

Títol: ESTUDI DE LA DEGRADACIÓ PROTEASOMAL DE LA PROTEÏNA PRO-APOPTÒTICA RTP801 EN MODELS CEL·LULARS DE PARKINSON.

Autor: Víctor Pérez Fernández.

Universitat on s'ha realitzat la recerca: Universitat de Barcelona. Facultat de Medicina - Hospital Clínic. Departament de Farmacologia.

Universitat de procedència: Universitat de Barcelona. Facultat de Biologia.

Contingut:

Objectius:

La proteïna RTP801 està induïda en models animals i cel·lulars de Parkinson. La seva elevació és suficient i necessària per mediar la mort cel·lular, i ho fa de manera seqüencial, inactivant les quinases de supervivència mTOR i AKT. RTP801 té una vida mitja de 2 a 5 minuts i la regulació dels seus nivells proteics és molt precisa. Els nivells proteics d'RTP801 depenen de l'equilibri que hi ha entre la inducció de la seva síntesi i dels mecanismes responsables de la seva degradació. Sabem que la proteïna RTP801 és degradada pel proteasoma i que una de les E3 lligases implicades en la seva poli-ubiquitinació és la parkina. Gràcies a la seva activitat E3 lligasa, la parkina uneix cadenes de ubiquitines a les lisines de les seves proteïnes substrat. La RTP801 conté només sis lisines, per tant l'objectiu d'aquest estudi és determinar quines d'aquestes sis lisines de la proteïna RTP801 són clau per la seva degradació proteasomal.

Metodologia:

Primer de tot es va fer un estudi bioinformàtic per tal de predir quines lisines tenien més probabilitats de ser ubiquitinades degut a la seva condició hidrofílica.

Llavors es va dissenyar uns primers per tal de mutar les lisines a arginines per evitar la seva ubiquitinació. Es van dissenyar primers per mutar les lisines una per una, i uns altres per mutar-les totes de cop. La mutagènesi dirigida es va realitzar en base al plàsmid original on hi havia el gen del RTP801 *wild type* clonat. Els plàsmids resultants amb les mutacions es van transfectar en cèl·lules HEK293 i en cèl·lules PC12 diferenciades amb NGF. Amb aquests models vam analitzar els nivells de RTP801 per mitjà de la tècnica de western blot.

Resultats:

Per seqüenciació de DNA vam confirmar que la mutagènesi dirigida de les lisines de la RTP801 va ser correcta. Es van sobre-expressar els plàsmids de la RTP801 *wild type* i les seves mutacions en cèl·lules HEK293 i en cèl·lules PC12 diferenciades amb NGF i efectivament vam poder veure que en mutar totes les lisines de la RTP801, aquesta proteïna s'acumulava cinc

vegades més. Amb les diferents mutacions vam veure una diferent gradació dels nivells de la proteïna.

Conclusions:

La proteïna RTP801 és degradada pel proteasoma ja que en absència de les lisines veiem una acumulació tòxica del RTP801 en models cel·lulars de parkinson.

Contribució personal al laboratori de la Dra. Malagelada desde la meva data d'inici del treball de grau 18/2/13 fins a la data actual 18/4/13:

Anàlisi bioinformàtica estructural de la proteïna RTP801, disseny de primers, realització de la reacció de la mutagènesi dirigida, mini i maxi preps dels 8 plàsmids resultants, transfecció dels plàsmids als cultius cel·lulars, anàlisi per western blot de les mostres, anàlisi i discussió de resultats.