

## **METODOLOGIA**

**I. ARRAY PER  $\alpha$ -SINUCLÈINA EN DEMÈNCIA AMB COSSOS DE LEWY (DLB).**

Per tal de dur a terme aquest tipus d'array (Affymetrix, Bionova, Barcelona), cal que l'anticòs (Ac) primari que s'utilitzi, concretament en el nostre cas l' $\alpha$ -sinucleïna, estigui marcat. A continuació presentem el mètode per a biotinar l' $\alpha$ -sinucleïna.

Protocol de marcatge de l'anti(-sinucleïna amb biotina

- 200 (L d'Ac (200 (g) en 18 (L d'aigua destil.lada (1mg/mL).
- Afegir 2 (L de carbonat sòdic NaHCO<sub>3</sub> i passar pel vòrtex.
- Preparar fresca una solució de biotina 0.1 M : 11 mg en 0.25 mL aigua destil.lada.
- Afegir la biotina a l'anticòs equilibrat.
- Incubar a temperatura ambient 1h amb agitació suau.
- Parar la reacció de la biotina afegint clorur d'amoni (ClNH<sub>4</sub>) 1/10.
- Dialitzar diverses vegades vers PBS (Phosphate Buffered Saline) per eliminar la biotina que no ha reaccionat .
- Guardar la solució a 4°C i no afegir azida.

Cal provar l'anticòs marcat amb una membrana prèviament incubada amb mostra de pacients amb alguna sinucleïnopatia, per exemple, Demència amb cossos de Lewy o malaltia de Parkinson.

- Diluir la sinucleïna marcada 1/500 en TBST-BSA (Tris Buffered Saline-Tween-Bovine Serum Albumine) 3% i s'incuba O/N.
- Revelar amb estreptavidina 30 minuts.
- Paral.lelament i com a control negatiu, s'incuba una part de la membrana amb TBST-BSA sense anticòs.

**Protocol de l'array utilitzant l'anti- $\alpha$ -sinucleïna com a anticòs primari.**

Primerament cal bloquejar la membrana durant 1h , com a mínim, en TBS-BSA 3% a temperatura ambient.

...Mentrestant preparem el teixit:

- Partim d'1g de teixit, en el nostre cas DLBD, que s' homogenitza en 10 volums de PBS + inhibidors de proteases i fosfatases i es centrifuga 5000 rpm, 10 minuts.
- Ens quedem amb el sobrenedant (SN) (10 mL), i serà la mostra que incubarem amb la membrana, durant 2h a temperatura ambient.

- Es fan 3 rentats de 15 minuts cada un amb TBST.
- Afegim l' $\alpha$ -sinucleïna marcada 1/250 en TBST-BSA 3%, 2h a temperatura ambient.
- Es fan 3 rentats de 15 minuts cada un, amb TBST.
- S'incuba amb estreptavidina, 30 minuts.
- Es fan rentats amb TBST.
- Revelat per quimioluminiscència o ECL.

## **II. PROTOCOL D'IMMUNOPRECIPITACIÓ (IP) DE L' $\alpha$ -SINUCLÈINA EN TEIXIT HUMÀ**

### **Material**

- Anti- $\alpha$ -sinucleïna monoclonal (Neomarkers, Bionova).
- Proteïna G-Sepharosa (Prot. G) (Amersham). Abans de fer-la servir fer 3 rentats amb tampó d'IP per treure l'etanol.
- Tampó d'IP1 : HEPES 20 mM, pH, 7.2; Triton X-100 1%; Deoxicolat sòdic, 1%; SDS 0.2%; NaCl 150 mM ; NaF 1mM; Glicerol 10%.
- Abans de fer-lo servir pel teixit, afegir-hi els inhibidors de proteases.
- Tampó d'IP2: Tris 20 mM, pH 7.5; EDTA 1mM; EGTA 1mM; NaCl 150 mM; NaVO<sub>4</sub> 2mM; Glicerol 10%; Nonidet p-40 1%.

### **Mètode**

Pas previ: Bloquejar la prot. G O/N amb BSA 1% en PBS (o bé 2h) a 4°C

- Després de pesar el teixit (aprox 0.3g en humà, o 0.03g en murí), i disoldre'l en 7 volums de tampó d'IP1, homogenitzar i sonicar.
- Centrifugació preparativa: Fem aquesta centrifugació per tal d'eliminar de la mostra els nuclis i altre material que ens podria interferir en el procés d'IP. Es centrifuga l'homogenat humà 5000 rpm, 10 minuts, amb la qual cosa s'obté un SN i un Pellet que serà descartat.
- S'ultracentrifuga el SN anterior 37 000 rpm 1h , obtenint-se d'aquesta manera la fracció que conté l' $\alpha$ -sinucleïna citosòlica.
- Pre-rentat (*Pre-cleaning*) del SN obtingut: Es realitza per tal d'eliminar el màxim d'elements inespecífics que podrien unir-se a la proteïna G durant el procés d'IP. Per això en el SN resultant s'hi afegeixen 60  $\mu$ L de prot. G, 30 min a 4°C.
- Calcular la concentració de proteïna.

- **IP** amb 1mg de proteïna + 30 $\mu$ L prot.G + 4  $\mu$ g anti-  $\alpha$ -sinucleïna monoclonal, 4h a 4 $^{\circ}$ C en agitació orbital. Centrifugar 12000 rpm 30 segons, i descartem el sobrenedant que conté tot allò que no s'ha unit a l'anti- $\alpha$ -sinucleïna.
- Rentem bé el pellet (unes 5v) amb tampó d'IP2.
- Ens quedem amb l'últim pellet i hi posem 20 $\mu$ L de tampó de mostres i bullir.
- Depenent de la proteïna que es vulgui IP farem un percentatge o un altre del gel.
- A continuació es procedeix amb la detecció de les proteïnes d'interès i es el revela per quimioluminescència (ECL).

### **III. PROTOCOL D'IMMUNOPRECIPITACIÓ (IP) DE RAB3A**

#### **Material**

- anti-Rab3a (Sta. Cruz, Quimigranel, quan es treballa amb teixit murí, Calbiochem, Bionova, quan es treballa amb teixit humà).
- tampó d'IP: Tris-HCl pH 8.0, 20 mM ; EDTA 1mM ; NaCl 150 mM; 1% Nonidet P-40.
- Proteïna G-Sepharose (Amersham).

#### **Mètode**

Abans de fer servir la proteïna G es renta 3 vegades la resina en tampó d'IP per treure l'etanol.

El dia abans es posen a bloquejar les boles de prot G (200  $\mu$ L totals) amb 1mL de BSA 1% en PBS, O/N, o bé 2 hores el mateix dia.

A partir de 0.1-0.2g de teixit humà, o de 0.04g de teixit murí en 10v. de tampó d'IP. S'homogenitza i sonica el teixit i es procedeix a la IP:

- Centrifugació preparativa: 5000 rpm, 10 min., en la que es descarta el pellet i es separa el SN.
- Es centrifuga el SN 37000 rpm (100.000g) 1h a la ultracentrífuga. Descartem el pellet.
- Es fa un pre-rentat del SN obtingut, afegint 30 $\mu$ L de prot. G, durant 30 minuts.
- Es fa un pols de 30 sec, 12000 rpm.
- SN del rentat + 50  $\mu$ L anti-Rab3a de Sta. Cruz o 10  $\mu$ L de Calbiochem + 40  $\mu$ L de prot G prèviament bloquejada. Es deixa O/N en agitació orbital, 4 $^{\circ}$ C.
- L'endemà es renta 3 vegades en tampó d'IP sense  $\beta$ -mercaptoetanol.
- Gel 10% .

- A continuació es procedeix amb la detecció de les proteïnes d'interès anti-rab3a monoclonal (cedit pel Dr. Joan Blasi) i es el revela per quimioluminescència (ECL).

#### **IV. PROTOCOL DE PULL DOWN DE LES PROTEÏNES RAB3A, RAB5 I RAB8**

##### **Material**

- Tampó de pull down: PBS + inhibidors de proteases.
- Proteïnes rab unides a una cúa d'histidines (cedides pel Dr. José Luís Rosa) aliquotades a -80°C:
  - Rab8 (46): 0.7µg/mL
  - Rab5 (52): 0.5µg/mL
  - Rab3a (51): 0.6µg/mL
- Níquel-Agarosa (Pharmingen). Es bloquegen O/N amb BSA 1% en PBS. Abans d'utilitzar-se es renten 3 vegades amb tampó de pull-down .

##### **Mètode**

- 0.2g de teixit humà o 0.04g de teixit murí en 10v de tampó de pull down.
- Centrifugació preparativa 5000 rpm, 10min.
- Es separa el SN del pellet, i el SN s'ultracentrifuga 37000 rpm, 1h.
- Pre-rentat del SN amb 40(L de Ni<sup>+</sup> , 30 min.
- Pols de 12000 rpm, 30 segons i a continuació amb el SN es fa el *pull down*, havent-se calculat prèviament la concentració de proteïna resultant del procés de pre-rentat.
- **Pull-down**: 1 mg de proteïna total + 40 µL de Ni<sup>+</sup> -agarosa bloquejades + 1µg de cada rab, 1h en agitació orbital, 4°C. Finalment es renta 3 vegades amb PBS i s'afegeixen 20 µL de tampó de mostres i es posa a bullir.
- Gel al 10%
- A continuació es procedeix amb la detecció de les proteïnes d'interès mitjançant el western blot i el revela per quimioluminescència.

**V. AÏLLAMENT DE FRACCIONS INSOLUBLES D'α-SINUCLÈINA EN CERVELL HUMÀ.**

Per a aïllar les fraccions insolubles que contenen els agregats d'α-sinucleïna, s'ha seguit el protocol descrit prèviament per a l'aïllament de inclusions gials citoplasmàtiques amb algunes modificacions (Dickson DW i col, 2003).

- Homogenització i sonicació de 0.2g de cervell humà en 1.5 mL de PBS amb inhibidors de proteases i fosfatases (0.06 g en 0.5 mL de tampó en el cas de ratolí).
- Centrifugació preparativa : 500 rpm 10 minuts a 4°C, en la qual es descarta el pellet, i s'obté el **SN1**
- Ultracentrifugació del SN1 a 37000 rpm, durant 1 hora a 4°C, obtenint-se el **SN2**, que conté la fracció d'α-sinucleïna més soluble, el qual guardem i anomenem *fracció d'α-sinucleïna soluble en PBS*.
- Resuspenem el pellet resultant en un solució de 0.5% de deoxicolat sòdic +1% Triton i 0.1% SDS, tot en PBS, pH 7.0, i l'ultracentrifuguem 37,000 rpm , 4°C durant 1 h. El SN resultant (**SN3**) el guardem com a la *fracció soluble en deoxicolat* i continuem la resta d'extracció a partir del pellet obtingut.
- Es resuspèn el pellet obtingut en una solució de PBS amb SDS 2% i es manté durant 2h en agitació orbital a temperatura ambient, per a evitar la precipitació de l' SDS . A continuació s'ultracentrifuga novament a 37000 rpm durant 1 hora a 25°C, guardant el SN (**SN4**) resultant com la fracció soluble en SDS.
- Finalment, el pellet obtingut es resuspèn en una solució d'urea 8M-SDS 5% en PBS i s'incuba tota la nit en agitació orbital a temperatura ambient. L'endemà s'ultracentrifuga a 37 000 rpm durant 1 hora a temperatura ambient i s'obté el **SN5**, que conté la fracció d'α-sinucleïna soluble en urea.
- Es mesclen quantitats iguals de cada fracció (25µL) amb tampó de mostres i es carreguen en un gel SDS-PAGE al 10 %. A continuació es procedeix amb la detecció de les proteïnes d'interès mitjançant el western blot i el revelat per quimioluminescència.
- Anticossos utilitzats: anti-α-synuclein (Chemicon, Pacisa Giralte, Barcelona); anti-PLCβ1 (Upstate,) . Ambdós anticossos s'han utilitzat a la dil.lució de 1:1000.

## **VI. PROTOCOL D'IMMUNOPRECIPTACIÓ DE PLC $\beta$ 1 EN CERVELL HUMÀ**

- Homogenització i sonicació de 0.2g de cervell humà en 1.5 mL de PBS amb inhibidors de proteases i fosfatases.
- Centrifugació a 2650g durant 10 min a 4 °C.
- El sobrenedant obtingut (S1) es torna a centrifugar 100000g durant 1 h a 4°C.
- El pellet es descarta. Ens quedem amb el sobrenedant (S2) del qual en determinem la concentració de proteïna, i portem la concentració de proteïna obtinguda a 1 mg/mL amb PBS.
- Per 1 mg de proteïna s'afegeixen 5 $\mu$ g d'anti-PLC $\beta$ 1 monoclonal (Upstate, Reactiva, Barcelona) i s'incuba tota la nit a 4°C.
- L'endemà s'afegeixen 100  $\mu$ l de Proteïna G agarosa (Amersham Pharmacia, Barcelona) i es deixa incubant a 4°C durant 2 hores.
- Després de centrifugar 12000 rpm, 30 sec, es renta 3 vegades amb PBS, el pellet que conté els immunocomplexes.
- Finalment s'afegeixen 32.5  $\mu$ L de tampó de mostres 4 x i es bull 5 minuts.
- Gel 10%
- Western blott amb anti-PLC $\beta$ 1 polyclonal (Sta Cruz, Quimigranel, Barcelona)
- ECL

## **VII. PROTOCOL D'AÏLLAMENT DE VESÍCULES PER GRADIENT DE SACAROSA EN CERVELL HUMÀ**

Tampó T1 : Tris 5 mM

EGTA 1 mM

pH 7.4, en aigua mili Q

Abans de fer servir ha d'estar fred.

Preparar el volum que necessari, + 250 mM sacarosa + inhibidors de proteases.

- Homogenitzar i sonicar 0.2 g de teixit en 1 mL de tampó T1.
- Centrifugació 5000 rpm, 5 minuts a 4°C.
- Guardar el sobrenedant (SN) i resuspendre el pellet en 500  $\mu$ L de T1 i repetim la centrifugació anterior.
- Ajuntem el segon SN obtingut amb el primer i llencem el pellet.

Aquí tenim la mostra a punt per la separació de vesícules, a la que li apliquem un gradient de sacarosa, preparada en T1 (sense sacarosa 250 mM).

Preparem : de 2M fins a 0.4 M), en tubs especials de centrifuga per gradient i molt lentament amb pipeta de 1 mL per les parets.

- Un cop fet el gradient amb la nostra mostra al damunt de tot, ho posem a centrifugar durant 3h a 30.000 rpm.
- Acabada la centrifugació, anem recollint fraccions de 500 $\mu$ L (a la càmera freda). Separem 50 o 100 $\mu$ L de cada fracció que mesquem amb tampó de mostres i bullim per fer el gel. La resta ho congelem a -20 °C o a -80°C.

### **VIII. PROTOCOL D'ÀILLAMENT DE MEMBRANA PLASMÀTICA**

Per l'aïllament de membrana plasmàtica s'ha seguit el protocol descrit per Kessler i col amb algunes modificacions.

#### **Tampó d'aïllament**

Tris-HCl 50 mM

MgCl<sub>2</sub> 10 mM

pH 7.4

inhibidors de proteases

#### **Protocol**

- S'homogenitzen les mostres en 20 volums de tampó d'aïllament.
- Centrifugació durant 5 minuts a 1000 g
- Centrifugació del sobrenedant 20 minuts a 27000g
- Es resuspèn el pellet en tampó d'aïllament i es mesura la concentració de proteïna.

### **IX. PROTOCOL D'UNIÓ (*BINDING*) DEL RECEPTOR METABOTRÒPIC DEL GLUTAMAT A MEMBRANA PLASMÀTICA**

Els estudis d'unió de L-[<sup>3</sup>H]Glutamat a membrana plasmàtica s'han portat a terme segons els protocols descrits prèviament (Albasanz i col., 2002; Martin i col., 1993).

#### **Protocol**

S'incuben 50  $\mu$ g de proteïna, en presència de 100  $\mu$ M AMPA, 100  $\mu$ M cainat i 100  $\mu$ M NMDA, per tal de bloquejar la unió a receptors ionotròpics del glutamat, amb diferents concentracions de L-[<sup>3</sup>H]Glutamat (50 nM - 1960 nM) en 10 mM de tampó fosfat potàssic pH 7.4, durant 60 minuts a 25°C. La unió no específica s'obté en presència de L-glutamat no marcat. Tots els assajos es fan en presència de 1 mM d'àcid L-threo- $\beta$ -hydroxyaspartic (THBA), que és un inhibidor de la captació de l' L-glutamat (Kimenlberg i col, 1989)



## **X. PROTOCOLS DE BIOLOGIA MOL. LECULAR**

### **X.I. AÏLLAMENT D'ARN missatger (mRNA)**

Per dur a terme l'extracció de l'mRNA, es realitzen 2 protocols seqüencials. Primerament s'aïlla l'RNA total mitjançant el reactiu **Trizol** i a continuació s'aïlla l'RNA excloent els RNAs ribosòmics 5S rRNA, 5.8 rRNA, així com l'RNA de transferència tRNA utilitzant el kit **RNeasy Protect Mini Kit. El protocol és el següent:**

- El cervell humà s'homogenitza directament en 1 mL de Trizol, per cada 100 mg de teixit i s'extreu l'RNA seguint les instruccions del kit.
- L'RNA total purificat es resuspèn en 100 µL d'aigua lliure d'RNases i la purificació de l'RNA també s'obté seguint les instruccions del fabricant (RNeasy Protect Mini Kit) amb algunes modificacions. El tractament amb DNaseI no es fa degut a l'eliminació del DNA genòmic després d'extreure la mostra amb Trizol. La concentració de cada mostra s'obté a partir de l'absorbància a 260 nm, i la qualitat de l'RNA s'obté mitjançant gels electroforètics de formaldehid-agarosa.

### **X.II SÍNTESI DE cDNA**

- Per cada 10µL de reacció de transcripció inversa es mesclen: 200 ng d'RNA humà (en 3.85µL d'aigua) juntament amb *primer* oligodT 2.5µM, tampó TaqMan 1x, MgCl<sub>2</sub> 5.5 mM, 500 µM de cada nucleòtid (dATP, dTTP, dCTP i dGTP, 0.08 U d'inhibidor d'RNAsa i 0.31 U de transcriptasa multireversa.
- Es fa una primera incubació de 10 minuts a 25 °C per tal de maximitzar la unió de l'RNA al *primer*.
- La segona incubació és de 30 minuts a 48°C.
- La reacció es finalitza incubant 5 minuts a 95°C per tal de desactivar la transcriptasa inversa.
- Per tal de garantir el grau de conatminació de DNA genòmic, es fan incubacions paral.leles de cada mostra d'RNA amb tota la mescla de reacció però sense transcriptasa inversa.

### **X.III PCR TaqMan**

La sonda TaqMan s'uneix a una cadena del DNA motllo entre els *primers* forward i revers. Conté un colorant *reporter* que s'allibera de la Taq polimerasa durant el pas d'amplificació, de manera que es desprèn fluorescència proporcional a la quantitat de producte acumulat.

S'ha obtingut una seqüència de 620 pb de cada isoforma de A $\beta$ PP a partir dels números del GeneBank NM\_000484, M34867, M34868, M34869, M34870 i les posicions assignades per l'exó6-exó9 boundary (A $\beta$ PP695), exó7-exó9 (A $\beta$ PP751) i exó7-exó8 (A $\beta$ PP770) boundary que són 313, 339 i 308 respectivament. Les sondes Taqman s'han dissenyat per damunt dels boundaries exó-exó per tal d'eliminar les senyals de l'ADN genòmic. Com a control endogen s'ha fet servir la  $\beta$ -actina.

Els assajos de PCR per cada isoforma d'APP i la referència endògena s'han fet per triplicat de les mostres de cDNA en plaques òptiques de 96 pouets en un sistema de detecció Prism7700 Sequence Detection .

La placa es tapa utilitzant taps òptics.

Per cada 20 $\mu$ L de reacció Taqman, es mesclen 9 $\mu$ L de cDNA (dil.luits 1/100, que correspon aproximadament al cDNA a partir de 2 ng d'RNA) amb 1 $\mu$ L 20x Assays by Design expressió gènica Assay Mix i 10  $\mu$ L de 2x TaqMan Universal PCR Master Mix.

Es fan assajos paral.lels de cada mostra utilitzant els primers i la sonda de la  $\beta$ -actina per a la normalització.

La reacció es porta a terme amb els següents paràmetres: 50°C durant 2 minuts, 95°C durant 10 minuts i 40 cicles de 95°C de 15 segons, 60°C 1 minut.

Es fan les corbes estàndar per cada target (A $\beta$ PP695, A $\beta$ PP751 i A $\beta$ PP770) i per la referència endògena ( $\beta$ -actina), utilitzant dil.lucions seriades d'RNA de cervell control. Finalment, s'obtenen totes les dades de la PCR TaqMan utilitzant el software detector de seqüències (versió SDS 1.9 de l'Applied Biosystems)