)*, 349(6248), 1255–1259.
- Goedert, M., Clavaguera, F., & Tolnay, M. (2010). The propagation of prion-like protein inclusions in neurodegenerative diseases. *Trends in Neurosciences*, 33(7), 317–325.
- Goedert, M., Jakes, R., & Spillantini, M. G. (2017). The Synucleinopathies: Twenty Years On. *Journal of Parkinson's Disease*, 7(s1), S51–S69.
- Goedert, M., Spillantini, M. G., Del Tredici, K., & Braak, H. (2013). 100 years of Lewy pathology. *Nature Reviews. Neurology*, 9(1), 13–24.
- Golbe, L. I., & Leyton, C. E. (2018). Life expectancy in Parkinson disease. *Neurology*, 91(22), 991–992.
- Goldberg, M. S., Fleming, S. M., Palacino, J. J., Cepeda, C., Lam, H. A., Bhatnagar, A., Meloni, E. G., Wu, N., Ackerson, L. C., Klapstein, G. J., Gajendiran, M., Roth, B. L., Chesselet, M.-F., Maidment, N. T., Levine, M. S., & Shen, J. (2003). Parkin-deficient mice exhibit nigrostriatal deficits but not loss of dopaminergic neurons. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(44), 43628–43635.
- Golebiewska, U., Zurawsky, C., & Scarlata, S. (2014). Defining the oligomerization state of γ -synuclein in solution and in cells. *Biochemistry*, 53(2), 293–299.
- Golovko, M. Y., Faergeman, N. J., Cole, N. B., Castagnet, P. I., Nussbaum, R. L., & Murphy, E. J. (2005). Alpha-synuclein gene deletion decreases brain palmitate uptake and alters the palmitate metabolism in the absence of alpha-synuclein palmitate binding. *Biochemistry*, 44(23), 8251–8259.
- Golts, N., Snyder, H., Frasier, M., Theisler, C., Choi, P., & Wolozin, B. (2002). Magnesium inhibits spontaneous and iron-induced aggregation of alpha-synuclein. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(18), 16116–16123.
- Gomez-Isla, T., Irizarry, M. C., Mariash, A., Cheung, B., Soto, O., Schrupp, S., Sondel, J., Kotilinek, L., Day, J., Schwarzschild, M. A., Cha, J.-H. J., Newell, K., Miller, D. W., Ueda, K., Young, A. B., Hyman, B. T., & Ashe, K. H. (2003). Motor dysfunction and gliosis with preserved dopaminergic markers in human alpha-synuclein A30P transgenic mice. *Neurobiology of Aging*, 24(2), 245–258.
- Gomez-Santos, C., Barrachina, M., Gimenez-Xavier, P., Dalfo, E., Ferrer, I., & Ambrosio, S. (2005). Induction of C/EBP beta and GADD153 expression by dopamine in human neuroblastoma cells. Relationship with alpha-synuclein increase and cell damage. *Brain Research Bulletin*, 65(1), 87–95.
- Gomez-Suaga, P., Bravo-San Pedro, J. M., González-Polo, R. A., Fuentes, J. M., & Niso-Santano, M. (2018). ER-mitochondria signaling in Parkinson's disease. *Cell Death & Disease*, 9(3), 337.
- Gomperts, S. N. (2016). Lewy Body Dementias: Dementia With Lewy Bodies and Parkinson Disease Dementia. *Continuum (Minneapolis, Minn.)*, 22(2 Dementia), 435–463.
- Goodwin, V. A., Richards, S. H., Taylor, R. S., Taylor, A. H., & Campbell, J. L. (2008). The effectiveness of exercise interventions for people with Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis. *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*, 23(5), 631–640.
- Gorbatyuk, O. S., Li, S., Nash, K., Gorbatyuk, M., Lewin, A. S., Sullivan, L. F., Mandel, R. J., Chen, W., Meyers, C., Manfredsson, F. P., & Muzyczka, N. (2010). In vivo RNAi-mediated alpha-synuclein silencing induces nigrostriatal degeneration. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*, 18(8), 1450–1457.
- Gorbatyuk, O. S., Li, S., Sullivan, L. F., Chen, W., Kondrikova, G., Manfredsson, F. P., Mandel, R. J., & Muzyczka, N. (2008). The phosphorylation state of Ser-129 in human alpha-synuclein determines neurodegeneration in a rat model of Parkinson disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(2), 763–768.
- Graham, D. R., & Sidhu, A. (2010). Mice expressing the A53T mutant form of human alpha-synuclein exhibit hyperactivity and reduced anxiety-like behavior. *Journal of Neuroscience Research*, 88(8), 1777–1783.

- Greenbaum, E. A., Graves, C. L., Mishizen-Eberz, A. J., Lupoli, M. A., Lynch, D. R., Englander, S. W., Axelsen, P. H., & Giasson, B. I. (2005). The E46K mutation in alpha-synuclein increases amyloid fibril formation. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(9), 7800–7807.
- Greffard, S., Verny, M., Bonnet, A.-M., Seilhean, D., Hauw, J.-J., & Duyckaerts, C. (2010). A stable proportion of Lewy body bearing neurons in the substantia nigra suggests a model in which the Lewy body causes neuronal death. *Neurobiology of Aging*, 31(1), 99–103.
- Greggio, E., Jain, S., Kingsbury, A., Bandopadhyay, R., Lewis, P., Kaganovich, A., van der Brug, M. P., Beilina, A., Blackinton, J., Thomas, K. J., Ahmad, R., Miller, D. W., Kesavapany, S., Singleton, A., Lees, A., Harvey, R. J., Harvey, K., & Cookson, M. R. (2006). Kinase activity is required for the toxic effects of mutant LRRK2/dardarin. *Neurobiology of Disease*, 23(2), 329–341.
- Greten-Harrison, B., Polydoro, M., Morimoto-Tomita, M., Diao, L., Williams, A. M., Nie, E. H., Makani, S., Tian, N., Castillo, P. E., Buchman, V. L., & Chandra, S. S. (2010). alpha-betagamgamma-Synuclein triple knockout mice reveal age-dependent neuronal dysfunction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(45), 19573–19578.
- Grimm, D., & Kay, M. A. (2006). Therapeutic short hairpin RNA expression in the liver: viral targets and vectors. *Gene Therapy*, 13(6), 563–575.
- Guo, J., Shou, C., Meng, L., Jiang, B., Dong, B., Yao, L., Xie, Y., Zhang, J., Chen, Y., Budman, D. R., & Shi, Y. E. (2007). Neuronal protein synuclein gamma predicts poor clinical outcome in breast cancer. *International Journal of Cancer*, 121(6), 1296–1305.
- Gupta, A., Godwin, A. K., Vanderveer, L., Lu, A., & Liu, J. (2003a). Hypomethylation of the synuclein gamma gene CpG island promotes its aberrant expression in breast carcinoma and ovarian carcinoma. *Cancer Research*, 63(3), 664–673.
- Gupta, A., Inaba, S., Wong, O. K., Fang, G., & Liu, J. (2003b). Breast cancer-specific gene 1 interacts with the mitotic checkpoint kinase BubR1. *Oncogene*, 22(48), 7593–7599.
- Guttman, M., Boileau, I., Warsh, J., Saint-Cyr, J. A., Ginovart, N., McCluskey, T., Houle, S., Wilson, A., Mundo, E., Rusjan, P., Meyer, J., & Kish, S. J. (2007). Brain serotonin transporter binding in non-depressed patients with Parkinson's disease. *European Journal of Neurology*, 14(5), 523–528.

H

- Halliday, G., Hely, M., Reid, W., & Morris, J. (2008). The progression of pathology in longitudinally followed patients with Parkinson's disease. *Acta Neuropathologica*, 115(4), 409–415.
- Hamilton, R. L. (2000). Lewy bodies in Alzheimer's disease: a neuropathological review of 145 cases using alpha-synuclein immunohistochemistry. *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)*, 10(3), 378–384.
- Han, B., Jin, H. J., Song, M. Y., Wang, T., & Zhao, H. (2014). A potential target for the treatment of Parkinson's disease: effect of lateral habenula lesions. *Parkinsonism & Related Disorders*, 20(11), 1191–1195.
- Hansen, H. C., Gibson, J. M., Zangemeister, W. H., & Kennard, C. (n.d.). The effect of treatment on eye-head coordination in Parkinson's disease. *Journal of Vestibular Research: Equilibrium & Orientation*, 1(2), 181–186.
- Harada, R., Kobayashi, N., Kim, J., Nakamura, C., Han, S.-W., Ikebukuro, K., & Sode, K. (2009). The effect of amino acid substitution in the imperfect repeat sequences of alpha-synuclein on fibrillation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1792(10), 998–1003.
- Hardee, C. L., Arévalo-Soliz, L. M., Hornstein, B. D., & Zechiedrich, L. (2017). Advances in Non-Viral DNA Vectors for Gene Therapy. *Genes*, 8(2).
- Hashimoto, M., Rockenstein, E., Mante, M., Mallory, M., & Masliah, E. (2001). beta-Synuclein inhibits alpha-synuclein aggregation: a possible role as an anti-parkinsonian factor. *Neuron*, 32(3), 213–223.
- Hashimoto, M., Hsu, L. J., Rockenstein, E., Takenouchi, T., Mallory, M., & Masliah, E. (2002). alpha-Synuclein protects against oxidative stress via inactivation of the c-Jun N-terminal kinase stress-signaling pathway in neuronal cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(13), 11465–11472.
- Hashimoto, M., Takenouchi, T., Rockenstein, E., & Masliah, E. (2003). Alpha-synuclein up-regulates expression of caveolin-1 and down-regulates extracellular signal-regulated kinase activity in B103 neuroblastoma cells: role in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry*, 85(6), 1468–1479.
- Hatami, A., & Chesselet, M.-F. (2015). Transgenic rodent models to study alpha-synuclein pathogenesis, with a focus on cognitive deficits. *Current Topics in Behavioral Neurosciences*, 22, 303–330.
- Hatters, D. M., & Howlett, G. J. (2002). The structural basis for amyloid formation by plasma apolipoproteins: a review. *European Biophysics Journal: EBJ*, 31(1), 2–8.
- Hauser, R. A., Olanow, C. W., Kiebertz, K. D., Pourcher, E., Docu-Axelerad, A., Lew, M., Kozyolkin, O., Neale, A., Resburg, C., Meya, U., Kenney, C., & Bandak, S. (2014). Tozadenant (SYN115) in patients with

- Parkinson's disease who have motor fluctuations on levodopa: a phase 2b, double-blind, randomised trial. *The Lancet. Neurology*, 13(8), 767–776.
- Healy, D. G., Falchi, M., O'Sullivan, S. S., Bonifati, V., Durr, A., Bressman, S., Brice, A., Aasly, J., Zabetian, C. P., Goldwurm, S., Ferreira, J. J., Tolosa, E., Kay, D. M., Klein, C., Williams, D. R., Marras, C., Lang, A. E., Wszolek, Z. K., Berciano, J., ... Wood, N. W. (2008). Phenotype, genotype, and worldwide genetic penetrance of LRRK2-associated Parkinson's disease: a case-control study. *The Lancet. Neurology*, 7(7), 583–590.
- Henrich, M. T., Geibl, F. F., Lee, B., Chiu, W.-H., Koprach, J. B., Brotchie, J. M., Timmermann, L., Decher, N., Matschke, L. A., & Oertel, W. H. (2018). A53T-alpha-synuclein overexpression in murine locus coeruleus induces Parkinson's disease-like pathology in neurons and glia. *Acta Neuropathologica Communications*, 6(1), 39.
- Hernan, M. A., Zhang, S. M., Rueda-deCastro, A. M., Colditz, G. A., Speizer, F. E., & Ascherio, A. (2001). Cigarette smoking and the incidence of Parkinson's disease in two prospective studies. *Annals of Neurology*, 50(6), 780–786.
- Herzig, M. C., Bidinosti, M., Schweizer, T., Hafner, T., Stemmelen, C., Weiss, A., Danner, S., Vidotto, N., Stauffer, D., Barske, C., Mayer, F., Schmid, P., Rovelli, G., van der Putten, P. H., & Shimshek, D. R. (2012). High LRRK2 levels fail to induce or exacerbate neuronal alpha-synucleinopathy in mouse brain. *PLoS One*, 7(5), e36581.
- Herzig, M. C., Kolly, C., Persohn, E., Theil, D., Schweizer, T., Hafner, T., Stemmelen, C., Troxler, T. J., Schmid, P., Danner, S., Schnell, C. R., Mueller, M., Kinzel, B., Grevot, A., Bolognani, F., Stirn, M., Kuhn, R. R., Kaupmann, K., van der Putten, P. H., ... Shimshek, D. R. (2011). LRRK2 protein levels are determined by kinase function and are crucial for kidney and lung homeostasis in mice. *Human Molecular Genetics*, 20(21), 4209–4223.
- Hirsch, E. C. (2009). Iron transport in Parkinson's disease. *Parkinsonism & Related Disorders*, 15 Suppl 3, S209-11.
- Hong, S. (2013). Dopamine system: manager of neural pathways. *Frontiers in Human Neuroscience*, 7, 854.
- Hoss, A. G., Labadorf, A., Beach, T. G., Latourelle, J. C., & Myers, R. H. (2016). microRNA Profiles in Parkinson's Disease Prefrontal Cortex. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 8, 36.
- Howes, M. T., Kirkham, M., Riches, J., Cortese, K., Walser, P. J., Simpson, F., Hill, M. M., Jones, A., Lundmark, R., Lindsay, M. R., Hernandez-Deviez, D. J., Hadzic, G., McCluskey, A., Bashir, R., Liu, L., Pilch, P., McMahon, H., Robinson, P. J., Hancock, J. F., ... Parton, R. G. (2010). Clathrin-independent carriers form a high capacity endocytic sorting system at the leading edge of migrating cells. *The Journal of Cell Biology*, 190(4), 675–691.
- Hoyer, D., Thakker, D. R., Natt, F., Maier, R., Huesken, D., Muller, M., Flor, P., VAN DER Putten, H., Schmutz, M., Bilbe, G., & Cryan, J. F. (2006). Global down-regulation of gene expression in the brain using RNA interference, with emphasis on monoamine transporters and GPCRs: implications for target characterization in psychiatric and neurological disorders. *Journal of Receptor and Signal Transduction Research*, 26(5–6), 527–547.
- Hoyer, W., Antony, T., Cherny, D., Heim, G., Jovin, T. M., & Subramaniam, V. (2002). Dependence of alpha-synuclein aggregate morphology on solution conditions. *Journal of Molecular Biology*, 322(2), 383–393.
- Hoyer, W., Cherny, D., Subramaniam, V., & Jovin, T. M. (2004). Impact of the acidic C-terminal region comprising amino acids 109-140 on alpha-synuclein aggregation in vitro. *Biochemistry*, 43(51), 16233–16242.
- Hur, E.-M., Jang, E.-H., Jeong, G. R., & Lee, B. D. (2019). LRRK2 and membrane trafficking: nexus of Parkinson's disease. *BMB reports*, 52(9), 533–539.

I

- Iacono, D., Geraci-Erck, M., Rabin, M. L., Adler, C. H., Serrano, G., Beach, T. G., & Kurlan, R. (2015). Parkinson disease and incidental Lewy body disease: Just a question of time? *Neurology*, 85(19), 1670–1679.
- Ibáñez, P., Bonnet, A.-M., Debarges, B., Lohmann, E., Tison, F., Pollak, P., Agid, Y., Durr, A., & Brice, A. (2004). Causal relation between alpha-synuclein gene duplication and familial Parkinson's disease. *Lancet (London, England)*, 364(9440), 1169–1171.
- Ikeda, M., Kawarabayashi, T., Harigaya, Y., Sasaki, A., Yamada, S., Matsubara, E., Murakami, T., Tanaka, Y., Kurata, T., Wuhua, X., Ueda, K., Kuribara, H., Ikarashi, Y., Nakazato, Y., Okamoto, K., Abe, K., & Shoji, M. (2009). Motor impairment and aberrant production of neurochemicals in human alpha-synuclein A30P+A53T transgenic mice with alpha-synuclein pathology. *Brain Research*, 1250, 232–241.
- Ikemoto, S. (2010). Brain reward circuitry beyond the mesolimbic dopamine system: a neurobiological theory. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 35(2), 129–150.
- Iljina, M., Garcia, G. A., Horrocks, M. H., Tosatto, L., Choi, M. L., Ganzinger, K. A., Abramov, A. Y., Gandhi, S., Wood, N. W., Cremades, N., Dobson, C. M., Knowles, T. P. J., & Klenerman, D. (2016). Kinetic model of the

- aggregation of alpha-synuclein provides insights into prion-like spreading. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(9), E1206-15.
- Inaba, S., Li, C., Shi, Y. E., Song, D.-Q., Jiang, J.-D., & Liu, J. (2005). Synuclein gamma inhibits the mitotic checkpoint function and promotes chromosomal instability of breast cancer cells. *Breast Cancer Research and Treatment*, 94(1), 25-35.
- Íñigo-Marco, I., Valencia, M., Larrea, L., Bugallo, R., Martínez-Goikoetxea, M., Zuriguel, I., & Arrasate, M. (2017). E46K α -synuclein pathological mutation causes cell-autonomous toxicity without altering protein turnover or aggregation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(39), E8274-E8283.
- Ishii, A., Nonaka, T., Taniguchi, S., Saito, T., Arai, T., Mann, D., Iwatsubo, T., Hisanaga, S.-I., Goedert, M., & Hasegawa, M. (2007). Casein kinase 2 is the major enzyme in brain that phosphorylates Ser129 of human alpha-synuclein: Implication for alpha-synucleinopathies. *FEBS Letters*, 581(24), 4711-4717.
- Itier, J.-M., Ibanez, P., Mena, M. A., Abbas, N., Cohen-Salmon, C., Bohme, G. A., Laville, M., Pratt, J., Corti, O., Pradier, L., Ret, G., Joubert, C., Periquet, M., Araujo, F., Negroni, J., Casarejos, M. J., Canals, S., Solano, R., Serrano, A., ... Garcia de Yebenes, J. (2003). Parkin gene inactivation alters behaviour and dopamine neurotransmission in the mouse. *Human Molecular Genetics*, 12(18), 2277-2291.
- Iwai, A., Masliah, E., Yoshimoto, M., Ge, N., Flanagan, L., de Silva, H. A., Kittel, A., & Saitoh, T. (1995). The precursor protein of non-A beta component of Alzheimer's disease amyloid is a presynaptic protein of the central nervous system. *Neuron*, 14(2), 467-475.
- Iwaki, H., Kageyama, S., Isono, T., Wakabayashi, Y., Okada, Y., Yoshimura, K., Terai, A., Arai, Y., Iwamura, H., Kawakita, M., & Yoshiki, T. (2004). Diagnostic potential in bladder cancer of a panel of tumor markers (calreticulin, gamma-synuclein, and catechol-o-methyltransferase) identified by proteomic analysis. *Cancer Science*, 95(12), 955-961.
- Iwata, A., Miura, S., Kanazawa, I., Sawada, M., & Nukina, N. (2001). alpha-Synuclein forms a complex with transcription factor Elk-1. *Journal of Neurochemistry*, 77(1), 239-252.
- Iwatsubo, T. (2003). Aggregation of alpha-synuclein in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Journal of Neurology*, 250 Suppl, III11-4.

J

- Jackson-Lewis, V., Blesa, J., & Przedborski, S. (2012). Animal models of Parkinson's disease. *Parkinsonism & Related Disorders*, 18 Suppl 1, S183-5.
- Jankovic, J. (2008). Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 79(4), 368-376.
- Jankovic, J., Goodman, I., Safirstein, B., Marmon, T. K., Schenk, D. B., Koller, M., Zago, W., Ness, D. K., Griffith, S. G., Grundman, M., Soto, J., Ostrowitzki, S., Boess, F. G., Martin-Facklam, M., Quinn, J. F., Isaacson, S. H., Omidvar, O., Ellenbogen, A., & Kinney, G. G. (2018). Safety and Tolerability of Multiple Ascending Doses of PRX002/RG7935, an Anti- α -Synuclein Monoclonal Antibody, in Patients With Parkinson Disease: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Neurology*, 75(10), 1206-1214.
- Jankovic, J. & Tolosa, E. (Eds.). (2006). *Parkinson's Disease & Movement Disorders* (5th ed.). Lippincott Williams & Wilkins.
- Jao, C. C., Der-Sarkissian, A., Chen, J., & Langen, R. (2004). Structure of membrane-bound alpha-synuclein studied by site-directed spin labeling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(22), 8331-8336.
- Javed, H., Menon, S. A., Al-Mansoori, K. M., Al-Wandi, A., Majbour, N. K., Ardah, M. T., Varghese, S., Vaikath, N. N., Haque, M. E., Azzouz, M., & El-Agnaf, O. M. (2016). Development of Nonviral Vectors Targeting the Brain as a Therapeutic Approach For Parkinson's Disease and Other Brain Disorders. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*, 24(4), 746-758.
- Jeannotte, A. M., McCarthy, J. G., Redei, E. E., & Sidhu, A. (2009a). Desipramine modulation of alpha-, gamma-synuclein, and the norepinephrine transporter in an animal model of depression. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 34(4), 987-998.
- Jeannotte, A. M., McCarthy, J. G., Redei, E. E., & Sidhu, A. (2009b). Desipramine modulation of alpha-, gamma-synuclein, and the norepinephrine transporter in an animal model of depression. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 34(4), 987-998.
- Jeannotte, A. M., McCarthy, J. G., & Sidhu, A. (2009). Desipramine induced changes in the norepinephrine transporter, alpha- and gamma-synuclein in the hippocampus, amygdala and striatum. *Neuroscience Letters*, 467(2), 86-89.

- Jeannotte, A. M., & Sidhu, A. (2007). Regulation of the norepinephrine transporter by alpha-synuclein-mediated interactions with microtubules. *The European Journal of Neuroscience*, 26(6), 1509–1520.
- Jellinger, K. A. (2003). Alpha-synuclein pathology in Parkinson's and Alzheimer's disease brain: incidence and topographic distribution—a pilot study. *Acta Neuropathologica*, 106(3), 191–201.
- Jellinger, K. A. (2004). Lewy body-related alpha-synucleinopathy in the aged human brain. *Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria: 1996)*, 111(10–11), 1219–1235.
- Jellinger, K. A. (2009). Significance of brain lesions in Parkinson disease dementia and Lewy body dementia. *Frontiers of Neurology and Neuroscience*, 24, 114–125.
- Jenco, J. M., Rawlingson, A., Daniels, B., & Morris, A. J. (1998). Regulation of phospholipase D2: selective inhibition of mammalian phospholipase D isoenzymes by alpha- and beta-synucleins. *Biochemistry*, 37(14), 4901–4909.
- Jenner, P., Morris, H. R., Robbins, T. W., Goedert, M., Hardy, J., Ben-Shlomo, Y., Bolam, P., Burn, D., Hindle, J. V., & Brooks, D. (2013). Parkinson's disease—the debate on the clinical phenomenology, aetiology, pathology and pathogenesis. *Journal of Parkinson's Disease*, 3(1), 1–11.
- Jensen, P. H., Hojrup, P., Hager, H., Nielsen, M. S., Jacobsen, L., Olesen, O. F., Gliemann, J., & Jakes, R. (1997). Binding of Abeta to alpha- and beta-synucleins: identification of segments in alpha-synuclein/NAC precursor that bind Abeta and NAC. *The Biochemical Journal*, 323 (Pt 2), 539–546.
- Jensen, P. H., Li, J. Y., Dahlstrom, A., & Dotti, C. G. (1999). Axonal transport of synucleins is mediated by all rate components. *The European Journal of Neuroscience*, 11(10), 3369–3376.
- Jensen, P. H., Nielsen, M. S., Jakes, R., Dotti, C. G., & Goedert, M. (1998). Binding of alpha-synuclein to brain vesicles is abolished by familial Parkinson's disease mutation. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(41), 26292–26294.
- Jeong, G. R., Jang, E.-H., Bae, J. R., Jun, S., Kang, H. C., Park, C.-H., Shin, J.-H., Yamamoto, Y., Tanaka-Yamamoto, K., Dawson, V. L., Dawson, T. M., Hur, E.-M., & Lee, B. D. (2018). Dysregulated phosphorylation of Rab GTPases by LRRK2 induces neurodegeneration. *Molecular Neurodegeneration*, 13(1), 8.
- Ji, H., Liu, Y. E., Jia, T., Wang, M., Liu, J., Xiao, G., Joseph, B. K., Rosen, C., & Shi, Y. E. (1997). Identification of a breast cancer-specific gene, BCSG1, by direct differential cDNA sequencing. *Cancer Research*, 57(4), 759–764.
- Jia, T., Liu, Y. E., Liu, J., & Shi, Y. E. (1999). Stimulation of breast cancer invasion and metastasis by synuclein gamma. *Cancer Research*, 59(3), 742–747.
- Jiang, W., Ju, C., Jiang, H., & Zhang, D. (2014). Dairy foods intake and risk of Parkinson's disease: a dose-response meta-analysis of prospective cohort studies. *European Journal of Epidemiology*, 29(9), 613–619.
- Jiang, Y., Liu, Y. E., Goldberg, I. D., & Shi, Y. E. (2004). γ synuclein, a novel heat-shock protein-associated chaperone, stimulates ligand-dependent estrogen receptor α signaling and mammary tumorigenesis. *Cancer Research*.
- Jiang, Y., Liu, Y. E., Lu, A., Gupta, A., Goldberg, I. D., Liu, J., & Shi, Y. E. (2003). Stimulation of estrogen receptor signaling by gamma synuclein. *Cancer Research*, 63(14), 3899–3903.
- Jo, E., Fuller, N., Rand, R. P., St George-Hyslop, P., & Fraser, P. E. (2002). Defective membrane interactions of familial Parkinson's disease mutant A30P alpha-synuclein. *Journal of Molecular Biology*, 315(4), 799–807.
- Joe, E.-H., Choi, D.-J., An, J., Eun, J.-H., Jou, I., & Park, S. (2018). Astrocytes, Microglia, and Parkinson's Disease. *Experimental Neurobiology*, 27(2), 77–87.
- Josephs, K. A., Parisi, J. E., & Dickson, D. W. (2002). Alpha-synuclein studies are negative in postencephalic parkinsonism of von Economo. *Neurology*, 59(4), 645–646.
- Judge, A. D., Bola, G., Lee, A. C. H., & MacLachlan, I. (2006). Design of noninflammatory synthetic siRNA mediating potent gene silencing in vivo. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*, 13(3), 494–505.
- Juliano, R. L., Carver, K., Cao, C., & Ming, X. (2013). Receptors, endocytosis, and trafficking: the biological basis of targeted delivery of antisense and siRNA oligonucleotides. *Journal of Drug Targeting*, 21(1), 27–43.

K

- Kachergus, J., Mata, I. F., Hulihan, M., Taylor, J. P., Lincoln, S., Aasly, J., Gibson, J. M., Ross, O. A., Lynch, T., Wiley, J., Payami, H., Nutt, J., Maraganore, D. M., Czyzewski, K., Styczynska, M., Wszolek, Z. K., Farrer, M. J., & Toft, M. (2005). Identification of a novel LRRK2 mutation linked to autosomal dominant parkinsonism: evidence of a common founder across European populations. *American Journal of Human Genetics*, 76(4), 672–680.
- Kachroo, A., Irizarry, M. C., & Schwarzschild, M. A. (2010). Caffeine protects against combined paraquat and maneb-induced dopaminergic neuron degeneration. *Experimental Neurology*, 223(2), 657–661.

- Kandel, E. R., Schwartz, J. H., Jessell, T. M., Siegelbaum, S. A., & Hudspeth, A. J. (Eds.). (2012). *Principles of Neural Science* (5th ed.). McGraw-Hill.
- Kanaan, N. M., & Manfredsson, F. P. (2012). Loss of functional alpha-synuclein: a toxic event in Parkinson's disease? *Journal of Parkinson's Disease*, 2(4), 249–267.
- Kahle, P. J., Neumann, M., Ozmen, L., Muller, V., Jacobsen, H., Spooeren, W., Fuss, B., Mallon, B., Macklin, W. B., Fujiwara, H., Hasegawa, M., Iwatsubo, T., Kretzschmar, H. A., & Haass, C. (2002). Hyperphosphorylation and insolubility of alpha-synuclein in transgenic mouse oligodendrocytes. *EMBO Reports*, 3(6), 583–588.
- Kalaitzakis, M. E., Graeber, M. B., Gentleman, S. M., & Pearce, R. K. B. (2008). The dorsal motor nucleus of the vagus is not an obligatory trigger site of Parkinson's disease: a critical analysis of alpha-synuclein staging. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 34(3), 284–295.
- Kalia, L. V., & Lang, A. E. (2015). Parkinson's disease. *Lancet (London, England)*, 386(9996), 896–912.
- Karantzoulis, S., & Galvin, J. E. (2011). Distinguishing Alzheimer's disease from other major forms of dementia. *Expert Review of Neurotherapeutics*, 11(11), 1579–1591.
- Karuppagounder, S. S., Brahmachari, S., Lee, Y., Dawson, V. L., Dawson, T. M., & Ko, H. S. (2014). The c-Abl inhibitor, nilotinib, protects dopaminergic neurons in a preclinical animal model of Parkinson's disease. *Scientific Reports*, 4, 4874.
- Karuppagounder, S. S., Xiong, Y., Lee, Y., Lawless, M. C., Kim, D., Nordquist, E., Martin, I., Ge, P., Brahmachari, S., Jhaldiyal, A., Kumar, M., Andrabi, S. A., Dawson, T. M., & Dawson, V. L. (2016). LRRK2 G2019S transgenic mice display increased susceptibility to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-mediated neurotoxicity. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 76(Pt B), 90–97.
- Kawamata, H., McLean, P. J., Sharma, N., & Hyman, B. T. (2001). Interaction of alpha-synuclein and synphilin-1: effect of Parkinson's disease-associated mutations. *Journal of Neurochemistry*, 77(3), 929–934.
- Kerenyi, L., Ricaurte, G. A., Schretlen, D. J., McCann, U., Varga, J., Mathews, W. B., Ravert, H. T., Dannals, R. F., Hilton, J., Wong, D. F., & Szabo, Z. (2003). Positron emission tomography of striatal serotonin transporters in Parkinson disease. *Archives of Neurology*, 60(9), 1223–1229.
- Keri, S., Moustafa, A. A., Myers, C. E., Benedek, G., & Gluck, M. A. (2010). {alpha}-Synuclein gene duplication impairs reward learning. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(36), 15992–15994.
- Khodr, C. E., Sapru, M. K., Pedapati, J., Han, Y., West, N. C., Kells, A. P., Bankiewicz, K. S., & Bohn, M. C. (2011). An alpha-synuclein AAV gene silencing vector ameliorates a behavioral deficit in a rat model of Parkinson's disease, but displays toxicity in dopamine neurons. *Brain Research*, 1395, 94–107.
- Kholodilov, N. G., Neystat, M., Oo, T. F., Lo, S. E., Larsen, K. E., Sulzer, D., & Burke, R. E. (1999). Increased expression of rat synuclein in the substantia nigra pars compacta identified by mRNA differential display in a model of developmental target injury. *Journal of Neurochemistry*, 73(6), 2586–2599.
- Kiely, A. P., Asi, Y. T., Kara, E., Limousin, P., Ling, H., Lewis, P., Proukakis, C., Quinn, N., Lees, A. J., Hardy, J., Revesz, T., Houlden, H., & Holton, J. L. (2013). alpha-Synucleinopathy associated with G51D SNCA mutation: a link between Parkinson's disease and multiple system atrophy? *Acta Neuropathologica*, 125(5), 753–769.
- Kilpeläinen, T., Julku, U. H., Svarcbaahs, R., & Myöhänen, T. T. (2019). Behavioural and dopaminergic changes in double mutated human A30P*A53T alpha-synuclein transgenic mouse model of Parkinson's disease. *Scientific Reports*, 9(1), 17382.
- Kim, T. D., Choi, E., Rhim, H., Paik, S. R., & Yang, C.-H. (2004). Alpha-synuclein has structural and functional similarities to small heat shock proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 324(4), 1352–1359.
- Kim, H.-Y., Cho, M.-K., Kumar, A., Maier, E., Siebenhaar, C., Becker, S., Fernandez, C. O., Lashuel, H. A., Benz, R., Lange, A., & Zweckstetter, M. (2009). Structural properties of pore-forming oligomers of alpha-synuclein. *Journal of the American Chemical Society*, 131(47), 17482–17489.
- Kish, S. J. (2003). Biochemistry of Parkinson's disease: is a brain serotonergic deficiency a characteristic of idiopathic Parkinson's disease? *Advances in Neurology*, 91, 39–49.
- Kish, S. J., Tong, J., Hornykiewicz, O., Rajput, A., Chang, L.-J., Guttman, M., & Furukawa, Y. (2008). Preferential loss of serotonin markers in caudate versus putamen in Parkinson's disease. *Brain: A Journal of Neurology*, 131(Pt 1), 120–131.
- Kitada, T., Asakawa, S., Hattori, N., Matsumine, H., Yamamura, Y., Minoshima, S., Yokochi, M., Mizuno, Y., & Shimizu, N. (1998). Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature*, 392(6676), 605–608.
- Klein, R. L., King, M. A., Hamby, M. E., & Meyer, E. M. (2002). Dopaminergic cell loss induced by human A30P alpha-synuclein gene transfer to the rat substantia nigra. *Human Gene Therapy*, 13(5), 605–612.
- Kokhan, V. S., Afanasyeva, M. A., & Van'kin, G. I. (2012). alpha-Synuclein knockout mice have cognitive impairments. *Behavioural Brain Research*, 231(1), 226–230.

- Kokhan, V. S., Kokhan, T. Y. G., Samsonova, A. N., Fisenko, V. P., Ustyugov, A. A., & Aliev, G. (2018). The Dopaminergic Dysfunction and Altered Working Memory Performance of Aging Mice Lacking Gamma-synuclein Gene. *CNS & Neurological Disorders Drug Targets*, 17(8), 604–607.
- Kokhan, V. S., Van'kin, G. I., Bachurin, S. O., & Shamakina, I. Y. (2013). Differential involvement of the gamma-synuclein in cognitive abilities on the model of knockout mice. *BMC Neuroscience*, 14, 53.
- Koller, E., Propp, S., Murray, H., Lima, W., Bhat, B., Prakash, T. P., Allerson, C. R., Swayze, E. E., Marcusson, E. G., & Dean, N. M. (2006). Competition for RISC binding predicts in vitro potency of siRNA. *Nucleic Acids Research*, 34(16), 4467–4476.
- Koller, E., Vincent, T. M., Chappell, A., De, S., Manoharan, M., & Bennett, C. F. (2011). Mechanisms of single-stranded phosphorothioate modified antisense oligonucleotide accumulation in hepatocytes. *Nucleic Acids Research*, 39(11), 4795–4807.
- Kondo, T., & Mizuno, Y. (2015). A long-term study of istradefylline safety and efficacy in patients with Parkinson disease. *Clinical Neuropharmacology*, 38(2), 41–46.
- Konno, T., Siuda, J., & Wszolek, Z. K. (2016). Genetics of Parkinson's disease: a review of SNCA and LRRK2. *Wiadomosci Lekarskie (Warsaw, Poland: 1960)*, 69(3 Pt 1), 328–332.
- Kordower, J. H., Chu, Y., Hauser, R. A., Freeman, T. B., & Olanow, C. W. (2008). Lewy body-like pathology in long-term embryonic nigral transplants in Parkinson's disease. *Nature Medicine*, 14(5), 504–506.
- Kosaka, K. (Ed.). (2017). *Dementia with Lewy Bodies: Clinical and Biological Aspects*. Springer Japan.
- Kruger, R., Kuhn, W., Muller, T., Woitalla, D., Graeber, M., Kosel, S., Przuntek, H., Epplen, J. T., Schols, L., & Riess, O. (1998). Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Nature genetics*, 18(2), 106–108.
- Kumar, A., Kopra, J., Varendi, K., Porokuokka, L. L., Panhelainen, A., Kuure, S., Marshall, P., Karalija, N., Harma, M.-A., Vilenius, C., Lillevali, K., Tekko, T., Mijatovic, J., Pulkkinen, N., Jakobson, M., Jakobson, M., Ola, R., Palm, E., Lindahl, M., ... Andressoo, J.-O. (2015). GDNF Overexpression from the Native Locus Reveals its Role in the Nigrostriatal Dopaminergic System Function. *PLoS Genetics*, 11(12), e1005710.
- Kumar, P., Kaundal, R. K., More, S., & Sharma, S. S. (2009). Beneficial effects of pioglitazone on cognitive impairment in MPTP model of Parkinson's disease. *Behavioural Brain Research*, 197(2), 398–403.
- Kurz, A., Double, K. L., Lastres-Becker, I., Tozzi, A., Tantucci, M., Bockhart, V., Bonin, M., Garcia-Arencibia, M., Nuber, S., Schlaudraff, F., Liss, B., Fernandez-Ruiz, J., Gerlach, M., Wullner, U., Luddens, H., Calabresi, P., Auburger, G., & Gispert, S. (2010). A53T-alpha-synuclein overexpression impairs dopamine signaling and striatal synaptic plasticity in old mice. *PLoS One*, 5(7), e11464.

L

- Lai, Y.-C., Kondapalli, C., Lehneck, R., Procter, J. B., Dill, B. D., Woodroof, H. I., Gourlay, R., Peggie, M., Macartney, T. J., Corti, O., Corvol, J.-C., Campbell, D. G., Itzen, A., Trost, M., & Muqit, M. M. (2015). Phosphoproteomic screening identifies Rab GTPases as novel downstream targets of PINK1. *The EMBO Journal*, 34(22), 2840–2861.
- Langston, J. W., Ballard, P., Tetrud, J. W., & Irwin, I. (1983). Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science (New York, N.Y.)*, 219(4587), 979–980.
- Larsen, K. E., Schmitz, Y., Troyer, M. D., Mosharov, E., Dietrich, P., Quazi, A. Z., Savalle, M., Nemani, V., Chaudhry, F. A., Edwards, R. H., Stefanis, L., & Sulzer, D. (2006). Alpha-synuclein overexpression in PC12 and chromaffin cells impairs catecholamine release by interfering with a late step in exocytosis. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 26(46), 11915–11922.
- Lashuel, H. A., Overk, C. R., Oueslati, A., & Masliah, E. (2013). The many faces of α -synuclein: from structure and toxicity to therapeutic target. *Nature Reviews. Neuroscience*, 14(1), 38–48.
- Lashuel, H. A., Petre, B. M., Wall, J., Simon, M., Nowak, R. J., Walz, T., & Lansbury, P. T. J. (2002). Alpha-synuclein, especially the Parkinson's disease-associated mutants, forms pore-like annular and tubular protofibrils. *Journal of Molecular Biology*, 322(5), 1089–1102.
- Lavedan, C. (1998a). The synuclein family. *Genome Research*, 8(9), 871–880.
- Lavedan, C., Leroy, E., Dehejia, A., Buchholtz, S., Dutra, A., Nussbaum, R. L., & Polymeropoulos, M. H. (1998b). Identification, localization and characterization of the human gamma-synuclein gene. *Human Genetics*, 103(1), 106–112.
- Lecca, S., Meze, F. J., & Mameli, M. (2014). The lateral habenula in addiction and depression: an anatomical, synaptic and behavioral overview. *The European Journal of Neuroscience*, 39(7), 1170–1178.
- Lecca, S., Pelosi, A., Tchenio, A., Moutkine, I., Lujan, R., Hervé, D., & Mameli, M. (2016). Rescue of GABAB and GIRK function in the lateral habenula by protein phosphatase 2A inhibition ameliorates depression-like phenotypes in mice. *Nature Medicine*, 22(3), 254–261.

- Lee, A. J., Wang, Y., Alcalay, R. N., Mejia-Santana, H., Saunders-Pullman, R., Bressman, S., Corvol, J.-C., Brice, A., Lesage, S., Mangone, G., Tolosa, E., Pont-Sunyer, C., Vilas, D., Schule, B., Kausar, F., Foroud, T., Berg, D., Brockmann, K., Goldwurm, S., ... Marder, K. (2017). Penetrance estimate of LRRK2 p.G2019S mutation in individuals of non-Ashkenazi Jewish ancestry. *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*, 32(10), 1432–1438.
- Lee, H.-J., Baek, S. M., Ho, D.-H., Suk, J.-E., Cho, E.-D., & Lee, S.-J. (2011a). Dopamine promotes formation and secretion of non-fibrillar alpha-synuclein oligomers. *Experimental & Molecular Medicine*, 43(4), 216–222.
- Lee, H., Melrose, H. L., Yue, M., Pare, J.-F., Farrer, M. J., & Smith, Y. (2010). Lrrk2 localization in the primate basal ganglia and thalamus: a light and electron microscopic analysis in monkeys. *Experimental Neurology*, 224(2), 438–447.
- Lee, M. K., & Price, D. L. (2001). Advances in genetic models of Parkinson's disease. *Clinical Neuroscience Research*, 1(6), 456–466.
- Lee, M. K., Stirling, W., Xu, Y., Xu, X., Qui, D., Mandir, A. S., Dawson, T. M., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., & Price, D. L. (2002). Human alpha-synuclein-harboring familial Parkinson's disease-linked Ala-53 --> Thr mutation causes neurodegenerative disease with alpha-synuclein aggregation in transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(13), 8968–8973.
- Lee, P.-C., Raaschou-Nielsen, O., Lill, C. M., Bertram, L., Sinsheimer, J. S., Hansen, J., & Ritz, B. (2016). Gene-environment interactions linking air pollution and inflammation in Parkinson's disease. *Environmental Research*, 151, 713–720.
- Lee, S.-J., Lim, H.-S., Masliah, E., & Lee, H.-J. (2011b). Protein aggregate spreading in neurodegenerative diseases: problems and perspectives. *Neuroscience Research*, 70(4), 339–348.
- Lees, A. J., Hardy, J., & Revesz, T. (2009). Parkinson's disease. *Lancet (London, England)*, 373(9680), 2055–2066.
- Leong, S. L., Cappai, R., Barnham, K. J., & Pham, C. L. L. (2009). Modulation of alpha-synuclein aggregation by dopamine: a review. *Neurochemical Research*, 34(10), 1838–1846.
- Leroy, E., Boyer, R., Auburger, G., Leube, B., Ulm, G., Mezey, E., Harta, G., Brownstein, M. J., Jonnalagada, S., Chernova, T., Dehejia, A., Lavedan, C., Gasser, T., Steinbach, P. J., Wilkinson, K. D., & Polymeropoulos, M. H. (1998). The ubiquitin pathway in Parkinson's disease. *Nature*, 395(6701), 451–452.
- Lesage, S., Anheim, M., Letournel, F., Bousset, L., Honore, A., Rozas, N., Pieri, L., Madiona, K., Durr, A., Melki, R., Verny, C., & Brice, A. (2013). G51D alpha-synuclein mutation causes a novel parkinsonian-pyramidal syndrome. *Annals of Neurology*, 73(4), 459–471.
- Lesage, S., & Brice, A. (2009). Parkinson's disease: from monogenic forms to genetic susceptibility factors. *Human Molecular Genetics*, 18(R1), R48-59.
- Levin, J., Kurz, A., Arzberger, T., Giese, A., & Hoglinger, G. U. (2016). The Differential Diagnosis and Treatment of Atypical Parkinsonism. *Deutsches Arzteblatt International*, 113(5), 61–69.
- Levites, Y., Weinreb, O., Maor, G., Youdim, M. B., & Mandel, S. (2001). Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate prevents N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced dopaminergic neurodegeneration. *Journal of Neurochemistry*, 78(5), 1073–1082.
- Li, B., Piriz, J., Mirrione, M., Chung, C., Proulx, C. D., Schulz, D., Henn, F., & Malinow, R. (2011). Synaptic potentiation onto habenula neurons in the learned helplessness model of depression. *Nature*, 470(7335), 535–539.
- Li, J.-Y., Englund, E., Holton, J. L., Soulet, D., Hagell, P., Lees, A. J., Lashley, T., Quinn, N. P., Rehncrona, S., Björklund, A., Widner, H., Revesz, T., Lindvall, O., & Brundin, P. (2008). Lewy bodies in grafted neurons in subjects with Parkinson's disease suggest host-to-graft disease propagation. *Nature Medicine*, 14(5), 501–503.
- Li, Q.-X., Campbell, B. C. V., McLean, C. A., Thyagarajan, D., Gai, W.-P., Kapsa, R. M., Beyreuther, K., Masters, C. L., & Culvenor, J. G. (2002). Platelet alpha- and gamma-synucleins in Parkinson's disease and normal control subjects. *Journal of Alzheimer's Disease: JAD*, 4(4), 309–315.
- Li, X., Patel, J. C., Wang, J., Avshalumov, M. V., Nicholson, C., Buxbaum, J. D., Elder, G. A., Rice, M. E., & Yue, Z. (2010). Enhanced striatal dopamine transmission and motor performance with LRRK2 overexpression in mice is eliminated by familial Parkinson's disease mutation G2019S. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 30(5), 1788–1797.
- Li, Y., Liu, W., Oo, T. F., Wang, L., Tang, Y., Jackson-Lewis, V., Zhou, C., Geghman, K., Bogdanov, M., Przedborski, S., Beal, M. F., Burke, R. E., & Li, C. (2009). Mutant LRRK2(R1441G) BAC transgenic mice recapitulate cardinal features of Parkinson's disease. *Nature Neuroscience*, 12(7), 826–828.
- Li, Z., Scwab, G. M., Peng, B., Hess, K. R., Abbruzzese, J. L., Evans, D. B., & Chiao, P. J. (2004). Overexpression of synuclein-gamma in pancreatic adenocarcinoma. *Cancer*.
- Liang, T., Spence, J., Liu, L., Strother, W. N., Chang, H. W., Ellison, J. A., Lumeng, L., Li, T.-K., Foroud, T., & Carr, L. G. (2003). alpha-Synuclein maps to a quantitative trait locus for alcohol preference and is differentially expressed in alcohol-preferring and -nonpreferring rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(8), 4690–4695.

- Liang, W., Miao, S., Zhang, B., He, S., Shou, C., Manivel, P., Krishna, R., Chen, Y., & Shi, Y. E. (2015). Synuclein gamma protects Akt and mTOR and renders tumor resistance to Hsp90 disruption. *Oncogene*, 34(18), 2398–2405.
- Liddelow, S. A., Guttenplan, K. A., Clarke, L. E., Bennett, F. C., Bohlen, C. J., Schirmer, L., ... Barres, B. A. (2017). Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature*, 541(7638), 481–487.
- Lim, K.-L., & Tan, J. M. M. (2007). Role of the ubiquitin proteasome system in Parkinson's disease. *BMC Biochemistry*, 8 Suppl 1, S13.
- Lin, X., Parisiadou, L., Gu, X.-L., Wang, L., Shim, H., Sun, L., Xie, C., Long, C.-X., Yang, W.-J., Ding, J., Chen, Z. Z., Gallant, P. E., Tao-Cheng, J.-H., Rudow, G., Troncoso, J. C., Liu, Z., Li, Z., & Cai, H. (2009). Leucine-rich repeat kinase 2 regulates the progression of neuropathology induced by Parkinson's-disease-related mutant alpha-synuclein. *Neuron*, 64(6), 807–827.
- Lippa, C. F., Schmidt, M. L., Lee, V. M., & Trojanowski, J. Q. (1999). Antibodies to alpha-synuclein detect Lewy bodies in many Down's syndrome brains with Alzheimer's disease. *Annals of Neurology*, 45(3), 353–357.
- Liu, C., Yan, D.-Y., Tan, X., Ma, Z., Wang, C., Deng, Y., Liu, W., Yang, T.-Y., Xu, Z.-F., & Xu, B. (2018). Effect of the cross-talk between autophagy and endoplasmic reticulum stress on Mn-induced alpha-synuclein oligomerization. *Environmental Toxicology*, 33(3), 315–324.
- Liu, H., Liu, W., Wu, Y., Zhou, Y., Xue, R., Luo, C., Wang, L., Zhao, W., Jiang, J.-D., & Liu, J. (2005). Loss of epigenetic control of synuclein-gamma gene as a molecular indicator of metastasis in a wide range of human cancers. *Cancer Research*, 65(17), 7635–7643.
- Liu, R., Guo, X., Park, Y., Huang, X., Sinha, R., Freedman, N. D., Hollenbeck, A. R., Blair, A., & Chen, H. (2012). Caffeine intake, smoking, and risk of Parkinson disease in men and women. *American Journal of Epidemiology*, 175(11), 1200–1207.
- Liu, Y., Fallon, L., Lashuel, H. A., Liu, Z., & Lansbury, P. T. J. (2002). The UCH-L1 gene encodes two opposing enzymatic activities that affect alpha-synuclein degradation and Parkinson's disease susceptibility. *Cell*, 111(2), 209–218.
- Liu, Y., Okada, T., Nomoto, T., Ke, X., Kume, A., Ozawa, K., & Xiao, S. (2007). Promoter effects of adeno-associated viral vector for transgene expression in the cochlea in vivo. *Experimental & Molecular Medicine*, 39(2), 170–175.
- Liu, Z., Bryant, N., Kumaran, R., Beilina, A., Abeliovich, A., Cookson, M. R., & West, A. B. (2018). LRRK2 phosphorylates membrane-bound Rabs and is activated by GTP-bound Rab7L1 to promote recruitment to the trans-Golgi network. *Human Molecular Genetics*, 27(2), 385–395.
- Liu, Y., Ma, X., Fujioka, H., Liu, J., Chen, S., & Zhu, X. (2019). DJ-1 regulates the integrity and function of ER-mitochondria association through interaction with IP3R3-Grp75-VDAC1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(50), 25322–25328.
- Lo Bianco, C., Ridet, J.-L., Schneider, B. L., Deglon, N., & Aebischer, P. (2002). alpha-Synucleinopathy and selective dopaminergic neuron loss in a rat lentiviral-based model of Parkinson's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(16), 10813–10818.
- Loane, C., Wu, K., Bain, P., Brooks, D. J., Piccini, P., & Politis, M. (2013). Serotonergic loss in motor circuitries correlates with severity of action-postural tremor in PD. *Neurology*, 80(20), 1850–1855.
- Longo, F., Mercatelli, D., Novello, S., Arcuri, L., Brugnoli, A., Vincenzi, F., Russo, I., Berti, G., Mabrouk, O. S., Kennedy, R. T., Shimshek, D. R., Varani, K., Bubacco, L., Greggio, E., & Morari, M. (2017). Age-dependent dopamine transporter dysfunction and Serine129 phospho-alpha-synuclein overload in G2019S LRRK2 mice. *Acta Neuropathologica Communications*, 5(1), 22.
- Lorenzl, S., Nubling, G., Perrar, K. M., & Voltz, R. (2013). Palliative treatment of chronic neurologic disorders. *Handbook of Clinical Neurology*, 118, 133–139.
- Lou, H., Montoya, S. E., Alerte, T. N. M., Wang, J., Wu, J., Peng, X., Hong, C.-S., Friedrich, E. E., Mader, S. A., Pedersen, C. J., Marcus, B. S., McCormack, A. L., Di Monte, D. A., Daubner, S. C., & Perez, R. G. (2010). Serine 129 phosphorylation reduces the ability of alpha-synuclein to regulate tyrosine hydroxylase and protein phosphatase 2A in vitro and in vivo. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(23), 17648–17661.
- Lowe, J., McDermott, H., Landon, M., Mayer, R. J., & Wilkinson, K. D. (1990). Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase (PGP 9.5) is selectively present in ubiquitinated inclusion bodies characteristic of human neurodegenerative diseases. *The Journal of Pathology*, 161(2), 153–160.
- Lu, A., Gupta, A., Li, C., Ahlborn, T. E., Ma, Y., Shi, E. Y., & Liu, J. (2001). Molecular mechanisms for aberrant expression of the human breast cancer specific gene 1 in breast cancer cells: control of transcription by DNA methylation and intronic sequences. *Oncogene*, 20(37), 5173–5185.
- Lu, A., Zhang, F., Gupta, A., & Liu, J. (2002). Blockade of AP1 transactivation abrogates the abnormal expression of breast cancer-specific gene 1 in breast cancer cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(35), 31364–31372.

- Lu, N., Dubreuil, M., Zhang, Y., Neogi, T., Rai, S. K., Ascherio, A., Hernan, M. A., & Choi, H. K. (2016). Gout and the risk of Alzheimer's disease: a population-based, BMI-matched cohort study. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 75(3), 547–551.
- Lundblad, M., Decressac, M., Mattsson, B., & Bjorklund, A. (2012). Impaired neurotransmission caused by overexpression of alpha-synuclein in nigral dopamine neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(9), 3213–3219.
- Luo, X. F., Zhang, B. L., Li, J. C., Yang, Y. Y., Sun, Y. F., & Zhao, H. (2015). Lateral habenula as a link between dopaminergic and serotonergic systems contributes to depressive symptoms in Parkinson's disease. *Brain Research Bulletin*, 110, 40–46.
- Lynch, S. M., Zhou, C., & Messer, A. (2008). An scFv intrabody against the nonamyloid component of alpha-synuclein reduces intracellular aggregation and toxicity. *Journal of Molecular Biology*, 377(1), 136–147.
- Lytkina, O. A., Tarasova, T. V., Khritankova, I. V., Anokhin, P. K., Kukharsky, M. S., Ustyugov, A. A., & Bachurin, S. O. (2014). Gamma-synuclein binds synaptic vesicles but does not interact with SNARE-complex proteins. *Doklady. Biochemistry and Biophysics*, 456(1), 108–110.

M

- Ma, M.-R., Hu, Z.-W., Zhao, Y.-F., Chen, Y.-X., & Li, Y.-M. (2016a). Phosphorylation induces distinct alpha-synuclein strain formation. *Scientific Reports*, 6, 37130.
- Ma, W., Li, Y., Wang, C., Xu, F., Wang, M., & Liu, Y. (2016b). Serum miR-221 serves as a biomarker for Parkinson's disease. *Cell Biochemistry and Function*, 34(7), 511–515.
- MacLeod, D., Dowman, J., Hammond, R., Leete, T., Inoue, K., & Abeliovich, A. (2006). The familial Parkinsonism gene LRRK2 regulates neurite process morphology. *Neuron*, 52(4), 587–593.
- Madine, J., Doig, A. J., & Middleton, D. A. (2006). A study of the regional effects of alpha-synuclein on the organization and stability of phospholipid bilayers. *Biochemistry*, 45(18), 5783–5792.
- Maeda, K. (2005). [Community strategies for rehabilitation in senile dementia]. *Seishin shinkeigaku zasshi = Psychiatria et neurologia Japonica*, 107(4), 398–400.
- Magen, I., & Chesselet, M.-F. (2010). Genetic mouse models of Parkinson's disease The state of the art. *Progress in Brain Research*, 184, 53–87.
- Magen, I., & Chesselet, M.-F. (2011). Mouse models of cognitive deficits due to alpha-synuclein pathology. *Journal of Parkinson's Disease*, 1(3), 217–227.
- Maingay, M., Romero-Ramos, M., Carta, M., & Kirik, D. (2006). Ventral tegmental area dopamine neurons are resistant to human mutant alpha-synuclein overexpression. *Neurobiology of Disease*, 23(3), 522–532.
- Manning-Bog, A. B., McCormack, A. L., Purisai, M. G., Bolin, L. M., & Di Monte, D. A. (2003). Alpha-synuclein overexpression protects against paraquat-induced neurodegeneration. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 23(8), 3095–3099.
- Marazziti, D., Golini, E., Mandillo, S., Magrelli, A., Witke, W., Matteoni, R., & Tocchini-Valentini, G. P. (2004). Altered dopamine signaling and MPTP resistance in mice lacking the Parkinson's disease-associated GPR37/parkin-associated endothelin-like receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(27), 10189–10194.
- Maresova, P., Klimova, B., & Kuca, K. (2017). Medical and non-medical costs of Parkinson disease - comparison of Europe, USA, Asia an Australia. *Ceska a Slovenska Farmacie: Casopis Ceske Farmaceuticke Spolecnosti a Slovenske Farmaceuticke Spolecnosti*, 66(1), 3–8.
- Marinelli, M., & McCutcheon, J. E. (2014). Heterogeneity of dopamine neuron activity across traits and states. *Neuroscience*, 282, 176–197.
- Martinez-Vicente, M., Talloczy, Z., Kaushik, S., Massey, A. C., Mazzulli, J., Mosharov, E. V., Hodara, R., Fredenburg, R., Wu, D.-C., Follenzi, A., Dauer, W., Przedborski, S., Ischiropoulos, H., Lansbury, P. T., Sulzer, D., & Cuervo, A. M. (2008). Dopamine-modified alpha-synuclein blocks chaperone-mediated autophagy. *The Journal of Clinical Investigation*, 118(2), 777–788.
- Masana, M., Bortolozzi, A., & Artigas, F. (2011). Selective enhancement of mesocortical dopaminergic transmission by noradrenergic drugs: therapeutic opportunities in schizophrenia. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*, 14(1), 53–68.
- Masana, M., Castane, A., Santana, N., Bortolozzi, A., & Artigas, F. (2012). Noradrenergic antidepressants increase cortical dopamine: potential use in augmentation strategies. *Neuropharmacology*, 63(4), 675–684.
- Mash, D. C., Ouyang, Q., Pablo, J., Basile, M., Izenwasser, S., Lieberman, A., & Perrin, R. J. (2003). Cocaine abusers have an overexpression of alpha-synuclein in dopamine neurons. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 23(7), 2564–2571.

- Masliah, E., Rockenstein, E., Adame, A., Alford, M., Crews, L., Hashimoto, M., Seubert, P., Lee, M., Goldstein, J., Chilcote, T., Games, D., & Schenk, D. (2005). Effects of alpha-synuclein immunization in a mouse model of Parkinson's disease. *Neuron*, 46(6), 857–868.
- Maurage, C.-A., Ruchoux, M.-M., de Vos, R., Surguchov, A., & Destee, A. (2003). Retinal involvement in dementia with Lewy bodies: a clue to hallucinations? *Annals of Neurology*, 54(4), 542–547.
- Mayer, G., Faulhammer, D., Grattinger, M., Fessele, S., & Blind, M. (2009). A RNA-based approach towards small-molecule inhibitors. *Chembiochem: A European Journal of Chemical Biology*, 10(12), 1993–1996.
- Mbefo, M. K., Paleologou, K. E., Boucharaba, A., Oueslati, A., Schell, H., Fournier, M., Olschewski, D., Yin, G., Zweckstetter, M., Masliah, E., Kahle, P. J., Hirling, H., & Lashuel, H. A. (2010). Phosphorylation of synucleins by members of the Polo-like kinase family. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(4), 2807–2822.
- McGregor, M. M., & Nelson, A. B. (2019). Circuit Mechanisms of Parkinson's Disease. *Neuron*, 101(6), 1042–1056.
- McKeith, I. G., Boeve, B. F., Dickson, D. W., Halliday, G., Taylor, J.-P., Weintraub, D., Aarsland, D., Galvin, J., Attems, J., Ballard, C. G., Bayston, A., Beach, T. G., Blanc, F., Bohnen, N., Bonanni, L., Bras, J., Brundin, P., Burn, D., Chen-Plotkin, A., ... Kosaka, K. (2017). Diagnosis and management of dementia with Lewy bodies: Fourth consensus report of the DLB Consortium. *Neurology*, 89(1), 88–100.
- McNamara, J. O. 2nd, Andrich, E. R., Wang, Y., Viles, K. D., Rempel, R. E., Gilboa, E., Sullenger, B. A., & Giangrande, P. H. (2006). Cell type-specific delivery of siRNAs with aptamer-siRNA chimeras. *Nature Biotechnology*, 24(8), 1005–1015.
- McNaught, K. S., Olanow, C. W., Halliwell, B., Isacson, O., & Jenner, P. (2001). Failure of the ubiquitin-proteasome system in Parkinson's disease. *Nature Reviews. Neuroscience*, 2(8), 589–594.
- McNaught, K. S. P., Perl, D. P., Brownell, A.-L., & Olanow, C. W. (2004). Systemic exposure to proteasome inhibitors causes a progressive model of Parkinson's disease. *Annals of Neurology*, 56(1), 149–162.
- Meiser, J., Weindl, D., & Hiller, K. (2013). Complexity of dopamine metabolism. *Cell Communication and Signaling: CCS*, 11(1), 34.
- Melrose, H. L., Dachsel, J. C., Behrouz, B., Lincoln, S. J., Yue, M., Hinkle, K. M., Kent, C. B., Korvatska, E., Taylor, J. P., Witten, L., Liang, Y.-Q., Beevers, J. E., Boules, M., Dugger, B. N., Serna, V. A., Gaukhman, A., Yu, X., Castanedes-Casey, M., Braithwaite, A. T., ... Farrer, M. J. (2010). Impaired dopaminergic neurotransmission and microtubule-associated protein tau alterations in human LRRK2 transgenic mice. *Neurobiology of Disease*, 40(3), 503–517.
- Melrose, H. L., Kent, C. B., Taylor, J. P., Dachsel, J. C., Hinkle, K. M., Lincoln, S. J., Mok, S. S., Culvenor, J. G., Masters, C. L., Tyndall, G. M., Bass, D. I., Ahmed, Z., Andorfer, C. A., Ross, O. A., Wszolek, Z. K., DelDonne, A., Dickson, D. W., & Farrer, M. J. (2007). A comparative analysis of leucine-rich repeat kinase 2 (Lrrk2) expression in mouse brain and Lewy body disease. *Neuroscience*, 147(4), 1047–1058.
- Melrose, H., Lincoln, S., Tyndall, G., Dickson, D., & Farrer, M. (2006). Anatomical localization of leucine-rich repeat kinase 2 in mouse brain. *Neuroscience*, 139(3), 791–794.
- Mercado, G., Castillo, V., Soto, P., & Sidhu, A. (2016). ER stress and Parkinson's disease: Pathological inputs that converge into the secretory pathway. *Brain Research*, 1648(Pt B), 626–632.
- Mercuri, E., Darras, B. T., Chiriboga, C. A., Day, J. W., Campbell, C., Connolly, A. M., Iannaccone, S. T., Kirschner, J., Kuntz, N. L., Saito, K., Shieh, P. B., Tulinius, M., Mazzone, E. S., Montes, J., Bishop, K. M., Yang, Q., Foster, R., Gheuens, S., Bennett, C. F., ... Finkel, R. S. (2018). Nusinersen versus Sham Control in Later-Onset Spinal Muscular Atrophy. *The New England Journal of Medicine*, 378(7), 625–635.
- Mezey, E., Dehejia, A. M., Harta, G., Tresser, N., Suchy, S. F., Nussbaum, R. L., Brownstein, M. J., & Polymeropoulos, M. H. (1998a). Alpha synuclein is present in Lewy bodies in sporadic Parkinson's disease. *Molecular Psychiatry*, 3(6), 493–499.
- Mezey, E., Dehejia, A., Harta, G., Papp, M. I., Polymeropoulos, M. H., & Brownstein, M. J. (1998b). Alpha synuclein in neurodegenerative disorders: murderer or accomplice? *Nature Medicine*, 4(7), 755–757.
- Miller, D. W., Hague, S. M., Clarimon, J., Baptista, M., Gwinn-Hardy, K., Cookson, M. R., & Singleton, A. B. (2004). Alpha-synuclein in blood and brain from familial Parkinson disease with SNCA locus triplication. *Neurology*, 62(10), 1835–1838.
- Miller, G. M. (2011). The emerging role of trace amine-associated receptor 1 in the functional regulation of monoamine transporters and dopaminergic activity. *Journal of Neurochemistry*, 116(2), 164–176.
- Miner, L. H., Schroeter, S., Blakely, R. D., & Sesack, S. R. (2003). Ultrastructural localization of the norepinephrine transporter in superficial and deep layers of the rat prefrontal cortex and its spatial relationship to probable dopamine terminals. *The Journal of Comparative Neurology*, 466(4), 478–494.
- Mizoguchi, K., Yuzurihara, M., Ishige, A., Sasaki, H., Chui, D. H., & Tabira, T. (2000). Chronic stress induces impairment of spatial working memory because of prefrontal dopaminergic dysfunction. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 20(4), 1568–1574.
- Molochnikov, I., & Cohen, D. (2014). Hemispheric differences in the mesostriatal dopaminergic system. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 8, 110.

- Mor, F., Quintana, F., Mimran, A., & Cohen, I. R. (2003). Autoimmune encephalomyelitis and uveitis induced by T cell immunity to self beta-synuclein. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 170(1), 628–634.
- Moraga-Amaro, R., Gonzalez, H., Pacheco, R., & Stehberg, J. (2014). Dopamine receptor D3 deficiency results in chronic depression and anxiety. *Behavioural Brain Research*, 274, 186–193.
- Morens, D. M., Grandinetti, A., Reed, D., White, L. R., & Ross, G. W. (1995). Cigarette smoking and protection from Parkinson's disease: false association or etiologic clue? *Neurology*, 45(6), 1041–1051.
- Mori, H., Kondo, T., Yokochi, M., Matsumine, H., Nakagawa-Hattori, Y., Miyake, T., Suda, K., & Mizuno, Y. (1998). Pathologic and biochemical studies of juvenile parkinsonism linked to chromosome 6q. *Neurology*, 51(3), 890–892.
- Mori, S., Wang, L., Takeuchi, T., & Kanda, T. (2004). Two novel adeno-associated viruses from cynomolgus monkey: pseudotyping characterization of capsid protein. *Virology*, 330(2), 375–383.
- Mosharov, E. V., Staal, R. G. W., Bove, J., Prou, D., Hananiya, A., Markov, D., Poulsen, N., Larsen, K. E., Moore, C. M. H., Troyer, M. D., Edwards, R. H., Przedborski, S., & Sulzer, D. (2006). Alpha-synuclein overexpression increases cytosolic catecholamine concentration. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 26(36), 9304–9311.
- Mukaetova-Ladinska, E. B., Hurt, J., Jakes, R., Xuereb, J., Honer, W. G., & Wischik, C. M. (2000). Alpha-synuclein inclusions in Alzheimer and Lewy body diseases. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 59(5), 408–417.
- Mukaetova-Ladinska, E. B., Milne, J., Andras, A., Abdel-All, Z., Cerejeira, J., Greally, E., Robson, J., Jaros, E., Perry, R., McKeith, I. G., Brayne, C., Xuereb, J., Cleghorn, A., Doherty, J., McIntosh, G., & Milton, I. (2008). Alpha- and gamma-synuclein proteins are present in cerebrospinal fluid and are increased in aged subjects with neurodegenerative and vascular changes. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders*, 26(1), 32–42.
- Munhoz, R. P., Moro, A., Silveira-Moriyama, L., & Teive, H. A. (2015). Non-motor signs in Parkinson's disease: a review. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, 73(5), 454–462.
- Murphy, D. D., Rueter, S. M., Trojanowski, J. Q., & Lee, V. M. (2000). Synucleins are developmentally expressed, and alpha-synuclein regulates the size of the presynaptic vesicular pool in primary hippocampal neurons. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 20(9), 3214–3220.
- Myerowitz, R., Mizukami, H., Richardson, K. L., Finn, L. S., Tiffet, C. J., & Proia, R. L. (2004). Global gene expression in a type 2 Gaucher disease brain. *Molecular Genetics and Metabolism*, 83(4), 288–296.

N

- Nakajo, S., Shioda, S., Nakai, Y., & Nakaya, K. (1994). Localization of phosphoneuroprotein 14 (PNP 14) and its mRNA expression in rat brain determined by immunocytochemistry and in situ hybridization. *Brain Research. Molecular Brain Research*, 27(1), 81–86.
- Nakamura, T., Yamashita, H., Nagano, Y., Takahashi, T., Avraham, S., Avraham, H., Matsumoto, M., & Nakamura, S. (2002). Activation of Pyk2/RAFTK induces tyrosine phosphorylation of alpha-synuclein via Src-family kinases. *FEBS Letters*, 521(1–3), 190–194.
- Narhi, L., Wood, S. J., Steavenson, S., Jiang, Y., Wu, G. M., Anafi, D., Kaufman, S. A., Martin, F., Sitney, K., Denis, P., Louis, J. C., Wypych, J., Biere, A. L., & Citron, M. (1999). Both familial Parkinson's disease mutations accelerate alpha-synuclein aggregation. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(14), 9843–9846.
- Nemani, V. M., Lu, W., Berge, V., Nakamura, K., Onoa, B., Lee, M. K., Chaudhry, F. A., Nicoll, R. A., & Edwards, R. H. (2010). Increased expression of alpha-synuclein reduces neurotransmitter release by inhibiting synaptic vesicle reclustering after endocytosis. *Neuron*, 65(1), 66–79.
- Nestler, E. J., Hyman, S.E., & Malenka, R. C. (2009). *Molecular Neuropharmacology: A Foundation for Clinical Neuroscience* (2nd ed.). McGraw-Hill.
- Neumann, J., Bras, J., Deas, E., O'Sullivan, S. S., Parkkinen, L., Lachmann, R. H., Li, A., Holton, J., Guerreiro, R., Paudel, R., Segarane, B., Singleton, A., Lees, A., Hardy, J., Houlden, H., Revesz, T., & Wood, N. W. (2009). Glucocerebrosidase mutations in clinical and pathologically proven Parkinson's disease. *Brain: A Journal of Neurology*, 132(Pt 7), 1783–1794.
- Neumann, M., Kahle, P. J., Giasson, B. I., Ozmen, L., Borroni, E., Spooen, W., Muller, V., Odoy, S., Fujiwara, H., Hasegawa, M., Iwatsubo, T., Trojanowski, J. Q., Kretschmar, H. A., & Haass, C. (2002). Misfolded proteinase K-resistant hyperphosphorylated alpha-synuclein in aged transgenic mice with locomotor deterioration and in human alpha-synucleinopathies. *The Journal of Clinical Investigation*, 110(10), 1429–1439.
- Nguyen, J. V., Soto, I., Kim, K.-Y., Bushong, E. A., Oglesby, E., Valiente-Soriano, F. J., Yang, Z., Davis, C. O., Bedont, J. L., Son, J. L., Wei, J. O., Buchman, V. L., Zack, D. J., Vidal-Sanz, M., Ellisman, M. H., & Marsh-

- Armstrong, N. (n.d.). *Myelination transition zone astrocytes are constitutively phagocytic and have synuclein dependent reactivity in glaucoma.*
- Ninkina, N. N., Alimova-Kost, M. V., Paterson, J. W. E., Delaney, L., Cohen, B. B., Imreh, S., Gnuchev, N. V., Davies, A. M., & Buchman, V. L. (1998). Organization, expression and polymorphism of the human persyn gene. *Human Molecular Genetics*, 7(9), 1417–1424.
- Ninkina, N., Papachroni, K., Robertson, D. C., Schmidt, O., Delaney, L., O'Neill, F., Court, F., Rosenthal, A., Fleetwood-Walker, S. M., Davies, A. M., & Buchman, V. L. (2003). Neurons expressing the highest levels of gamma-synuclein are unaffected by targeted inactivation of the gene. *Molecular and Cellular Biology*, 23(22), 8233–8245.
- Ninkina, N., Peters, O., Millership, S., Salem, H., van der Putten, H., & Buchman, V. L. (2009). γ -Synucleinopathy: Neurodegeneration associated with overexpression of the mouse protein. *Human Molecular Genetics*, 18(10), 1779–1794.
- Ninkina, N., Tarasova, T. V., Chaprov, K. D., Roman, A. Y., Kukharsky, M. S., Kolik, L. G., Ovchinnikov, R., Ustyugov, A. A., Durnev, A. D., & Buchman, V. L. (2020). Alterations in the nigrostriatal system following conditional inactivation of α -synuclein in neurons of adult and aging mice. *Neurobiology of Aging*, 91, 76–87.
- Nishimura, M., Tomimoto, H., Suenaga, T., Nakamura, S., Namba, Y., Ikeda, K., Akiguchi, I., & Kimura, J. (1994). Synaptophysin and chromogranin A immunoreactivities of Lewy bodies in Parkinson's disease brains. *Brain Research*, 634(2), 339–344.
- Nishioka, K., Hayashi, S., Farrer, M. J., Singleton, A. B., Yoshino, H., Imai, H., Kitami, T., Sato, K., Kuroda, R., Tomiyama, H., Mizoguchi, K., Murata, M., Toda, T., Imoto, I., Inazawa, J., Mizuno, Y., & Hattori, N. (2006). Clinical heterogeneity of alpha-synuclein gene duplication in Parkinson's disease. *Annals of Neurology*, 59(2), 298–309.
- Novello, S., Arcuri, L., Dovero, S., Dutheil, N., Shimshek, D. R., Bezdard, E., & Morari, M. (2018). G2019S LRRK2 mutation facilitates alpha-synuclein neuropathology in aged mice. *Neurobiology of Disease*, 120, 21–33.

O

- Oaks, A. W., Frankfurt, M., Finkelstein, D. I., & Sidhu, A. (2013). Age-dependent effects of A53T alpha-synuclein on behavior and dopaminergic function. *PLoS One*, 8(4), e60378.
- Oaks, A. W., & Sidhu, A. (2011). Synuclein modulation of monoamine transporters. *FEBS Letters*, 585(7), 1001–1006.
- Obeso, J. A., Marin, C., Rodriguez-Oroz, C., Blesa, J., Benitez-Temino, B., Mena-Segovia, J., Rodriguez, M., & Olanow, C. W. (2008b). The basal ganglia in Parkinson's disease: current concepts and unexplained observations. *Annals of Neurology*, 64 Suppl 2, S30–46.
- Obeso, J. A., Rodriguez-Oroz, M. C., Goetz, C. G., Marin, C., Kordower, J. H., Rodriguez, M., Hirsch, E. C., Farrer, M., Schapira, A. H. V., & Halliday, G. (2010). Missing pieces in the Parkinson's disease puzzle. *Nature Medicine*, 16(6), 653–661.
- Obeso, J. A., Rodriguez-Oroz, M. C., Benitez-Temino, B., Blesa, F. J., Guridi, J., Marin, C., & Rodriguez, M. (2008a). Functional organization of the basal ganglia: therapeutic implications for Parkinson's disease. *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*, 23 Suppl 3, S548–59.
- Oeckl, P., Metzger, F., Nagl, M., von Arnim, C. A. F., Halbgebauer, S., Steinacker, P., Ludolph, A. C., & Otto, M. (2016). Alpha-, beta- and gamma-synuclein quantification in cerebrospinal fluid by multiple reaction monitoring reveals increased concentrations in Alzheimer's and Creutzfeldt-Jakob disease but no alteration in synucleinopathies. *Molecular & Cellular Proteomics: MCP*.
- Ogburn, K. D., & Figueiredo-Pereira, M. E. (2006). Cytoskeleton/endoplasmic reticulum collapse induced by prostaglandin J2 parallels centrosomal deposition of ubiquitinated protein aggregates. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(32), 23274–23284.
- Oikawa, T., Nonaka, T., Terada, M., Tamaoka, A., Hisanaga, S.-I., & Hasegawa, M. (2016). α -Synuclein Fibrils Exhibit Gain of Toxic Function, Promoting Tau Aggregation and Inhibiting Microtubule Assembly. *The Journal of Biological Chemistry*, 291(29), 15046–15056.
- Okochi, M., Walter, J., Koyama, A., Nakajo, S., Baba, M., Iwatsubo, T., Meijer, L., Kahle, P. J., & Haass, C. (2000). Constitutive phosphorylation of the Parkinson's disease associated alpha-synuclein. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(1), 390–397.
- Okun, M. S., & Foote, K. D. (2010). Parkinson's disease DBS: what, when, who and why? The time has come to tailor DBS targets. *Expert Review of Neurotherapeutics*, 10(12), 1847–1857.
- Olanow, C. W., & Prusiner, S. B. (2009). Is Parkinson's disease a prion disorder? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(31), 12571–12572.

- Olanow, C. W., Stocchi, F., & Lang, A. E. (Eds.). (2011). *Parkinson's Disease: Non-Motor and Non-Dopaminergic Features*. Blackwell Publishing.
- Oliveras-Salva, M., Van der Perren, A., Casadei, N., Stroobants, S., Nuber, S., D'Hooge, R., Van den Haute, C., & Baekelandt, V. (2013). rAAV2/7 vector-mediated overexpression of alpha-synuclein in mouse substantia nigra induces protein aggregation and progressive dose-dependent neurodegeneration. *Molecular Neurodegeneration*, 8, 44.
- Olsen, J. H., Friis, S., & Frederiksen, K. (2006). Malignant melanoma and other types of cancer preceding Parkinson disease. *Epidemiology (Cambridge, Mass.)*, 17(5), 582-587.
- Ono, K., Takahashi, R., Ikeda, T., & Yamada, M. (2012). Cross-seeding effects of amyloid beta-protein and alpha-synuclein. *Journal of Neurochemistry*, 122(5), 883-890.
- O'Reilly, E. J., McCullough, M. L., Chao, A., Henley, S. J., Calle, E. E., Thun, M. J., & Ascherio, A. (2005). Smokeless tobacco use and the risk of Parkinson's disease mortality. *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*, 20(10), 1383-1384.
- Orimo, S., Takahashi, A., Uchihara, T., Mori, F., Kakita, A., Wakabayashi, K., & Takahashi, H. (2007). Degeneration of cardiac sympathetic nerve begins in the early disease process of Parkinson's disease. *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)*, 17(1), 24-30.
- Ostrerova, N., Petrucelli, L., Farrer, M., Mehta, N., Choi, P., Hardy, J., & Wolozin, B. (1999). alpha-Synuclein shares physical and functional homology with 14-3-3 proteins. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 19(14), 5782-5791.
- Ott, T., & Nieder, A. (2019). Dopamine and Cognitive Control in Prefrontal Cortex. *Trends in Cognitive Sciences*, 23(3), 213-234.
- Ottolini, D., Cali, T., Szabo, I., & Brini, M. (2017). Alpha-synuclein at the intracellular and the extracellular side: functional and dysfunctional implications. *Biological Chemistry*, 398(1), 77-100.
- Oueslati, A. (2016). Implication of Alpha-Synuclein Phosphorylation at S129 in Synucleinopathies: What Have We Learned in the Last Decade? *Journal of Parkinson's Disease*, 6(1), 39-51.
- Outeiro, T. F., & Giorgini, F. (2006b). Yeast as a drug discovery platform in Huntington's and Parkinson's diseases. *Biotechnology Journal*, 1(3), 258-269.
- Outeiro, T. F., Klucken, J., Strathearn, K. E., Liu, F., Nguyen, P., Rochet, J.-C., Hyman, B. T., & McLean, P. J. (2006a). Small heat shock proteins protect against alpha-synuclein-induced toxicity and aggregation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 351(3), 631-638.
- Outeiro, T. F., & Lindquist, S. (2003). Yeast cells provide insight into alpha-synuclein biology and pathobiology. *Science (New York, N.Y.)*, 302(5651), 1772-1775.

P

- Pagan, F., Hebron, M., Valadez, E. H., Torres-Yaghi, Y., Huang, X., Mills, R. R., Wilmarth, B. M., Howard, H., Dunn, C., Carlson, A., Lawler, A., Rogers, S. L., Falconer, R. A., Ahn, J., Li, Z., & Moussa, C. (2016). Nilotinib Effects in Parkinson's disease and Dementia with Lewy bodies. *Journal of Parkinson's Disease*, 6(3), 503-517.
- Paganoni, S., Zhang, M., Quiroz Zarate, A., Jaffa, M., Yu, H., Cudkowicz, M. E., & Wills, A.-M. (2012). Uric acid levels predict survival in men with amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neurology*, 259(9), 1923-1928.
- Paisan-Ruiz, C., Lewis, P. A., & Singleton, A. B. (2013). LRRK2: cause, risk, and mechanism. *Journal of Parkinson's Disease*, 3(2), 85-103.
- Paladini, C. A., & Roper, J. (2014). Generating bursts (and pauses) in the dopamine midbrain neurons. *Neuroscience*, 282, 109-121.
- Pankratz, N., Wilk, J. B., Latourelle, J. C., DeStefano, A. L., Halter, C., Pugh, E. W., Doheny, K. F., Gusella, J. F., Nichols, W. C., Foroud, T., & Myers, R. H. (2009). Genomewide association study for susceptibility genes contributing to familial Parkinson disease. *Human Genetics*, 124(6), 593-605.
- Papp, M. I., Kahn, J. E., & Lantos, P. L. (1989). Glial cytoplasmic inclusions in the CNS of patients with multiple system atrophy (striatonigral degeneration, olivopontocerebellar atrophy and Shy-Drager syndrome). *Journal of the Neurological Sciences*, 94(1-3), 79-100.
- Park, H.-Y., Ryu, Y.-K., Go, J., Son, E., Kim, K.-S., & Kim, M. R. (2016). Palmitoyl Serotonin Inhibits L-dopa-induced Abnormal Involuntary Movements in the Mouse Parkinson Model. *Experimental Neurobiology*, 25(4), 174-184.
- Park, J.-S., Davis, R. L., & Sue, C. M. (2018). Mitochondrial Dysfunction in Parkinson's Disease: New Mechanistic Insights and Therapeutic Perspectives. *Current Neurology and Neuroscience Reports*, 18(5), 21.
- Park, J.-Y., & Lansbury, P. T. (2003). Beta-synuclein inhibits formation of alpha-synuclein protofibrils: a possible therapeutic strategy against Parkinson's disease. *Biochemistry*, 42(13), 3696-3700.

- Park, S. M., Jung, H. Y., Chung, K. C., Rhim, H., Park, J. H., & Kim, J. (2002a). Stress-induced aggregation profiles of GST-alpha-synuclein fusion proteins: role of the C-terminal acidic tail of alpha-synuclein in protein thermosolubility and stability. *Biochemistry*, 41(12), 4137–4146.
- Park, S. M., Jung, H. Y., Kim, H. O., Rhim, H., Paik, S. R., Chung, K. C., Park, J. H., & Kim, J. (2002b). Evidence that alpha-synuclein functions as a negative regulator of Ca(++)-dependent alpha-granule release from human platelets. *Blood*, 100(7), 2506–2514.
- Park, S. M., Jung, H. Y., Kim, T. D., Park, J. H., Yang, C.-H., & Kim, J. (2002c). Distinct roles of the N-terminal-binding domain and the C-terminal-solubilizing domain of alpha-synuclein, a molecular chaperone. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(32), 28512–28520.
- Parker, K. L., Lamichhane, D., Caetano, M. S., & Narayanan, N. S. (2013). Executive dysfunction in Parkinson's disease and timing deficits. *Frontiers in Integrative Neuroscience*, 7, 75.
- Parkkinen, L., Pirttilä, T., & Alafuzoff, I. (2008). Applicability of current staging/categorization of alpha-synuclein pathology and their clinical relevance. *Acta Neuropathologica*, 115(4), 399–407.
- Parkkinen, L., Soininen, H., & Alafuzoff, I. (2003). Regional distribution of alpha-synuclein pathology in unimpaired aging and Alzheimer disease. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 62(4), 363–367.
- Pasanen, P., Myllykangas, L., Siitonen, M., Raunio, A., Kaakkola, S., Lyytinen, J., Tienari, P. J., Poyhonen, M., & Paetau, A. (2014). Novel alpha-synuclein mutation A53E associated with atypical multiple system atrophy and Parkinson's disease-type pathology. *Neurobiology of Aging*, 35(9), 2180.e1-5.
- Paumier, K. L., Sukoff Rizzo, S. J., Berger, Z., Chen, Y., Gonzales, C., Kaftan, E., Li, L., Lotarski, S., Monaghan, M., Shen, W., Stolyar, P., Vasilyev, D., Zaleska, M., D Hirst, W., & Dunlop, J. (2013). Behavioral characterization of A53T mice reveals early and late stage deficits related to Parkinson's disease. *PLoS One*, 8(8), e70274.
- Pedrosa, D. J., & Timmermann, L. (2013). Review: management of Parkinson's disease. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 9, 321–340.
- Peng, X., Tehrani, R., Dietrich, P., Stefanis, L., & Perez, R. G. (2005). Alpha-synuclein activation of protein phosphatase 2A reduces tyrosine hydroxylase phosphorylation in dopaminergic cells. *Journal of Cell Science*, 118(Pt 15), 3523–3530.
- Peña-Oliver, Y., Buchman, V. L., Dalley, J. W., Robbins, T. W., Schumann, G., Ripley, T. L., King, S. L., & Stephens, D. N. (2012). Deletion of alpha-synuclein decreases impulsivity in mice. *Genes, Brain, and Behavior*, 11(2), 137–146.
- Pereira, D. J., McCarty, D. M., & Muzyczka, N. (1997). The adeno-associated virus (AAV) Rep protein acts as both a repressor and an activator to regulate AAV transcription during a productive infection. *Journal of Virology*, 71(2), 1079–1088.
- Perez, R. G., Waymire, J. C., Lin, E., Liu, J. J., Guo, F., & Zigmond, M. J. (2002). A role for alpha-synuclein in the regulation of dopamine biosynthesis. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 22(8), 3090–3099.
- Perrin, R. J., Woods, W. S., Clayton, D. F., & George, J. M. (2001). Exposure to long chain polyunsaturated fatty acids triggers rapid multimerization of synucleins. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(45), 41958–41962.
- Perrin, R. J., Woods, W. S., Clayton, D. F., & George, J. M. (2000). Interaction of human alpha-Synuclein and Parkinson's disease variants with phospholipids. Structural analysis using site-directed mutagenesis. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(44), 34393–34398.
- Peters, O. M., Millership, S., Shelkovernikova, T. A., Soto, I., Keeling, L., Hann, A., Marsh-Armstrong, N., Buchman, V. L., & Ninkina, N. (2012). Selective pattern of motor system damage in gamma-synuclein transgenic mice mirrors the respective pathology in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiology of Disease*, 48(1), 124–131.
- Peters, O. M., Shelkovernikova, T., Highley, J. R., Cooper-Knock, J., Hortobágyi, T., Troakes, C., Ninkina, N., & Buchman, V. L. (2015). Gamma-synuclein pathology in amyotrophic lateral sclerosis. *Annals of Clinical and Translational Neurology*, 2(1), 29–37.
- Petersen, K., Olesen, O. F., & Mikkelsen, J. D. (1999). Developmental expression of alpha-synuclein in rat hippocampus and cerebral cortex. *Neuroscience*, 91(2), 651–659.
- Petrovitch, H., Ross, G. W., Abbott, R. D., Sanderson, W. T., Sharp, D. S., Tanner, C. M., Masaki, K. H., Blanchette, P. L., Popper, J. S., Foley, D., Launer, L., & White, L. R. (2002). Plantation work and risk of Parkinson disease in a population-based longitudinal study. *Archives of Neurology*, 59(11), 1787–1792.
- Pezzoli, S., Cagnin, A., Bandmann, O., & Venneri, A. (2017). Structural and Functional Neuroimaging of Visual Hallucinations in Lewy Body Disease: A Systematic Literature Review. *Brain Sciences*, 7(7).
- Pfeiffer, R. F. (2011). Gastrointestinal dysfunction in Parkinson's disease. *Parkinsonism & Related Disorders*, 17(1), 10–15.
- Pillay, S., & Carette, J. E. (2017). Host determinants of adeno-associated viral vector entry. *Current Opinion in Virology*, 24, 124–131.

- Piltonen, M., Savolainen, M., Patrikainen, S., Baekelandt, V., Myohanen, T. T., & Mannisto, P. T. (2013). Comparison of motor performance, brain biochemistry and histology of two A30P alpha-synuclein transgenic mouse strains. *Neuroscience*, 231, 157–168.
- Pinhasov, A., Ilyin, S. E., Crooke, J., Amato, F. A., Vaidya, A. H., Rosenthal, D., Brenneman, D. E., & Malatynska, E. (2005). Different levels of gamma-synuclein mRNA in the cerebral cortex of dominant, neutral and submissive rats selected in the competition test. *Genes, Brain, and Behavior*, 4(1), 60–64.
- Plaas, M., Karis, A., Innos, J., Rebane, E., Baekelandt, V., Vaarmann, A., Luuk, H., Vasar, E., & Koks, S. (2008). Alpha-synuclein A30P point-mutation generates age-dependent nigrostriatal deficiency in mice. *Journal of Physiology and Pharmacology: An Official Journal of the Polish Physiological Society*, 59(2), 205–216.
- Platt, N. J., Gispert, S., Auburger, G., & Cragg, S. J. (2012). Striatal dopamine transmission is subtly modified in human A53Talpha-synuclein overexpressing mice. *PLoS One*, 7(5), e36397.
- Poewe, W., Seppi, K., Tanner, C. M., Halliday, G. M., Brundin, P., Volkman, J., Schrag, A.-E., & Lang, A. E. (2017). Parkinson disease. *Nature Reviews. Disease Primers*, 3, 17013.
- Pogorelov, V. M., Rodriguiz, R. M., Insko, M. L., Caron, M. G., & Wetsel, W. C. (2005). Novelty seeking and stereotypic activation of behavior in mice with disruption of the *Dat1* gene. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 30(10), 1818–1831.
- Politis, M., Loane, C., Wu, K., Brooks, D. J., & Piccini, P. (2011a). Serotonergic mediated body mass index changes in Parkinson's disease. *Neurobiology of Disease*, 43(3), 609–615.
- Politis, M., Oertel, W. H., Wu, K., Quinn, N. P., Pogorell, O., Brooks, D. J., Bjorklund, A., Lindvall, O., & Piccini, P. (2011b). Graft-induced dyskinesias in Parkinson's disease: High striatal serotonin/dopamine transporter ratio. *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*, 26(11), 1997–2003.
- Politis, M., Wu, K., Loane, C., Kiferle, L., Molloy, S., Brooks, D. J., & Piccini, P. (2010). Staging of serotonergic dysfunction in Parkinson's disease: an in vivo 11C-DASB PET study. *Neurobiology of Disease*, 40(1), 216–221.
- Politis, M., Wu, K., Loane, C., Quinn, N. P., Brooks, D. J., Oertel, W. H., Bjorklund, A., Lindvall, O., & Piccini, P. (2012). Serotonin neuron loss and nonmotor symptoms continue in Parkinson's patients treated with dopamine grafts. *Science Translational Medicine*, 4(128), 128ra41.
- Polymenidou, M., & Cleveland, D. W. (2012). Prion-like spread of protein aggregates in neurodegeneration. *The Journal of Experimental Medicine*, 209(5), 889–893.
- Polymeropoulos, M. H., Lavedan, C., Leroy, E., Ide, S. E., Dehejia, A., Dutra, A., Pike, B., Root, H., Rubenstein, J., Boyer, R., Stenroos, E. S., Chandrasekharappa, S., Athanassiadou, A., Papapetropoulos, T., Johnson, W. G., Lazzarini, A. M., Duvoisin, R. C., Di Iorio, G., Golbe, L. I., & Nussbaum, R. L. (1997). Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science (New York, N.Y.)*, 276(5321), 2045–2047.
- Postuma, R. B., Berg, D., Stern, M., Poewe, W., Olanow, C. W., Oertel, W., Obeso, J., Marek, K., Litvan, I., Lang, A. E., Halliday, G., Goetz, C. G., Gasser, T., Dubois, B., Chan, P., Bloem, B. R., Adler, C. H., & Deuschl, G. (2015). MDS clinical diagnostic criteria for Parkinson's disease. *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*, 30(12), 1591–1601.
- Postuma, R. B., Wolfson, C., Rajput, A., Stoessel, A. J., Martin, W. R. W., Suchowersky, O., Chouinard, S., Panisset, M., Jog, M. S., Grimes, D. A., Marras, C., & Lang, A. E. (2007). Is there seasonal variation in risk of Parkinson's disease? *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*, 22(8), 1097–1101.
- Pothakos, K., Kurz, M. J., & Lau, Y.-S. (2009). Restorative effect of endurance exercise on behavioral deficits in the chronic mouse model of Parkinson's disease with severe neurodegeneration. *BMC Neuroscience*, 10, 6.
- Pramstaller, P. P., Schlossmacher, M. G., Jacques, T. S., Scaravilli, F., Eskelson, C., Pepivani, I., Hedrich, K., Adel, S., Gonzales-McNeal, M., Hilker, R., Kramer, P. L., & Klein, C. (2005). Lewy body Parkinson's disease in a large pedigree with 77 Parkin mutation carriers. *Annals of Neurology*, 58(3), 411–422.
- Pronin, A. N., Morris, A. J., Surguchov, A., & Benovic, J. L. (2000). Synucleins are a novel class of substrates for G protein-coupled receptor kinases. *Journal of Biological Chemistry*, 275(34), 26515–26522.
- Proukakis, C., Dudzik, C. G., Brier, T., MacKay, D. S., Cooper, J. M., Millhauser, G. L., Houlden, H., & Schapira, A. H. (2013). A novel alpha-synuclein missense mutation in Parkinson disease. *Neurology*, 80(11), 1062–1064.
- Puig, M. V., Rose, J., Schmidt, R., & Freund, N. (2014). Dopamine modulation of learning and memory in the prefrontal cortex: insights from studies in primates, rodents, and birds. *Frontiers in Neural Circuits*, 8, 93.
- Pulkes, T., Choubtum, L., Chitphuk, S., Thakkinian, A., Pongpakdee, S., Kulkantrakorn, K., Hanchaiphiboolkul, S., Tiamkao, S., & Boonkongchuen, P. (2014). Glucocerebrosidase mutations in Thai patients with Parkinson's disease. *Parkinsonism & Related Disorders*, 20(9), 986–991.
- Purlyte, E., Dhekne, H. S., Sarhan, A. R., Gomez, R., Lis, P., Wightman, M., Martinez, T. N., Tonelli, F., Pfeffer, S. R., & Alessi, D. R. (2018). Rab29 activation of the Parkinson's disease-associated LRRK2 kinase. *The EMBO Journal*, 37(1), 1–18.

Q

Quik, M., O'Neill, M., & Perez, X. A. (2007). Nicotine neuroprotection against nigrostriatal damage: importance of the animal model. *Trends in Pharmacological Sciences*, 28(5), 229–235.

R

- Ramonet, D., Perier, C., Recasens, A., Dehay, B., Bove, J., Costa, V., Scorrano, L., & Vila, M. (2013). Optic atrophy 1 mediates mitochondria remodeling and dopaminergic neurodegeneration linked to complex I deficiency. *Cell Death and Differentiation*, 20(1), 77–85.
- Rasheed, N., Ahmad, A., Pandey, C. P., Chaturvedi, R. K., Lohani, M., & Palit, G. (2010). Differential response of central dopaminergic system in acute and chronic unpredictable stress models in rats. *Neurochemical Research*, 35(1), 22–32.
- Richfield, E. K., Thiruchelvam, M. J., Cory-Slechta, D. A., Wuertzer, C., Gainetdinov, R. R., Caron, M. G., Di Monte, D. A., & Federoff, H. J. (2002). Behavioral and neurochemical effects of wild-type and mutated human alpha-synuclein in transgenic mice. *Experimental Neurology*, 175(1), 35–48.
- Rietdijk, C. D., Perez-Pardo, P., Garssen, J., van Wezel, R. J. A., & Kraneveld, A. D. (2017). Exploring Braak's Hypothesis of Parkinson's Disease. *Frontiers in Neurology*, 8, 37.
- Roberts, H. L., & Brown, D. R. (2015). Seeking a mechanism for the toxicity of oligomeric α -synuclein. *Biomolecules*, 5(2), 282–305.
- Robertson, D. C., Schmidt, O., Ninkina, N., Jones, P. A., Sharkey, J., & Buchman, V. L. (2004). Developmental loss and resistance to MPTP toxicity of dopaminergic neurones in substantia nigra pars compacta of gamma-synuclein, alpha-synuclein and double alpha/gamma-synuclein null mutant mice. *Journal of Neurochemistry*, 89(5), 1126–1136.
- Rockenstein, E., Hansen, L. A., Mallory, M., Trojanowski, J. Q., Galasko, D., & Masliah, E. (2001). Altered expression of the synuclein family mRNA in Lewy body and Alzheimer's disease. *Brain Research*, 914(1–2), 48–56.
- Roosen, D. A., & Cookson, M. R. (2016). LRRK2 at the interface of autophagosomes, endosomes and lysosomes. *Molecular Neurodegeneration*, 11(1), 73.
- Rospigliosi, C. C., McClendon, S., Schmid, A. W., Ramlall, T. F., Barre, P., Lashuel, H. A., & Eliezer, D. (2009). E46K Parkinson's-linked mutation enhances C-terminal-to-N-terminal contacts in alpha-synuclein. *Journal of Molecular Biology*, 388(5), 1022–1032.
- Ross, G. W., Abbott, R. D., Petrovitch, H., Morens, D. M., Grandinetti, A., Tung, K. H., Tanner, C. M., Masaki, K. H., Blanchette, P. L., Curb, J. D., Popper, J. S., & White, L. R. (2000). Association of coffee and caffeine intake with the risk of Parkinson disease. *JAMA*, 283(20), 2674–2679.
- Rudenko, I. N., & Cookson, M. R. (2014). Heterogeneity of leucine-rich repeat kinase 2 mutations: genetics, mechanisms and therapeutic implications. *Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 11(4), 738–750.
- Ruiz, R., Biea, I. A., & Tabares, L. (2014). α -Synuclein A30P decreases neurodegeneration and increases synaptic vesicle release probability in CSP α -null mice. *Neuropharmacology*, 76 Pt A, 106–117.
- Rutherford, N. J., Moore, B. D., Golde, T. E., & Giasson, B. I. (2014). Divergent effects of the H50Q and G51D SNCA mutations on the aggregation of alpha-synuclein. *Journal of Neurochemistry*, 131(6), 859–867.

S

- Saha, A. R., Hill, J., Utton, M. A., Asuni, A. A., Ackerley, S., Grierson, A. J., Miller, C. C., Davies, A. M., Buchman, V. L., Anderton, B. H., & Hanger, D. P. (2004). Parkinson's disease alpha-synuclein mutations exhibit defective axonal transport in cultured neurons. *Journal of Cell Science*, 117(Pt 7), 1017–1024.
- Saigoh, K., Wang, Y. L., Suh, J. G., Yamanishi, T., Sakai, Y., Kiyosawa, H., Harada, T., Ichihara, N., Wakana, S., Kikuchi, T., & Wada, K. (1999). Intragenic deletion in the gene encoding ubiquitin carboxy-terminal hydrolase in gad mice. *Nature Genetics*, 23(1), 47–51.
- Saito, Y., Kawai, M., Inoue, K., Sasaki, R., Arai, H., Nanba, E., Kuzuhara, S., Ihara, Y., Kanazawa, I., & Murayama, S. (2000). Widespread expression of alpha-synuclein and tau immunoreactivity in Hallervorden-Spatz syndrome with protracted clinical course. *Journal of the Neurological Sciences*, 177(1), 48–59.

- Saito, Y., Kawashima, A., Ruberu, N. N., Fujiwara, H., Koyama, S., Sawabe, M., Arai, T., Nagura, H., Yamanouchi, H., Hasegawa, M., Iwatsubo, T., & Murayama, S. (2003). Accumulation of phosphorylated alpha-synuclein in aging human brain. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 62(6), 644–654.
- Salahpour, A., Ramsey, A. J., Medvedev, I. O., Kile, B., Sotnikova, T. D., Holmstrand, E., Ghisi, V., Nicholls, P. J., Wong, L., Murphy, K., Sesack, S. R., Wightman, R. M., Gainetdinov, R. R., & Caron, M. G. (2008). Increased amphetamine-induced hyperactivity and reward in mice overexpressing the dopamine transporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(11), 4405–4410.
- Salamone, J. D., Collins-Praino, L. E., Pardo, M., Podurgiel, S. J., Baqi, Y., Muller, C. E., Schwarzschild, M. A., & Correa, M. (2013). Conditional neural knockout of the adenosine A(2A) receptor and pharmacological A(2A) antagonism reduce pilocarpine-induced tremulous jaw movements: studies with a mouse model of parkinsonian tremor. *European Neuropsychopharmacology: The Journal of the European College of Neuropsychopharmacology*, 23(8), 972–977.
- Samii, A., Nutt, J. G., & Ransom, B. R. (2004). Parkinson's disease. *Lancet (London, England)*, 363(9423), 1783–1793.
- Samuel, F., Flavin, W. P., Iqbal, S., Pacelli, C., Sri Renganathan, S. D., Trudeau, L.-E., Campbell, E. M., Fraser, P. E., & Tandon, A. (2016). Effects of Serine 129 Phosphorylation on alpha-Synuclein Aggregation, Membrane Association, and Internalization. *The Journal of Biological Chemistry*, 291(9), 4374–4385.
- Sanchez-Danes, A., Richaud-Patin, Y., Carballo-Carbajal, I., Jimenez-Delgado, S., Caig, C., Mora, S., Di Guglielmo, C., Ezquerro, M., Patel, B., Giralt, A., Canals, J. M., Memo, M., Alberch, J., Lopez-Barneo, J., Vila, M., Cuervo, A. M., Tolosa, E., Consiglio, A., & Raya, A. (2012). Disease-specific phenotypes in dopamine neurons from human iPS-based models of genetic and sporadic Parkinson's disease. *EMBO Molecular Medicine*, 4(5), 380–395.
- Sangchot, P., Sharma, S., Chetsawang, B., Porter, J., Govitrapong, P., & Ebadi, M. (2002). Deferoxamine attenuates iron-induced oxidative stress and prevents mitochondrial aggregation and alpha-synuclein translocation in SK-N-SH cells in culture. *Developmental Neuroscience*, 24(2–3), 143–153.
- Sardi, S. P., Cedarbaum, J. M., & Brundin, P. (2018). Targeted Therapies for Parkinson's Disease: From Genetics to the Clinic. *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*, 33(5), 684–696.
- Satake, W., Nakabayashi, Y., Mizuta, I., Hirota, Y., Ito, C., Kubo, M., Kawaguchi, T., Tsunoda, T., Watanabe, M., Takeda, A., Tomiyama, H., Nakashima, K., Hasegawa, K., Obata, F., Yoshikawa, T., Kawakami, H., Sakoda, S., Yamamoto, M., Hattori, N., ... Toda, T. (2009). Genome-wide association study identifies common variants at four loci as genetic risk factors for Parkinson's disease. *Nature Genetics*, 41(12), 1303–1307.
- Sato, H., Kato, T., & Arawaka, S. (2013). The role of Ser129 phosphorylation of alpha-synuclein in neurodegeneration of Parkinson's disease: a review of in vivo models. *Reviews in the Neurosciences*, 24(2), 115–123.
- Schapira, A. H. V., & Tolosa, E. (2010). Molecular and clinical prodrome of Parkinson disease: implications for treatment. *Nature Reviews. Neurology*, 6(6), 309–317.
- Schenk, D. B., Koller, M., Ness, D. K., Griffith, S. G., Grundman, M., Zago, W., Soto, J., Atiee, G., Ostrowitzki, S., & Kinney, G. G. (2017). First-in-human assessment of PRX002, an anti-alpha-synuclein monoclonal antibody, in healthy volunteers. *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*, 32(2), 211–218.
- Scherman, D., Desnos, C., Darchen, F., Pollak, P., Javoy-Agid, F., & Agid, Y. (1989). Striatal dopamine deficiency in Parkinson's disease: role of aging. *Annals of Neurology*, 26(4), 551–557.
- Schiemann, J., Schlaudraff, F., Klose, V., Bingmer, M., Seino, S., Magill, P. J., Zaghoul, K. A., Schneider, G., Liss, B., & Roeper, J. (2012). K-ATP channels in dopamine substantia nigra neurons control bursting and novelty-induced exploration. *Nature Neuroscience*, 15(9), 1272–1280.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.-Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., & Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 676–682.
- Schneider, B. L., Seehus, C. R., Capowski, E. E., Aebischer, P., Zhang, S. C., & Svendsen, C. N. (2007). Overexpression of alpha-synuclein in human neural progenitors leads to specific changes in fate and differentiation. *Human Molecular Genetics*, 16(6), 651–666.
- Schoch, K. M., & Miller, T. M. (2017). Antisense Oligonucleotides: Translation from Mouse Models to Human Neurodegenerative Diseases. *Neuron*, 94(6), 1056–1070.
- Scholz, S. W., Houlden, H., Schulte, C., Sharma, M., Li, A., Berg, D., Melchers, A., Paudel, R., Gibbs, J. R., Simon-Sanchez, J., Paisan-Ruiz, C., Bras, J., Ding, J., Chen, H., Traynor, B. J., Arepalli, S., Zonozi, R. R., Revesz, T., Holton, J., ... Gasser, T. (2009). SNCA variants are associated with increased risk for multiple system atrophy. *Annals of Neurology*, 65(5), 610–614.
- Schroeter, S., Apparsundaram, S., Wiley, R. G., Miner, L. H., Sesack, S. R., & Blakely, R. D. (2000). Immunolocalization of the cocaine- and antidepressant-sensitive l-norepinephrine transporter. *The Journal of Comparative Neurology*, 420(2), 211–232.

- Schulte-Herbrüggen, O., Vogt, M. A., Hörtnagl, H., Gass, P., & Hellweg, R. (2012). Pramipexole is active in depression tests and modulates monoaminergic transmission, but not brain levels of BDNF in mice. *European Journal of Pharmacology*, 677(1–3), 77–86.
- Schwarzschild, M. A., Ascherio, A., Beal, M. F., Cudkowicz, M. E., Curhan, G. C., Hare, J. M., Hooper, D. C., Kieburtz, K. D., Macklin, E. A., Oakes, D., Rudolph, A., Shoulson, I., Tennis, M. K., Espay, A. J., Gartner, M., Hung, A., Bwala, G., Lenehan, R., Encarnacion, E., ... Eaton, K. (2014). Inosine to increase serum and cerebrospinal fluid urate in Parkinson disease: a randomized clinical trial. *JAMA Neurology*, 71(2), 141–150.
- Scoles, D. R., Meera, P., Schneider, M. D., Paul, S., Dansithong, W., Figueroa, K. P., Hung, G., Rigo, F., Bennett, C. F., Otis, T. S., & Pulst, S. M. (2017). Antisense oligonucleotide therapy for spinocerebellar ataxia type 2. *Nature*, 544(7650), 362–366.
- Scoles, D. R., Minikel, E. V., & Pulst, S. M. (2019). Antisense oligonucleotides: A primer. *Neurology. Genetics*, 5(2), e323.
- Scoles, D. R., & Pulst, S. M. (2018). Oligonucleotide therapeutics in neurodegenerative diseases. *RNA Biology*, 15(6), 707–714.
- Senior, S. L., Ninkina, N., Deacon, R., Bannerman, D., Buchman, V. L., Cragg, S. J., & Wade-Martins, R. (2008). Increased striatal dopamine release and hyperdopaminergic-like behaviour in mice lacking both alpha-synuclein and gamma-synuclein. *The European Journal of Neuroscience*, 27(4), 947–957.
- Seol, W., Nam, D., & Son, I. (2019). Rab GTPases as Physiological Substrates of LRRK2 Kinase. *Experimental Neurobiology*, 28(2), 134–145.
- Serpell, L. C., Berriman, J., Jakes, R., Goedert, M., & Crowther, R. A. (2000). Fiber diffraction of synthetic alpha-synuclein filaments shows amyloid-like cross-beta conformation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(9), 4897–4902.
- Setsuie, R., Wang, Y.-L., Mochizuki, H., Osaka, H., Hayakawa, H., Ichihara, N., Li, H., Furuta, A., Sano, Y., Sun, Y.-J., Kwon, J., Kabuta, T., Yoshimi, K., Aoki, S., Mizuno, Y., Noda, M., & Wada, K. (2007). Dopaminergic neuronal loss in transgenic mice expressing the Parkinson's disease-associated UCH-L1 I93M mutant. *Neurochemistry International*, 50(1), 119–129.
- Shahmoradian, S. H., Lewis, A. J., Genoud, C., Hench, J., Moors, T. E., Navarro, P. P., Castaño-Díez, D., Schweighauser, G., Graff-Meyer, A., Goldie, K. N., Sütterlin, R., Huisman, E., Ingrassia, A., Gier, Y. de, Rozemuller, A. J. M., Wang, J., Paepe, A. De, Erny, J., Staempfli, A., ... Lauer, M. E. (2019). Lewy pathology in Parkinson's disease consists of crowded organelles and lipid membranes. *Nature Neuroscience*, 22(7), 1099–1109.
- Sharma, N., McLean, P. J., Kawamata, H., Irizarry, M. C., & Hyman, B. T. (2001). Alpha-synuclein has an altered conformation and shows a tight intermolecular interaction with ubiquitin in Lewy bodies. *Acta Neuropathologica*, 102(4), 329–334.
- Sherer, T. B., Kim, J. H., Betarbet, R., & Greenamyre, J. T. (2003). Subcutaneous rotenone exposure causes highly selective dopaminergic degeneration and alpha-synuclein aggregation. *Experimental Neurology*, 179(1), 9–16.
- Shi, W.-X. (2009). Electrophysiological characteristics of dopamine neurons: a 35-year update. *Journal of Neural Transmission. Supplementum*, 73, 103–119.
- Shimura, H., Hattori, N., Kubo, S. i, Mizuno, Y., Asakawa, S., Minoshima, S., Shimizu, N., Iwai, K., Chiba, T., Tanaka, K., & Suzuki, T. (2000). Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. *Nature Genetics*, 25(3), 302–305.
- Shimura, H., Hattori, N., Kubo, S., Yoshikawa, M., Kitada, T., Matsumine, H., Asakawa, S., Minoshima, S., Yamamura, Y., Shimizu, N., & Mizuno, Y. (1999). Immunohistochemical and subcellular localization of Parkin protein: absence of protein in autosomal recessive juvenile parkinsonism patients. *Annals of Neurology*, 45(5), 668–672.
- Siderowf, A., Aarsland, D., Mollenhauer, B., Goldman, J. G., & Ravina, B. (2018). Biomarkers for cognitive impairment in Lewy body disorders: Status and relevance for clinical trials. *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*, 33(4), 528–536.
- Sidhu, A., Wersinger, C., Moussa, C. E.-H., & Vernier, P. (2004b). The role of alpha-synuclein in both neuroprotection and neurodegeneration. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1035, 250–270.
- Sidhu, A., Wersinger, C., & Vernier, P. (2004a). alpha-Synuclein regulation of the dopaminergic transporter: a possible role in the pathogenesis of Parkinson's disease. *FEBS Letters*, 565(1–3), 1–5.
- Simon-Sanchez, J., Scholz, S., Matarin, M. del M., Fung, H.-C., Hernandez, D., Gibbs, J. R., Britton, A., Hardy, J., & Singleton, A. (2008). Genomewide SNP assay reveals mutations underlying Parkinson disease. *Human Mutation*, 29(2), 315–322.
- Singleton, A. B., Farrer, M., Johnson, J., Singleton, A., Hague, S., Kachergus, J., Hulihan, M., Peuralinna, T., Dutra, A., Nussbaum, R., Lincoln, S., Crawley, A., Hanson, M., Maraganore, D., Adler, C., Cookson, M. R., Muentner, M., Baptista, M., Miller, D., ... Gwinn-Hardy, K. (2003). alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science (New York, N.Y.)*, 302(5646), 841.

- Siomi, H., & Siomi, M. C. (2009). On the road to reading the RNA-interference code. *Nature*, 457(7228), 396–404.
- Smith, C. I. E., & Zain, R. (2019). Therapeutic Oligonucleotides: State of the Art. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 59, 605–630.
- Smith, L. K., Jadavji, N. M., Colwell, K. L., Katrina Pehudoff, S., & Metz, G. A. (2008). Stress accelerates neural degeneration and exaggerates motor symptoms in a rat model of Parkinson's disease. *The European Journal of Neuroscience*, 27(8), 2133–2146.
- Smith, W. W., Pei, Z., Jiang, H., Dawson, V. L., Dawson, T. M., & Ross, C. A. (2006). Kinase activity of mutant LRRK2 mediates neuronal toxicity. *Nature Neuroscience*, 9(10), 1231–1233.
- Snyder, H., Mensah, K., Hsu, C., Hashimoto, M., Surgucheva, I. G., Festoff, B., Surguchov, A., Masliah, E., Matouschek, A., & Wolozin, B. (2005). beta-Synuclein reduces proteasomal inhibition by alpha-synuclein but not gamma-synuclein. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(9), 7562–7569.
- Soper, J. H., Roy, S., Stieber, A., Lee, E., Wilson, R. B., Trojanowski, J. Q., Burd, C. G., & Lee, V. M.-Y. (2008). Alpha-synuclein-induced aggregation of cytoplasmic vesicles in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell*, 19(3), 1093–1103.
- Sossi, V., de la Fuente-Fernández, R., Nandhagopal, R., Schulzer, M., McKenzie, J., Ruth, T. J., Aasly, J. O., Farrer, M. J., Wszolek, Z. K., & Stoessl, J. A. (2010). Dopamine turnover increases in asymptomatic LRRK2 mutations carriers. *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*, 25(16), 2717–2723.
- Sotiriou, E., Vassilatis, D. K., Vila, M., & Stefanis, L. (2010). Selective noradrenergic vulnerability in alpha-synuclein transgenic mice. *Neurobiology of Aging*, 31(12), 2103–2114.
- Sousa, V. L., Bellani, S., Giannandrea, M., Yousuf, M., Valtorta, F., Meldolesi, J., & Chiergatti, E. (2009). {alpha}-synuclein and its A30P mutant affect actin cytoskeletal structure and dynamics. *Molecular Biology of the Cell*, 20(16), 3725–3739.
- Southwell, A. L., Skotte, N. H., Bennett, C. F., & Hayden, M. R. (2012). Antisense oligonucleotide therapeutics for inherited neurodegenerative diseases. *Trends in Molecular Medicine*, 18(11), 634–643.
- Souza, J. M., Giasson, B. I., Lee, V. M., & Ischiropoulos, H. (2000). Chaperone-like activity of synucleins. *FEBS Letters*, 474(1), 116–119.
- Spillantini, M. G., Crowther, R. A., Jakes, R., Cairns, N. J., Lantos, P. L., & Goedert, M. (1998b). Filamentous alpha-synuclein inclusions link multiple system atrophy with Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Neuroscience Letters*, 251(3), 205–208.
- Spillantini, M. G., Crowther, R. A., Jakes, R., Hasegawa, M., & Goedert, M. (1998a). alpha-Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with lewy bodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(11), 6469–6473.
- Spillantini, M. G., Divane, A., & Goedert, M. (1995). Assignment of human alpha-synuclein (SNCA) and beta-synuclein (SNCB) genes to chromosomes 4q21 and 5q35. *Genomics*, 27(2), 379–381.
- Spillantini, M. G., Schmidt, M. L., Lee, V. M., Trojanowski, J. Q., Jakes, R., & Goedert, M. (1997). Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature*, 388(6645), 839–840.
- Spillantini, M. G., & Goedert, M. (2018). Neurodegeneration and the ordered assembly of alpha-synuclein. *Cell and Tissue Research*, 373(1), 137–148.
- Spira, P. J., Sharpe, D. M., Halliday, G., Cavanagh, J., & Nicholson, G. A. (2001). Clinical and pathological features of a Parkinsonian syndrome in a family with an Ala53Thr alpha-synuclein mutation. *Annals of Neurology*, 49(3), 313–319.
- St Louis, E. K., Boeve, A. R., & Boeve, B. F. (2017). REM Sleep Behavior Disorder in Parkinson's Disease and Other Synucleinopathies. *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*, 32(5), 645–658.
- St Louis, E. K., & Boeve, B. F. (2017). REM Sleep Behavior Disorder: Diagnosis, Clinical Implications, and Future Directions. *Mayo Clinic Proceedings*, 92(11), 1723–1736.
- Stefanis, L. (2012). alpha-Synuclein in Parkinson's disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(2), a009399.
- Steger, M., Diez, F., Dhekne, H. S., Lis, P., Nirujogi, R. S., Karayel, O., Tonelli, F., Martinez, T. N., Lorentzen, E., Pfeffer, S. R., Alessi, D. R., & Mann, M. (2017). Systematic proteomic analysis of LRRK2-mediated Rab GTPase phosphorylation establishes a connection to ciliogenesis. *ELife*, 6.
- Steger, M., Tonelli, F., Ito, G., Davies, P., Trost, M., Vetter, M., Wachter, S., Lorentzen, E., Duddy, G., Wilson, S., Baptista, M. A., Fiske, B. K., Fell, M. J., Morrow, J. A., Reith, A. D., Alessi, D. R., & Mann, M. (2016). Phosphoproteomics reveals that Parkinson's disease kinase LRRK2 regulates a subset of Rab GTPases. *ELife*, 5.
- Stewart, T., Sossi, V., Aasly, J. O., Wszolek, Z. K., Uitti, R. J., Hasegawa, K., Yokoyama, T., Zabetian, C. P., Leverenz, J. B., Stoessl, A. J., Wang, Y., Ghingina, C., Liu, C., Cain, K. C., Auinger, P., Kang, U. J., Jensen, P. H., Shi, M., & Zhang, J. (2015). Phosphorylated alpha-synuclein in Parkinson's disease: correlation depends on disease severity. *Acta Neuropathologica Communications*, 3, 7.
- Stoker, T. B., Torsney, K. M., & Barker, R. A. (2018). *Pathological Mechanisms and Clinical Aspects of GBA1 Mutation-Associated Parkinson's Disease* (Thomas B Stoker & J. C. Greenland (eds.)).

- Strobbe, D., Robinson, A. A., Harvey, K., Rossi, L., Ferraina, C., de Biase, V., Rodolfo, C., Harvey, R. J., & Campanella, M. (2018). Distinct Mechanisms of Pathogenic DJ-1 Mutations in Mitochondrial Quality Control. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 11, 68.
- Sulzer, D. (2010). Clues to how alpha-synuclein damages neurons in Parkinson's disease. *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*, 25 Suppl 1, S27-31.
- Summerton, J. E. (2007). Morpholino, siRNA, and S-DNA compared: impact of structure and mechanism of action on off-target effects and sequence specificity. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 7(7), 651-660.
- Sung, Y.-H., & Eliezer, D. (2006). Secondary structure and dynamics of micelle bound beta- and gamma-synuclein. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, 15(5), 1162-1174.
- Surgucheva, I. G., Sivak, J. M., Fini, M. E., Palazzo, R. E., & Surguchov, A. P. (2003). Effect of gamma-synuclein overexpression on matrix metalloproteinases in retinoblastoma Y79 cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 410(1), 167-176.
- Surgucheva, I., Gunewardena, S., Rao, H. S., & Surguchov, A. (2013). Cell-specific post-transcriptional regulation of gamma-synuclein gene by micro-RNAs. *PLoS One*, 8(9), e73786.
- Surgucheva, I., McMahan, B., Ahmed, F., Tomarev, S., Wax, M. B., & Surguchov, A. (2002). Synucleins in glaucoma: Implication of γ -synuclein in glaucomatous alterations in the optic nerve. *Journal of Neuroscience Research*, 68(1), 97-106.
- Surgucheva, I., McMahan, B., & Surguchov, A. (2006). gamma-synuclein has a dynamic intracellular localization. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 63(8), 447-458.
- Surgucheva, I., Newell, K. L., Burns, J., & Surguchov, A. (2014). New α - and γ -synuclein immunopathological lesions in human brain. *Acta Neuropathologica Communications*, 2, 132.
- Surgucheva, I., Ninkina, N., Buchman, V. L., Grasing, K., & Surguchov, A. (2005a). Protein aggregation in retinal cells and approaches to cell protection. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 25(6), 1051-1066.
- Surgucheva, I., Park, B. C., Yue, B. Y. J. T., Tomarev, S., & Surguchov, A. (2005b). Interaction of myocilin with γ -synuclein affects its secretion and aggregation. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 25(6), 1009-1033.
- Surgucheva, I., Sharov, V. S., & Surguchov, A. (2012). gamma-Synuclein: seeding of alpha-synuclein aggregation and transmission between cells. *Biochemistry*, 51(23), 4743-4754.
- Surgucheva, I., & Surguchov, A. (2008). Gamma-synuclein: cell-type-specific promoter activity and binding to transcription factors. *Journal of Molecular Neuroscience: MN*, 35(3), 267-271.
- Surgucheva, I., Weisman, A. D., Goldberg, J. L., Shnyra, A., & Surguchov, A. (2008). Gamma-synuclein as a marker of retinal ganglion cells. *Molecular Vision*, 14, 1540-1548.
- Surguchov, A. (2013). Synucleins: are they two-edged swords? *Journal of Neuroscience Research*, 91(2), 161-166.
- Surguchov, A., McMahan, B., Masliah, E., & Surgucheva, I. (2001b). Synucleins in ocular tissues. *Journal of Neuroscience Research*, 65(1), 68-77.
- Surguchov, A., Surgucheva, I., Solessio, E., & Baehr, W. (1999). Synoretin--A new protein belonging to the synuclein family. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 13(2), 95-103.
- Surguchov, A. (2008). Molecular and cellular biology of synucleins. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 270, 225-317.
- Surguchov, A., Palazzo, R. E., & Surgucheva, I. (2001a). Gamma synuclein: Subcellular localization in neuronal and non-neuronal cells and effect on signal transduction. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 49(4), 218-228.
- Surguchov, A., Surgucheva, I., Sharma, M., Sharma, R., & Singh, V. (2017). Pore-Forming Proteins as Mediators of Novel Epigenetic Mechanism of Epilepsy. *Frontiers in Neurology*, 8, 3.
- Surmeier, D. J., Guzman, J. N., Sanchez-Padilla, J., & Schumacker, P. T. (2011). The role of calcium and mitochondrial oxidant stress in the loss of substantia nigra pars compacta dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Neuroscience*, 198, 221-231.
- Suzuki, K., Iseki, E., Togo, T., Yamaguchi, A., Katsuse, O., Katsuyama, K., Kanzaki, S., Shiozaki, K., Kawanishi, C., Yamashita, S., Tanaka, Y., Yamanaka, S., & Hirayasu, Y. (2007). Neuronal and glial accumulation of alpha- and beta-synucleins in human lipidoses. *Acta Neuropathologica*, 114(5), 481-489.
- Svensson, E., Horvath-Puho, E., Thomsen, R. W., Djurhuus, J. C., Pedersen, L., Borghammer, P., & Sorensen, H. T. (2015). Vagotomy and subsequent risk of Parkinson's disease. *Annals of Neurology*, 78(4), 522-529.

T

- Taipa, R., Pinho, J., & Melo-Pires, M. (2012). Clinico-pathological correlations of the most common neurodegenerative dementias. *Frontiers in Neurology*, 3, 68.
- Takahashi, H., & Wakabayashi, K. (2001). The cellular pathology of Parkinson's disease. *Neuropathology: Official Journal of the Japanese Society of Neuropathology*, 21(4), 315-322.

- Takeda, A., Hasegawa, T., Matsuzaki-Kobayashi, M., Sugeno, N., Kikuchi, A., Itoyama, Y., & Furukawa, K. (2006). Mechanisms of neuronal death in synucleinopathy. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, 2006(3), 19365.
- Tan, L. C., Koh, W.-P., Yuan, J.-M., Wang, R., Au, W.-L., Tan, J. H., Tan, E.-K., & Yu, M. C. (2008). Differential effects of black versus green tea on risk of Parkinson's disease in the Singapore Chinese Health Study. *American Journal of Epidemiology*, 167(5), 553–560.
- Tanji, K., Mori, F., Mimura, J., Itoh, K., Kakita, A., Takahashi, H., & Wakabayashi, K. (2010). Proteinase K-resistant alpha-synuclein is deposited in presynapses in human Lewy body disease and A53T alpha-synuclein transgenic mice. *Acta Neuropathologica*, 120(2), 145–154.
- Tanner, C. M., Ross, G. W., Jewell, S. A., Hauser, R. A., Jankovic, J., Factor, S. A., Bressman, S., Deligtisch, A., Marras, C., Lyons, K. E., Bhudhikanok, G. S., Roucoux, D. F., Meng, C., Abbott, R. D., & Langston, J. W. (2009). Occupation and risk of parkinsonism: a multicenter case-control study. *Archives of Neurology*, 66(9), 1106–1113.
- Tatura, R., Kraus, T., Giese, A., Arzberger, T., Buchholz, M., Hoglinger, G., & Muller, U. (2016). Parkinson's disease: SNCA-, PARK2-, and LRRK2- targeting microRNAs elevated in cingulate gyrus. *Parkinsonism & Related Disorders*, 33, 115–121.
- Taymans, J.-M., Vandenberghe, L. H., Haute, C. Van Den, Thiry, I., Deroose, C. M., Mortelmans, L., Wilson, J. M., Debyser, Z., & Baekelandt, V. (2007). Comparative analysis of adeno-associated viral vector serotypes 1, 2, 5, 7, and 8 in mouse brain. *Human Gene Therapy*, 18(3), 195–206.
- Temel, Y., Kessels, A., Tan, S., Topdag, A., Boon, P., & Visser-Vandewalle, V. (2006). Behavioural changes after bilateral subthalamic stimulation in advanced Parkinson disease: a systematic review. *Parkinsonism & Related Disorders*, 12(5), 265–272.
- Thacker, E. L., O'Reilly, E. J., Weisskopf, M. G., Chen, H., Schwarzschild, M. A., McCullough, M. L., Calle, E. E., Thun, M. J., & Ascherio, A. (2007). Temporal relationship between cigarette smoking and risk of Parkinson disease. *Neurology*, 68(10), 764–768.
- Thayanidhi, N., Helm, J. R., Nycz, D. C., Bentley, M., Liang, Y., & Hay, J. C. (2010). Alpha-synuclein delays endoplasmic reticulum (ER)-to-Golgi transport in mammalian cells by antagonizing ER/Golgi SNAREs. *Molecular Biology of the Cell*, 21(11), 1850–1863.
- Thiel, K. W., & Giangrande, P. H. (2009). Therapeutic applications of DNA and RNA aptamers. *Oligonucleotides*, 19(3), 209–222.
- Thiruchelvam, M. J., Powers, J. M., Cory-Slechta, D. A., & Richfield, E. K. (2004). Risk factors for dopaminergic neuron loss in human alpha-synuclein transgenic mice. *The European Journal of Neuroscience*, 19(4), 845–854.
- Tong, Y., Yamaguchi, H., Giaime, E., Boyle, S., Kopan, R., Kelleher, R. J. 3rd, & Shen, J. (2010). Loss of leucine-rich repeat kinase 2 causes impairment of protein degradation pathways, accumulation of alpha-synuclein, and apoptotic cell death in aged mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(21), 9879–9884.
- Torres, G. E., Carneiro, A., Seamans, K., Fiorentini, C., Sweeney, A., Yao, W.-D., & Caron, M. G. (2003). Oligomerization and trafficking of the human dopamine transporter. Mutational analysis identifies critical domains important for the functional expression of the transporter. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(4), 2731–2739.
- Tousi, B. (2017). Diagnosis and Management of Cognitive and Behavioral Changes in Dementia With Lewy Bodies. *Current Treatment Options in Neurology*, 19(11), 42.
- Tsigelny, I. F., Bar-On, P., Sharikov, Y., Crews, L., Hashimoto, M., Miller, M. A., Keller, S. H., Platoshyn, O., Yuan, J. X. J., & Masliah, E. (2007). Dynamics of α -synuclein aggregation and inhibition of pore-like oligomer development by β -synuclein. *FEBS Journal*, 274(7), 1862–1877.
- Tsigelny, I. F., Crews, L., Desplats, P., Shaked, G. M., Sharikov, Y., Mizuno, H., Spencer, B., Rockenstein, E., Trejo, M., Platoshyn, O., Yuan, J. X.-J., & Masliah, E. (2008). Mechanisms of hybrid oligomer formation in the pathogenesis of combined Alzheimer's and Parkinson's diseases. *PLoS One*, 3(9), e3135.
- Tsigelny, I. F., Sharikov, Y., Wrasidlo, W., Gonzalez, T., Desplats, P. A., Crews, L., Spencer, B., & Masliah, E. (2012). Role of alpha-synuclein penetration into the membrane in the mechanisms of oligomer pore formation. *The FEBS Journal*, 279(6), 1000–1013.
- Tsika, E., Moysidou, M., Guo, J., Cushman, M., Gannon, P., Sandaltzopoulos, R., Giasson, B. I., Krainc, D., Ischiropoulos, H., & Mazzulli, J. R. (2010). Distinct region-specific alpha-synuclein oligomers in A53T transgenic mice: implications for neurodegeneration. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 30(9), 3409–3418.
- Tu, P. H., Galvin, J. E., Baba, M., Giasson, B., Tomita, T., Leight, S., Nakajo, S., Iwatsubo, T., Trojanowski, J. Q., & Lee, V. M. (1998). Glial cytoplasmic inclusions in white matter oligodendrocytes of multiple system atrophy brains contain insoluble alpha-synuclein. *Annals of Neurology*, 44(3), 415–422.

U

- Ubhi, K., Rockenstein, E., Kragh, C., Inglis, C., Spencer, B., Michael, S., Mante, M., Adame, A., Galasko, D., & Masliah, E. (2014). Widespread microRNA dysregulation in multiple system atrophy - disease-related alteration in miR-96. *The European Journal of Neuroscience*, 39(6), 1026–1041.
- Ulmer, T. S., & Bax, A. (2005a). Comparison of structure and dynamics of micelle-bound human alpha-synuclein and Parkinson disease variants. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(52), 43179–43187.
- Ulmer, T. S., Bax, A., Cole, N. B., & Nussbaum, R. L. (2005b). Structure and dynamics of micelle-bound human alpha-synuclein. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(10), 9595–9603.
- Ulusoy, A., Bjorklund, T., Buck, K., & Kirik, D. (2012). Dysregulated dopamine storage increases the vulnerability to alpha-synuclein in nigral neurons. *Neurobiology of Disease*, 47(3), 367–377.
- Ulusoy, A., Decressac, M., Kirik, D., & Björklund, A. (2010). Viral vector-mediated overexpression of α -synuclein as a progressive model of Parkinson's disease. *Progress in Brain Research*, 184, 89–111.
- Unger, E. L., Eve, D. J., Perez, X. A., Reichenbach, D. K., Xu, Y., Lee, M. K., & Andrews, A. M. (2006). Locomotor hyperactivity and alterations in dopamine neurotransmission are associated with overexpression of A53T mutant human alpha-synuclein in mice. *Neurobiology of Disease*, 21(2), 431–443.
- Utton, M. A., Noble, W. J., Hill, J. E., Anderton, B. H., & Hanger, D. P. (2005). Molecular motors implicated in the axonal transport of tau and alpha-synuclein. *Journal of Cell Science*, 118(Pt 20), 4645–4654.
- Uversky, V. N. (2007). Neuropathology, biochemistry, and biophysics of alpha-synuclein aggregation. *Journal of Neurochemistry*, 103(1), 17–37.
- Uversky, V. N., Gillespie, J. R., & Fink, A. L. (2000). Why are “natively unfolded” proteins unstructured under physiologic conditions? *Proteins*, 41(3), 415–427.
- Uversky, V. N., Lee, H. J., Li, J., Fink, A. L., & Lee, S. J. (2001). Stabilization of partially folded conformation during alpha-synuclein oligomerization in both purified and cytosolic preparations. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(47), 43495–43498.
- Uversky, V. N., Li, J., Souillac, P., Millett, I. S., Doniach, S., Jakes, R., Goedert, M., & Fink, A. L. (2002). Biophysical properties of the synucleins and their propensities to fibrillate: Inhibition of α -synuclein assembly by β - and γ -synucleins. *Journal of Biological Chemistry*, 277(14), 11970–11978.

V

- van der Putten, H., Wiederhold, K. H., Probst, A., Barbieri, S., Mistl, C., Danner, S., Kauffmann, S., Hofele, K., Spooren, W. P., Ruegg, M. A., Lin, S., Caroni, P., Sommer, B., Tolnay, M., & Bilbe, G. (2000). Neuropathology in mice expressing human alpha-synuclein. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 20(16), 6021–6029.
- Vann Jones, S. A., & O'Brien, J. T. (2014). The prevalence and incidence of dementia with Lewy bodies: a systematic review of population and clinical studies. *Psychological Medicine*, 44(4), 673–683.
- Velayudhan, L., Ffytche, D., Ballard, C., & Aarsland, D. (2017). New Therapeutic Strategies for Lewy Body Dementias. *Current Neurology and Neuroscience Reports*, 17(9), 68.
- Venda, L. L., Cragg, S. J., Buchman, V. L., & Wade-Martins, R. (2010). alpha-Synuclein and dopamine at the crossroads of Parkinson's disease. *Trends in Neurosciences*, 33(12), 559–568.
- Vieira, R. T., Caixeta, L., Machado, S., Silva, A. C., Nardi, A. E., Arias-Carrión, O., & Carta, M. G. (2013). Epidemiology of early-onset dementia: a review of the literature. *Clinical Practice and Epidemiology in Mental Health: CP & EMH*, 9, 88–95.
- Vila, M., Vukosavic, S., Jackson-Lewis, V., Neystat, M., Jakowec, M., & Przedborski, S. (2000). Alpha-synuclein up-regulation in substantia nigra dopaminergic neurons following administration of the parkinsonian toxin MPTP. *Journal of Neurochemistry*, 74(2), 721–729.
- Vilarino-Guell, C., Soto-Ortolaza, A. I., Rajput, A., Mash, D. C., Papapetropoulos, S., Pahwa, R., Lyons, K. E., Uitti, R. J., Wszolek, Z. K., Dickson, D. W., Farrer, M. J., & Ross, O. A. (2011). MAPT H1 haplotype is a risk factor for essential tremor and multiple system atrophy. *Neurology*, 76(7), 670–672.
- Visanji, N. P., Wislet-Gendebien, S., Oschipok, L. W., Zhang, G., Aubert, I., Fraser, P. E., & Tandon, A. (2011). Effect of Ser-129 phosphorylation on interaction of alpha-synuclein with synaptic and cellular membranes. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(41), 35863–35873.
- Visanji, N. P., Brooks, P. L., Hazrati, L.-N., & Lang, A. E. (2013). The prion hypothesis in Parkinson's disease: Braak to the future. *Acta Neuropathologica Communications*, 1, 2.

- Volkow, N. D., Wang, G.-J., Fowler, J. S., Tomasi, D., Telang, F., & Baler, R. (2010). Addiction: decreased reward sensitivity and increased expectation sensitivity conspire to overwhelm the brain's control circuit. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 32(9), 748–755.
- Volles, M. J., & Lansbury, P. T. J. (2003). Zeroing in on the pathogenic form of alpha-synuclein and its mechanism of neurotoxicity in Parkinson's disease. *Biochemistry*, 42(26), 7871–7878.
- Volpicelli-Daley, L. A., Kirik, D., Stoyka, L. E., Standaert, D. G., & Harms, A. S. (2016). How can rAAV- α -synuclein and the fibril α -synuclein models advance our understanding of Parkinson's disease? *Journal of Neurochemistry*, 139 Suppl 1(Suppl 1), 131–155.
- Volta, M., Beccano-Kelly, D. A., Paschall, S. A., Cataldi, S., MacIsaac, S. E., Kuhlmann, N., Kadgien, C. A., Tatarnikov, I., Fox, J., Khinda, J., Mitchell, E., Bergeron, S., Melrose, H., Farrer, M. J., & Milnerwood, A. J. (2017). Initial elevations in glutamate and dopamine neurotransmission decline with age, as does exploratory behavior, in LRRK2 G2019S knock-in mice. *ELife*, 6.
- Volta, M., Cataldi, S., Beccano-Kelly, D., Munsie, L., Tatarnikov, I., Chou, P., Bergeron, S., Mitchell, E., Lim, R., Khinda, J., Lloret, A., Bennett, C. F., Paradiso, C., Morari, M., Farrer, M. J., & Milnerwood, A. J. (2015). Chronic and acute LRRK2 silencing has no long-term behavioral effects, whereas wild-type and mutant LRRK2 overexpression induce motor and cognitive deficits and altered regulation of dopamine release. *Parkinsonism & Related Disorders*, 21(10), 1156–1163.
- Volta, M., & Melrose, H. (2017). LRRK2 mouse models: dissecting the behavior, striatal neurochemistry and neurophysiology of PD pathogenesis. *Biochemical Society Transactions*, 45(1), 113–122.

W

- Wakabayashi, K., Fukushima, T., Koide, R., Horikawa, Y., Hasegawa, M., Watanabe, Y., Noda, T., Eguchi, I., Morita, T., Yoshimoto, M., Iwatsubo, T., & Takahashi, H. (2000). Juvenile-onset generalized neuroaxonal dystrophy (Hallervorden-Spatz disease) with diffuse neurofibrillary and lewy body pathology. *Acta Neuropathologica*, 99(3), 331–336.
- Wakabayashi, K., Hayashi, S., Kakita, A., Yamada, M., Toyoshima, Y., Yoshimoto, M., & Takahashi, H. (1998). Accumulation of alpha-synuclein/NACP is a cytopathological feature common to Lewy body disease and multiple system atrophy. *Acta Neuropathologica*, 96(5), 445–452.
- Wakamatsu, M., Ishii, A., Iwata, S., Sakagami, J., Ukai, Y., Ono, M., Kanbe, D., Muramatsu, S., Kobayashi, K., Iwatsubo, T., & Yoshimoto, M. (2008). Selective loss of nigral dopamine neurons induced by overexpression of truncated human alpha-synuclein in mice. *Neurobiology of Aging*, 29(4), 574–585.
- Walker, Z., Possin, K. L., Boeve, B. F., & Aarsland, D. (2015). Lewy body dementias. *Lancet (London, England)*, 386(10004), 1683–1697.
- Wang, Y.-L., Takeda, A., Osaka, H., Hara, Y., Furuta, A., Setsuie, R., Sun, Y.-J., Kwon, J., Sato, Y., Sakurai, M., Noda, M., Yoshikawa, Y., & Wada, K. (2004). Accumulation of beta- and gamma-synucleins in the ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1-deficient gad mouse. *Brain Research*, 1019(1–2), 1–9.
- Watts, J. K., & Corey, D. R. (2012). Silencing disease genes in the laboratory and the clinic. *The Journal of Pathology*, 226(2), 365–379.
- Weil, R. S., Lashley, T. L., Bras, J., Schrag, A. E., & Schott, J. M. (2017). Current concepts and controversies in the pathogenesis of Parkinson's disease dementia and Dementia with Lewy Bodies. *FL000Research*, 6, 1604.
- Weinreb, P. H., Zhen, W., Poon, A. W., Conway, K. A., & Lansbury, P. T. J. (1996). NACP, a protein implicated in Alzheimer's disease and learning, is natively unfolded. *Biochemistry*, 35(43), 13709–13715.
- Weisskopf, M. G., O'Reilly, E., Chen, H., Schwarzschild, M. A., & Ascherio, A. (2007). Plasma urate and risk of Parkinson's disease. *American Journal of Epidemiology*, 166(5), 561–567.
- Wenning, G. K., Colosimo, C., Geser, F., & Poewe, W. (2004). Multiple system atrophy. *The Lancet. Neurology*, 3(2), 93–103.
- Wersinger, C., & Sidhu, A. (2009). Partial regulation of serotonin transporter function by gamma-synuclein. *Neuroscience Letters*, 453(3), 157–161.
- Wersinger, C., & Sidhu, A. (2005). Disruption of the interaction of alpha-synuclein with microtubules enhances cell surface recruitment of the dopamine transporter. *Biochemistry*, 44(41), 13612–13624.
- Wersinger, C., & Sidhu, A. (2003). Attenuation of dopamine transporter activity by alpha-synuclein. *Neuroscience Letters*, 340(3), 189–192.
- Wersinger, C., Vernier, P., & Sidhu, A. (2004). Trypsin disrupts the trafficking of the human dopamine transporter by alpha-synuclein and its A30P mutant. *Biochemistry*, 43(5), 1242–1253.
- West, A., Farrer, M., Petrucelli, L., Cookson, M., Lockhart, P., & Hardy, J. (2001). Identification and characterization of the human parkin gene promoter. *Journal of Neurochemistry*, 78(5), 1146–1152.

- Whittaker, H. T., Qui, Y., Bettencourt, C., & Houlden, H. (2017). Multiple system atrophy: genetic risks and alpha-synuclein mutations. *Fl000Research*, 6, 2072.
- Wider, C., Ross, O. A., & Wszolek, Z. K. (2010). Genetics of Parkinson disease and essential tremor. *Current Opinion in Neurology*, 23(4), 388–393.
- Wilcox, S. K. (2010). Extending palliative care to patients with Parkinson's disease. *British Journal of Hospital Medicine (London, England: 2005)*, 71(1), 26–30.
- Wile, D. J., Agarwal, P. A., Schulzer, M., Mak, E., Dinelle, K., Shahinfard, E., Vafai, N., Hasegawa, K., Zhang, J., McKenzie, J., Neilson, N., Strongosky, A., Uitti, R. J., Guttman, M., Zabetian, C. P., Ding, Y.-S., Adam, M., Aasly, J., Wszolek, Z. K., ... Stoessl, A. J. (2017). Serotonin and dopamine transporter PET changes in the premotor phase of LRRK2 parkinsonism: cross-sectional studies. *The Lancet. Neurology*, 16(5), 351–359.
- Wilson, H., Dervenoulas, G., Pagano, G., Koros, C., Yousaf, T., Picillo, M., Polychronis, S., Simitsi, A., Giordano, B., Chappell, Z., Corcoran, B., Stamelou, M., Gunn, R. N., Pellecchia, M. T., Rabiner, E. A., Barone, P., Stefanis, L., & Politis, M. (2019). Serotonergic pathology and disease burden in the premotor and motor phase of A53T alpha-synuclein parkinsonism: a cross-sectional study. *The Lancet. Neurology*, 18(8), 748–759.
- Winner, B., Melrose, H. L., Zhao, C., Hinkle, K. M., Yue, M., Kent, C., Braithwaite, A. T., Ogholikhan, S., Aigner, R., Winkler, J., Farrer, M. J., & Gage, F. H. (2011). Adult neurogenesis and neurite outgrowth are impaired in LRRK2 G2019S mice. *Neurobiology of Disease*, 41(3), 706–716.
- Winner, B., Jappelli, R., Maji, S. K., Desplats, P. A., Boyer, L., Aigner, S., Hetzer, C., Loher, T., Vilar, M., Campioni, S., Tzitzilonis, C., Soragni, A., Jessberger, S., Mira, H., Consiglio, A., Pham, E., Masliah, E., Gage, F. H., & Riek, R. (2011). In vivo demonstration that alpha-synuclein oligomers are toxic. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(10), 4194–4199.
- Wirdefeldt, K., Weibull, C. E., Chen, H., Kamel, F., Lundholm, C., Fang, F., & Ye, W. (2014). Parkinson's disease and cancer: A register-based family study. *American Journal of Epidemiology*, 179(1), 85–94.
- Wislet-Gendebien, S., D'Souza, C., Kawarai, T., St George-Hyslop, P., Westaway, D., Fraser, P., & Tandon, A. (2006). Cytosolic proteins regulate alpha-synuclein dissociation from presynaptic membranes. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(43), 32148–32155.
- Withers, G. S., George, J. M., Banker, G. A., & Clayton, D. F. (1997). Delayed localization of synelfin (synuclein, NACP) to presynaptic terminals in cultured rat hippocampal neurons. *Developmental Brain Research*, 99(1), 87–94.
- Wong, K., Sidransky, E., Verma, A., Mixon, T., Sandberg, G. D., Wakefield, L. K., Morrison, A., Lwin, A., Colegial, C., Allman, J. M., & Schiffmann, R. (2004). Neuropathology provides clues to the pathophysiology of Gaucher disease. *Molecular Genetics and Metabolism*, 82(3), 192–207.
- Wong, Y. C., & Krainc, D. (2017). α -synuclein toxicity in neurodegeneration: mechanism and therapeutic strategies. *Nature Medicine*, 23(2), 1–13.
- Wood, S. J., Wypych, J., Steavenson, S., Louis, J. C., Citron, M., & Biere, A. L. (1999). alpha-synuclein fibrillogenesis is nucleation-dependent. Implications for the pathogenesis of Parkinson's disease. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(28), 19509–19512.
- Wu, H., Lima, W. F., Zhang, H., Fan, A., Sun, H., & Croke, S. T. (2004). Determination of the role of the human RNase H1 in the pharmacology of DNA-like antisense drugs. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(17), 17181–17189.
- Wu, K., Quan, Z., Weng, Z., Li, F., Zhang, Y., Yao, X., Chen, Y., Budman, D., Goldberg, I. D., & Shi, Y. E. (2007). Expression of neuronal protein synuclein gamma gene as a novel marker for breast cancer prognosis. *Breast Cancer Research and Treatment*, 101(3), 259–267.
- Wu, Z., Asokan, A., & Samulski, R. J. (2006). Adeno-associated virus serotypes: vector toolkit for human gene therapy. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*, 14(3), 316–327.

X

- Xia, Y., Zhang, G., Han, C., Ma, K., Guo, X., Wan, F., Kou, L., Yin, S., Liu, L., Huang, J., Xiong, N., & Wang, T. (2019). Microglia as modulators of exosomal alpha-synuclein transmission. *Cell Death & Disease*, 10(3), 174.
- Xu, J., Kao, S.-Y., Lee, F. J. S., Song, W., Jin, L.-W., & Yankner, B. A. (2002). Dopamine-dependent neurotoxicity of alpha-synuclein: a mechanism for selective neurodegeneration in Parkinson disease. *Nature Medicine*, 8(6), 600–606.
- Xu, K., Xu, Y.-H., Chen, J.-F., & Schwarzschild, M. A. (2010). Neuroprotection by caffeine: time course and role of its metabolites in the MPTP model of Parkinson's disease. *Neuroscience*, 167(2), 475–481.
- Xu, S., Zhou, M., Yu, S., Cai, Y., Zhang, A., Ueda, K., & Chan, P. (2006). Oxidative stress induces nuclear translocation of C-terminus of alpha-synuclein in dopaminergic cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 342(1), 330–335.

Y

- Yamamoto, S., Fukae, J., Mori, H., Mizuno, Y., & Hattori, N. (2006). Positive immunoreactivity for vesicular monoamine transporter 2 in Lewy bodies and Lewy neurites in substantia nigra. *Neuroscience Letters*, 396(3), 187–191.
- Yamasaki, T. R., Holmes, B. B., Furman, J. L., Dhavale, D. D., Su, B. W., Song, E.-S., Cairns, N. J., Kotzbauer, P. T., & Diamond, M. I. (2019). Parkinson's disease and multiple system atrophy have distinct alpha-synuclein seed characteristics. *The Journal of Biological Chemistry*, 294(3), 1045–1058.
- Yamazaki, K., Wakasugi, N., Tomita, T., Kikuchi, T., Mukoyama, M., & Ando, K. (1988). Gracile axonal dystrophy (GAD), a new neurological mutant in the mouse. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* (New York, N.Y.), 187(2), 209–215.
- Yanagawa, N., Tamura, G., Honda, T., Endoh, M., Nishizuka, S., & Motoyama, T. (2004). Demethylation of the synuclein gamma gene CpG island in primary gastric cancers and gastric cancer cell lines. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 10(7), 2447–2451.
- Yang, F., Trolle Lagerros, Y., Bellocco, R., Adami, H.-O., Fang, F., Pedersen, N. L., & Wirdefeldt, K. (2015). Physical activity and risk of Parkinson's disease in the Swedish National March Cohort. *Brain: A Journal of Neurology*, 138(Pt 2), 269–275.
- Yang, K., Broussard, J. I., Levine, A. T., Jenson, D., Arenkiel, B. R., & Dani, J. A. (2017). Dopamine receptor activity participates in hippocampal synaptic plasticity associated with novel object recognition. *The European Journal of Neuroscience*, 45(1), 138–146.
- Yang, Y., Cui, Y., Sang, K., Dong, Y., Ni, Z., Ma, S., & Hu, H. (2018). Ketamine blocks bursting in the lateral habenula to rapidly relieve depression. *Nature*, 554(7692), 317–322.
- Yang, Z., Wang, X., Yang, J., Sun, M., Wang, Y., & Wang, X. (2017). Aberrant CpG Methylation Mediates Abnormal Transcription of MAO-A Induced by Acute and Chronic L-3,4-Dihydroxyphenylalanine Administration in SH-SY5Y Neuronal Cells. *Neurotoxicity Research*, 31(3), 334–347.
- Yavich, L., Oksman, M., Tanila, H., Kerokoski, P., Hiltunen, M., van Groen, T., Puolivali, J., Mannisto, P. T., Garcia-Horsman, A., MacDonald, E., Beyreuther, K., Hartmann, T., & Jakala, P. (2005). Locomotor activity and evoked dopamine release are reduced in mice overexpressing A30P-mutated human alpha-synuclein. *Neurobiology of Disease*, 20(2), 303–313.
- Yavich, L., Tanila, H., Vepsäläinen, S., & Jakala, P. (2004). Role of alpha-synuclein in presynaptic dopamine recruitment. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 24(49), 11165–11170.
- Ye, Q., Zheng, M.-H., Cai, Q., Feng, B., Chen, X.-H., Yu, B.-Q., Gao, Y.-B., Ji, J., Lu, A.-G., Li, J.-W., Wang, M.-L., & Liu, B.-Y. (2008). Aberrant expression and demethylation of gamma-synuclein in colorectal cancer, correlated with progression of the disease. *Cancer Science*, 99(10), 1924–1932.
- Yonetani, M., Nonaka, T., Masuda, M., Inukai, Y., Oikawa, T., Hisanaga, S.-I., & Hasegawa, M. (2009). Conversion of wild-type alpha-synuclein into mutant-type fibrils and its propagation in the presence of A30P mutant. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(12), 7940–7950.
- Yoshimoto, M., Iwai, A., Kang, D., Otero, D. A., Xia, Y., & Saitoh, T. (1995). NACP, the precursor protein of the non-amyloid beta/A4 protein (A beta) component of Alzheimer disease amyloid, binds A beta and stimulates A beta aggregation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(20), 9141–9145.
- Ysselstein, D., Joshi, M., Mishra, V., Griggs, A. M., Asiago, J. M., McCabe, G. P., Stanciu, L. A., Post, C. B., & Rochet, J.-C. (2015). Effects of impaired membrane interactions on alpha-synuclein aggregation and neurotoxicity. *Neurobiology of Disease*, 79, 150–163.
- Yu, S., Li, X., Liu, G., Han, J., Zhang, C., Li, Y., Xu, S., Liu, C., Gao, Y., Yang, H., Ueda, K., & Chan, P. (2007). Extensive nuclear localization of alpha-synuclein in normal rat brain neurons revealed by a novel monoclonal antibody. *Neuroscience*, 145(2), 539–555.
- Yuan, J., & Zhao, Y. (2013). Evolutionary aspects of the synuclein super-family and sub-families based on large-scale phylogenetic and group-discrimination analysis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 441(2), 308–317.

Z

- Zaccai, J., Brayne, C., McKeith, I., Matthews, F., & Ince, P. G. (2008). Patterns and stages of alpha-synucleinopathy: Relevance in a population-based cohort. *Neurology*, 70(13), 1042–1048.
- Zaiss, A. K., & Muruve, D. A. (2005). Immune responses to adeno-associated virus vectors. *Current Gene Therapy*, 5(3), 323–331.
- Zakharov, S. D., Hulleman, J. D., Dutseva, E. A., Antonenko, Y. N., Rochet, J.-C., & Cramer, W. A. (2007). Helical alpha-synuclein forms highly conductive ion channels. *Biochemistry*, 46(50), 14369–14379.
- Zhang, J., Lv, S., Tang, G., Bian, G., Yang, Y., Li, R., Yang, J., & Liu, J. (2019). Activation of calcium-impermeable GluR2-containing AMPA receptors in the lateral habenula produces antidepressant-like effects in a rodent model of Parkinson's disease. *Experimental Neurology*, 322, 113058.
- Zhao, T. T., Shin, K. S., Kim, K. S., Park, H. J., Kim, H. J., Lee, K. E., & Lee, M. K. (2016). Effects of (-)-sesamin on motor and memory deficits in an MPTP-lesioned mouse model of Parkinson's disease treated with l-DOPA. *Neuroscience*, 339, 644–654.
- Zharikov, A., Bai, Q., De Miranda, B. R., Van Laar, A., Greenamyre, J. T., & Burton, E. A. (2019). Long-term RNAi knockdown of α -synuclein in the adult rat substantia nigra without neurodegeneration. *Neurobiology of Disease*, 125, 146–153.
- Zarranz, J. J., Alegre, J., Gomez-Esteban, J. C., Lezcano, E., Ros, R., Ampuero, I., Vidal, L., Hoenicka, J., Rodriguez, O., Atares, B., Llorens, V., Gomez Tortosa, E., del Ser, T., Munoz, D. G., & de Yebenes, J. G. (2004). The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia. *Annals of Neurology*, 55(2), 164–173.
- Zhang, J., & Tan, L. C.-S. (2016). Revisiting the Medical Management of Parkinson's Disease: Levodopa versus Dopamine Agonist. *Current Neuropharmacology*, 14(4), 356–363.
- Zhao, W., Liu, H., Liu, W., Wu, Y., Chen, W., Jiang, B., Zhou, Y., Xue, R., Luo, C., Wang, L., Jiang, J.-D., & Liu, J. (2006). Abnormal activation of the synuclein-gamma gene in hepatocellular carcinomas by epigenetic alteration. *International Journal of Oncology*, 28(5), 1081–1088.
- Zhou, C., Emadi, S., Sierks, M. R., & Messer, A. (2004). A human single-chain Fv intrabody blocks aberrant cellular effects of overexpressed alpha-synuclein. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*, 10(6), 1023–1031.
- Zhou, J., Broe, M., Huang, Y., Anderson, J. P., Gai, W.-P., Milward, E. A., Porritt, M., Howells, D., Hughes, A. J., Wang, X., & Halliday, G. M. (2011). Changes in the solubility and phosphorylation of alpha-synuclein over the course of Parkinson's disease. *Acta Neuropathologica*, 121(6), 695–704.
- Zhou, L., Liu, M.-Z., Li, Q., Deng, J., Mu, D., & Sun, Y.-G. (2017). Organization of Functional Long-Range Circuits Controlling the Activity of Serotonergic Neurons in the Dorsal Raphe Nucleus. *Cell Reports*, 18(12), 3018–3032.
- Zhou, Y., Inaba, S., & Liu, J. (2006). Inhibition of synuclein-gamma expression increases the sensitivity of breast cancer cells to paclitaxel treatment. *International Journal of Oncology*, 29(20), 289–295.
- Zhu, M., Rajamani, S., Kaylor, J., Han, S., Zhou, F., & Fink, A. L. (2004). The flavonoid baicalein inhibits fibrillation of alpha-synuclein and disaggregates existing fibrils. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(26), 26846–26857.
- Zigmond, M. J., & Smeyne, R. J. (2014). Exercise: is it a neuroprotective and if so, how does it work? *Parkinsonism & Related Disorders*, 20 Suppl 1, S123-7.
- Zimprich, A., Biskup, S., Leitner, P., Lichtner, P., Farrer, M., Lincoln, S., Kachergus, J., Hulihan, M., Uitti, R. J., Calne, D. B., Stoessl, A. J., Pfeiffer, R. F., Patenge, N., Carbajal, I. C., Vieregge, P., Asmus, F., Muller-Mysok, B., Dickson, D. W., Meitinger, T., ... Gasser, T. (2004). Mutations in LRRK2 cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology. *Neuron*, 44(4), 601–607.
- Zinn, E., Pacouret, S., Khaychuk, V., Turunen, H. T., Carvalho, L. S., Andres-Mateos, E., Shah, S., Shelke, R., Maurer, A. C., Plovie, E., Xiao, R., & Vandenberghe, L. H. (2015). In Silico Reconstruction of the Viral Evolutionary Lineage Yields a Potent Gene Therapy Vector. *Cell Reports*, 12(6), 1056–1068.