

El knockout o la inhibición de USP30 protege Neuronas dopaminérgicas en el Parkinson modelo de ratón de enfermedad

Recibido: 16 de diciembre de 2022

Aceptado: 24 de octubre de 2023

Published online: 13 November 2023

Buscar actualizaciones

Tracy-Shi Zhang Fang¹✉, Yu Sun², Andrew C. Pearce³, Simona ¹, Mark Kemp³, Christopher A. Luckhurst³, raquel williams³, EleuteriRoss Mills³, Sara Almendra³, Laura Burzynski³, Nora M. Markus³, Christopher J. Lelliott⁴, Natasha A. Karp⁴, David J. Adams⁴, Stephen P. Jackson^{5,6}, Jin-Feng Zhao⁷, G. Ganley⁷, Paul W. Thompson³, Gabriel Balmus², Dian ✉ & David K. Simon¹

Las mutaciones en SNCA, el gen que codifica la α -sinucleína (α Syn), causan La enfermedad de Parkinson (EP) y el α Syn aberrante son una característica patológica clave de EP idiopática. Esta α -sinucleinopatía conduce a una disfunción mitocondrial, lo que puede impulsar la neurodegeneración dopaminérgica. PARKIN y PINK1, mutado en la EP autosómica recesiva, regula la autofagia preferencial eliminación de mitocondrias disfuncionales ("mitofagia") mediante la inducción de la ubiquitilación de proteínas mitocondriales, un proceso contrarrestado por la desubiquitilación vía USP30. Aquí mostramos que la pérdida de USP30 en ratones knockout para Usp30 protege contra los déficits de comportamiento y conduce a un aumento de la mitofagia, disminución fosfo-S129 α Syn y atenuación de la pérdida neuronal dopaminérgica de SN inducido por α Syn. Estas observaciones fueron recapituladas con un potente, Inhibidor USP30 selectivo y penetrante del cerebro, MTX115325, con buenos resultados similares a los de un fármaco. propiedades. Estos datos respaldan firmemente estudios adicionales sobre la inhibición de USP30 como potencial terapia modificadora de la enfermedad de la EP.

Una gran cantidad de evidencia implica la disfunción de las mitocondrias. La homeostasis como mecanismo fisiopatológico clave en el Parkinson. enfermedad (EP)^{1–8}. Por lo tanto, el mantenimiento de un conjunto saludable de funciones. Las mitocondrias requieren un sistema para degradar selectivamente las disfunciones. mitocondrias opcionales ("mitofagia")⁹. EP autosómica recesiva (AR-PD) debido a la deficiencia de PARKIN¹⁰ vincula la EP directamente con un defecto en la mitofagia. En respuesta a la disfunción mitocondrial, PARKIN se traslada al membrana mitocondrial externa donde interactúa con PINK1 (otro gen donde las mutaciones causan AR-PD^{11,12}) para ubiquitilar mitocondrial

proteínas, induciendo así la fusión de mitocondrias con autofagosomas, seguida de degradación autofágica^{13,14}.

Nuestra hipótesis es que la mitofagia defectuosa también puede exacerbar la toxicidad de la α -sinucleína (α Syn). Mutaciones puntuales en el gen α Syn^{15–20}, o duplicaciones o triplicaciones en el gen^{21–23}, causan herencia autosómica dominante PD (AD-PD). α Syn induce disfunción del complejo mitocondrial I, potencialmente uniéndose directamente a TOM20 en el sistema mitocondrial membrana y por tanto interfiriendo con la proteína mitocondrial importar²⁴. Además, las mitocondrias disfuncionales producen un aumento

¹Departamento de Neurología, Centro Médico Beth Israel Deaconess y Facultad de Medicina de Harvard, Boston, MA, EE. UU.

²Instituto de Investigación de la Demencia del Reino Unido en el

Universidad de Cambridge y Departamento de Neurociencias Clínicas, Universidad de Cambridge, Cambridge Biomedical Campus, Cambridge CB2 0AH, Reino Unido.

³Mission Therapeutics Ltd. Edificio Glenn Berge, Campus de investigación de Babraham, Cambridge CB22 3FH, Reino Unido.

⁴Bienvenido al Instituto Sanger, Cambridge CB10 1SA,

⁵Instituto Gurdon y Departamento de Bioquímica, Universidad de Cambridge, Cambridge CB2 1QN, Reino Unido.

⁶Instituto de Cambridge de Investigación del Cáncer del Reino Unido,

Universidad de Cambridge, Cambridge Biomedical Campus, Cambridge CB2 0RE, Reino Unido.

⁷Unidad de Ubiquitilación y Fosforilación de Proteínas MRC, Universidad de

Dundee, Dundee DD1 5EH, Reino Unido. ⁸Departamento de Neurociencia Molecular, Instituto de Neurociencia de Transilvania, 400191 Cluj-Napoca, Rumania.

✉ correo electrónico: szhang9@bidmc.harvard.edu; PTHompson@missiontherapeutics.com; gb318@cam.ac.uk

Las especies reactivas de oxígeno (ROS), consistentes con un aumento de los marcadores de daño oxidativo en los cerebros con EP, y las ROS pueden aumentar la acumulación de α Syn, alimentando así un bucle patológico autoacelerado^{25–33}. Sin embargo, se desconoce el papel de la mitofagia en la eliminación de mitocondrias disfuncionales en el contexto de deterioro mitocondrial inducido por α Syn in vivo. La evidencia indirecta de un posible papel en este entorno proviene de los hallazgos de que las ratas PINK1 KO muestran una mayor vulnerabilidad a la toxicidad de α Syn³⁴.

La mayoría de las estrategias para modular la mitofagia también alteran la autofagia en general o impactan otros pasos en la vía autofagia-lisosoma³⁵, lo que dificulta el estudio de la mitofagia específicamente^{36,37}. Un objetivo que podría permitir la manipulación molecular específica de la mitofagia es la USP30. USP30 es una enzima desubiquitilante (DUB) unida a la membrana mitocondrial externa, donde elimina directamente la ubiquitina unida por PARKIN u otras ligasas E3^{38–40}, contrarrestando así la capacidad de PARKIN para promover la mitofagia^{39,41,42}. Como tal, el agotamiento de USP30 mediado por ARNi rescata la mitofagia en células con deficiencia de PARKIN y protege las neuronas dopaminérgicas (DA) en *Drosophila* con deficiencia de PARKIN^{40,43} y las neuronas humanas en cultivos celulares^{42,44}. Por tanto, la inhibición de USP30 es una estrategia terapéutica atractiva para restaurar la mitofagia y lograr la neuroprotección en la EP. Ahora presentamos datos que demuestran que la alteración de USP30 en ratones Usp30 KO estimula la mitofagia y da como resultado una protección muy significativa contra la toxicidad de α Syn. Además, informamos que estos efectos pueden recapitularse mediante una pequeña molécula potente y altamente selectiva que penetra en el cerebro, MTX115325, con propiedades similares a las de un fármaco. En conjunto, estos datos validan a USP30 como un objetivo terapéutico potencial para la neuroprotección en la EP.

Resultados

Los ratones Usp30 KO son viables y no muestran patología manifiesta. Para generar Usp30 KO en ratones, flanqueamos el exón esencial 4 de Usp30 con sitios loxP (alelo listo condicional) y luego lo eliminamos usando recombinasa CRE (alelo constitutivo) para generar ratones Usp30 KO (Figura 1a). La eliminación exitosa del gen Usp30 se confirmó por la falta de ARNm de Usp30 en el cerebro, riñón, corazón, músculo esquelético, bazo, hígado, páncreas y testículos (Fig. 1b). Además, no se detectó proteína USP30 en la corteza de ratones Usp30 KO (Fig. 1c). Como se informó anteriormente⁴⁵, los ratones Usp30 KO nacieron con las frecuencias mendelianas esperadas (Fig. 1d). Además, ahora realizamos un fenotipado de alto rendimiento de más de 300 parámetros fenotípicos y mostramos que los ratones Usp30 KO no tienen patologías manifiestas (Figura 1 complementaria y Datos complementarios 1). Para ver si la pérdida de USP30 conduce a patologías con la edad, establecimos una cohorte de envejecimiento y mostramos que la pérdida de USP30 no tiene efectos nocivos detectables con el envejecimiento en comparación con los controles de compañeros de camada de tipo salvaje (WT) (Fig. 1e). De hecho, notamos que, en comparación con los controles de camada WT (antecedentes C57BL/6 N), los ratones Usp30 KO de 1 año están protegidos de la acumulación de hígado graso (Figura complementaria 2). En conjunto, estos datos no revelaron efectos adversos por la pérdida de USP30 en ratones.

La eliminación de Usp30 mejora los niveles de mitofagia en dopaminérgicos neuronas

Para probar la hipótesis de que el agotamiento de USP30 afectaría la mitofagia en las neuronas dopaminérgicas, cruzamos ratones Usp30 KO con ratones reporteros mito-QC, que tienen un tándem GFP-mCherry fusionado a una señal de localización mitocondrial derivada de la proteína FIS146. Esto hace posible medir la mitofagia in vivo a medida que la señal de GFP se apaga en el ambiente ácido de los lisosomas durante la mitofagia⁴⁶.

Por lo tanto, los puntos rojos de mCherry sin una señal verde de GFP reflejan mitocondrias fusionadas con lisosomas durante la degradación mitofágica (Fig. 1f). La colocalización de puntos rojos de mCherry con LAMP1 se utilizó como una estrategia alternativa para medir la mitofagia en secciones del cerebro donde la señal endógena de mCherry-GFP no se detecta fácilmente con microscopía confocal (Figura complementaria 3c).

Para comprender si la pérdida de USP30 puede afectar el aclaramiento mitocondrial, cuantificamos las señales de mitofagia en las neuronas dopaminérgicas de ratones KO mito-QC/Usp30 en comparación con los compañeros de camada mito-QC WT a las 16 semanas de edad. En este escenario, en neuronas dopaminérgicas SN individuales (SNpc; TH-positivas, azul; Fig. 1g), cuantificamos el número de puntos mCherry positivos (mCherry, rojo) colocalizados con un marcador lisosomal (LAMP1, verde; Fig. 1f central paneles de la izquierda) que representan mitofagosomas fusionados con lisosomas. Descubrimos que los puntos mCherry aumentan significativamente y específicamente en las neuronas dopaminérgicas de los ratones Usp30 KO en comparación con los ratones WT ($8,8 \pm 0,6$ por neurona DA en ratones WT y $12,7 \pm 1,5$ por neurona DA en ratones Usp30 KO, $n = 13$). $14, p = 0,0264$; figura 1h). También encontramos que los puntos mCherry/mitofagia no cambiaron en otros tejidos periféricos como el músculo (Figuras complementarias 3a, b), pero aumentaron significativamente en las neuronas corticales y las neuronas del hipocampo de ratones Usp30 KO en comparación con ratones Usp30 WT a las 40 semanas de edad (Fig. complementaria 3c, d). En conjunto, nuestros resultados indican que la pérdida de USP30 en ratones aumenta los niveles basales de mitofagia en las neuronas DA en el SNpc, las neuronas corticales y las neuronas del hipocampo, pero no en el músculo (Supl. Fig. 3).

Usp30 KO atenúa la pérdida neuronal dopaminérgica en el modelo de ratón AAV-A53T-SNCA Para probar si

la mejora de la mitofagia en las neuronas DA de ratones Usp30 KO está asociada con la protección de las neuronas DA contra la toxicidad de α Syn, utilizamos un AAV1/2-A53T validado. -Modelo de ratón con sobreexpresión de SNCA α Syn que muestra neurodegeneración dopaminérgica y déficits motores en [modelos de rata, ratón y primates no humanos](#)^{47–51}. En primer lugar, para determinar si la inducción de α Syn afecta la mitofagia, medimos la mitofagia dentro del SNpc (inyectado con AAV-A53T-SNCA) en comparación con los sitios contralaterales (no inyectados; NI) a las 28 semanas después del parto. Para verificar que la localización subcelular mito-QC es específica para la mitofagia, también utilizamos tinción con el marcador mitocondrial, OPA-1 y observamos resultados similares a los datos generados con el sistema indicador mito-QC (Figuras complementarias 4a, b). Los puntos de mitofagia aumentaron significativamente en las neuronas SNpc DA contralaterales e ipsilaterales de ratones Usp30 KO ($15,80 \pm 6,837$ y $14,29 \pm 6,862$ por neurona DA, respectivamente) en comparación con ratones Usp30 WT ($8,889 \pm 3,833$ y $9,640 \pm 4,881$ por neurona DA, respectivamente) después de la inyección unilateral de AAV-A53T-SNCA (Figura complementaria 4b). Curiosamente, la expresión de α Syn mutante no afectó el nivel basal de mitofagia independientemente de la pérdida de USP30, lo que sugiere que no hay una correlación directa entre la acumulación de α Syn y el control de mitofagia dependiente de USP30 en el momento evaluado (Figura complementaria 4b). Para determinar si la pérdida de USP30 protege contra la pérdida neuronal DA inducida por α Syn en los ratones Usp30KO, realizamos un recuento neuronal TH+ dentro del SNpc en sitios ipsilaterales (inyectados con AAV-A53T-SNCA) en comparación con sitios contralaterales (NI) en 28 semanas después de las inyecciones (Fig. 2a). Estos resultados muestran que la pérdida de USP30 atenuó significativamente la pérdida neuronal de DA causada por la sobreexpresión de α Syn (inyección de AAV-A53T-SNCA; $47,35 \pm 4,614$ % en ratones WT, $p < 0,0001$; $29,47 \pm 6,412$ % en ratones mito-QC, $p = 0,0025$; $66,15 \pm 3,135$ % en ratones mito-QC/Usp30 KO, $p < 0,0001$; prueba t de una muestra comparada con 100%, Fig. 2b) en comparación con controles WT ($p = 0,0043$; Fig. 2b) o ratones mito-QC ($p = 0,0002$; figura 2b). Por lo tanto, la ausencia de USP30 protege contra la pérdida neuronal de DA inducida por α Syn.

Usp30 KO inhibe el desarrollo de la patología α Syn y los déficits motores asociados. Para determinar

si la regulación positiva de la mitofagia en ratones Usp30 KO inyectados con AAV-A53T-SNCA se asocia con una disminución de la patología α Syn, realizamos inmunotinción en el SNpc con anti-fosfo S129- α Syn, una forma patológica de α Syn que se encuentra en los cuerpos de Lewy⁵². La inyección del vector vacío de AAV (AAV-EV) no produjo α Syn patológico en el SNpc ipsilateral de ratones WT, mito-QC y mito-QC/Usp30 KO.

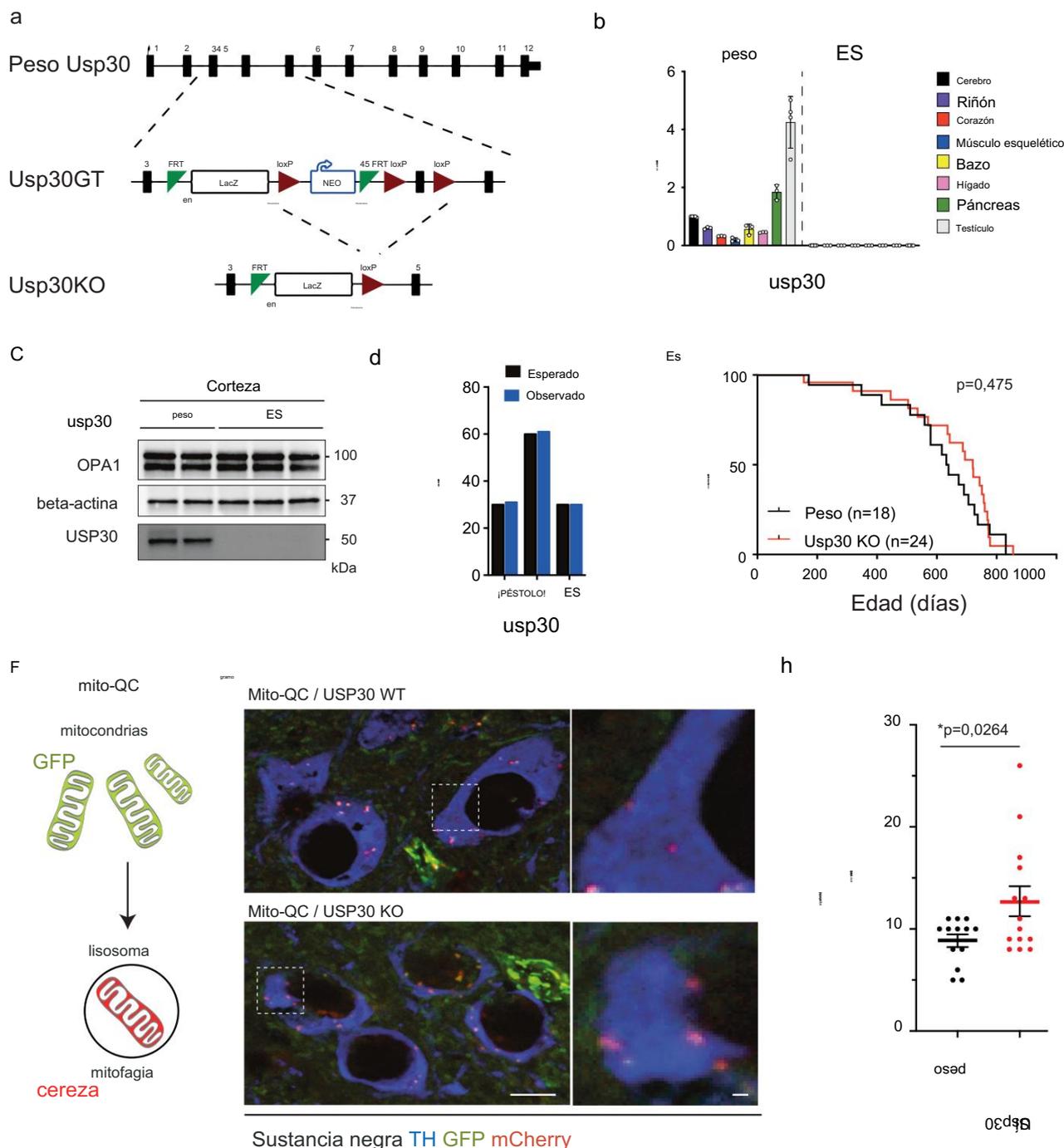


Figura 1 | Generación y caracterización de ratones Usp30 KO. **a** Un esquema del gen apuntando a generar los ratones Usp30 KO. **b** El gráfico de barras muestra los niveles del gen Usp30. **c** Representativa Imágenes de Western Blot de OPA1, beta-actina y USP30 en la corteza de Usp30 WT y KO ratones machos. **d** Estimado y Números observados de WT, Usp30 heterocigotos (Het) y Usp30 homocigotos. **e** Supervivencia curva de ratones WT y Usp30 KO. **f** Imagen esquemática que muestra el mecanismo de funcionamiento de la proteína informadora mito-QC para evaluar la señal de mitofagia en las células. **g** Imágenes de fluorescencia representativas que muestran la señal de fluorescencia del mito-QC

(mCherry-red, GFP-green) y neuronas dopaminérgicas (TH, azul) en el SNpc de ratones macho mito-QC y mito-QC/Usp30 KO. Las entradas blancas discontinuas se ampliaron a la derecha. **h** Cuantificación de los puntos de mitofagia en individuos neuronas dopaminérgicas del SNpc (n = 13 para ratones macho USP WT, n = 14 para Usp30KO ratones machos, 5 a 10 neuronas por ratón). WT y Usp30 KO en el gráfico de barras representan mito-QC y mito-QC/Usp30 KO, respectivamente. Importancia determinada por no emparejado, Prueba t de Student de dos colas. Las barras de error representan la media \pm DE; *P<0,05. Acrónimos: PESO tipo salvaje, trampa genética GT, eliminación de KO, locus loxP del sitio X-over P1, flippasa FRT objetivo de reconocimiento, aceptor de empalme SA, cola pA poliA, casete de resistencia a neomicina NEO, β -galactosidasa LacZ. Los datos de origen se proporcionan como un archivo de datos de origen.

respectivamente (Figura complementaria 5a). En cambio, hubo una fuerte Inmunotinción de fluorescencia fosfo-S129- α Syn en el ipsilateral SNpc de ratones WT inyectados con AAV-A53T-SNCA (67,10 \pm 4,899 en AAV-A53T-SNCA versus AAV-Ev, p <0,0001; Fig. 2c, d) y ratones mito-QC (76,62 \pm

4.854 en ratones inyectados con mito-QC AAV-A53T-SNCA versus AAV-Ev, p<0,0001; Figura 2c, d). En particular, la intensidad de fosfo-S129 α Syn en Las neuronas dopaminérgicas de los ratones inyectados con AAV-A53T-SNCA se redujeron significativamente en ratones mito-QC/Usp30 KO (Fig. 2c, d; 21,09 \pm 3,065

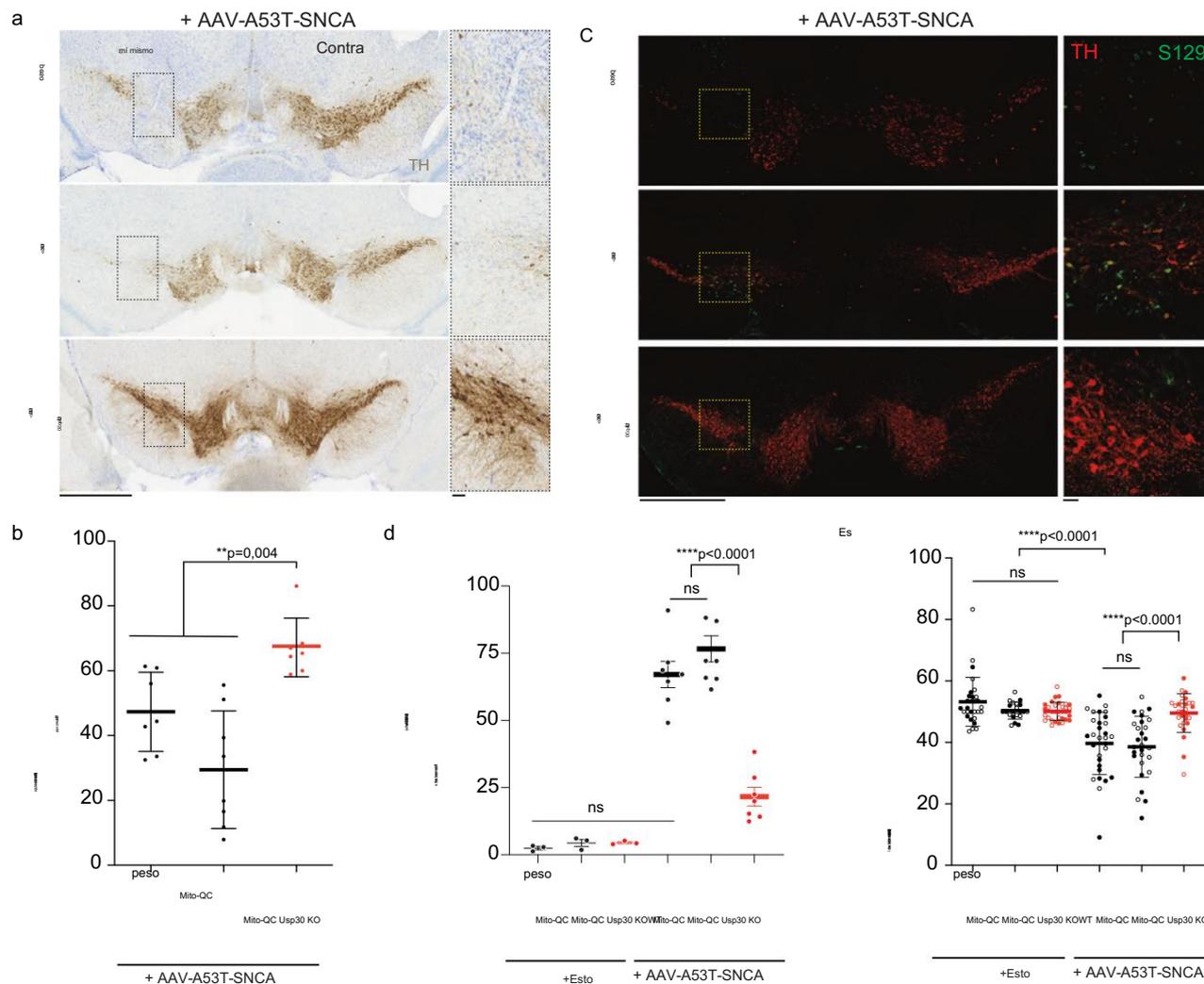


Figura 2 | Usp30 KO mejoró la supervivencia neuronal de DN, disminuyó el α Syn patológica y evitó déficits motores en un modelo de ratón con EP inducida por α -sinucleína. a Secciones representativas de SNpc de inmunohistoquímica de TH en diferentes grupos de ratones machos 28 semanas después de la inyección de AAV-A53T-SNCA. El recuadro de los paneles izquierdos se amplía a los paneles derechos. Barra de escala, 1 mm para paneles izquierdos, 100 μ m para paneles derechos. **b** El gráfico muestra los porcentajes de neuronas TH positivas en SNpc ipsilateral en comparación con el contralateral del mismo ratón macho en cada grupo (n = 7 para el grupo WT, n = 8 para el grupo mito-QC, n = 7 para mito-QC/Usp30 KO grupo). Importancia determinada por ANOVA unidireccional. Las barras de error representan la media \pm DE; **P<0,01. **c** Imágenes representativas de SNpc de ratones macho 28 semanas después de la inyección de AAV-A53T-SNCA. El recuadro está ampliado a la derecha. Barra de escala, 1 mm para paneles izquierdos, 100 μ m para paneles derechos. **d** Cuantificaciones de la intensidad de fluorescencia promedio de fosfo-S129 α -sinucleína en neuronas DA de ratones machos en cada grupo (n = 3 ratones para grupos de control de vector vacío; n = 7 ratones para grupos AAV-SNCA). Importancia determinada por ANOVA. Las barras de error representan la media \pm DE; ****P < 0,0001; ns, no significativo. Porcentaje de uso de la extremidad anterior contralateral para la cría en la prueba del cilindro de ratones hembra (puntos abiertos) o machos (puntos cerrados) a las 28 semanas después de la inyección unilateral de los vectores AAV-Null o AAV-A53T-SNCA (n = 29 para WT + EV, n = 21 para mito-QC + EV, n = 32 para mito-QC/Usp30 KO + EV, n = 30 para WT + SNCA, n = 28 para mito-QC + SNCA, n = 29 para mito-QC/Usp30 KO + SNCA). Importancia determinada por ANOVA unidireccional. Las barras de error representan la media \pm DE; ****P < 0,0001; ns, no significativo. Los datos de origen se proporcionan como un archivo de datos de origen.

en ratones inyectados con mito-QC/Usp30 KO AAV-A53T-SNCA versus $67,10 \pm 4,899$ en WT o $76,62 \pm 4,854$ en mito-QC inyectados con AAV-A53T-SNCA, $p < 0,0001$).

Para comprender mejor si el agotamiento de USP30 afecta la asociación entre α Syn patológico y las mitocondrias en el modelo de EP, analizamos la superposición de un marcador mitocondrial (OPA-1, rojo) con fosfo-S129- α Syn (verde) en el SNpc ipsilateral del AAV. -Modelo de ratón A53T-SNCA (Figura complementaria 5b). Las mitocondrias visualizadas mediante tinción con OPA-1 fueron en su mayoría visibles como puntos en el SNpc ipsilateral de ratones mito-QC/Usp30 WT, pero fueron visibles como una red dinámica en los ratones Usp30 KO (Supl. Fig. 5b). El análisis de colocalización mostró que aproximadamente el 80% del total de mitocondrias estaba asociado con S129- α Syn patológico en las neuronas SNpc de los ratones WT inyectados con AAV-A53T-SNCA ($78,09 \pm 1,218\%$) (Figura complementaria 5c). Curiosamente, la fracción de mitocondrias que se tiñeron conjuntamente con S129- α Syn disminuyó drásticamente a alrededor del 20 % en los ratones Usp30 KO. Por el contrario, la inyección unilateral del AAV-A53T-SNCA

($16,93 \pm 2,739\%$) (Figura complementaria 5c). Además, la fracción de S129- α Syn patológica ubicada en las mitocondrias sigue siendo comparable tanto en los ratones WT ($46,39 \pm 2,638\%$) como en los Usp30 KO ($44,79 \pm 2,617\%$) (Figura complementaria 5d). Estos resultados muestran que el agotamiento de USP30 redujo la acumulación de S129- α Syn patológico en las mitocondrias.

Usp30 KO protege contra los déficits motores inducidos por α Syn. Para evaluar si la pérdida de neuronas dopaminérgicas a las 28 semanas después de la inyección de AAV-A53T-SNCA se asocia con déficits motores y para evaluar el impacto de Usp30 KO en la función motora, medimos la asimetría. Uso experimental de las extremidades anteriores en la prueba del cilindro, que es sensible a la deficiencia asimétrica de dopamina47–51. La inyección unilateral de AAV-Ev no afectó la función motora en ratones machos o hembras de los tres grupos experimentales (WT, mito-QC y mito-QC / Usp30 KO; Fig. 2f), excluyendo así cualquier efecto no específico del virus o de la inyección estereotáxica en sí.

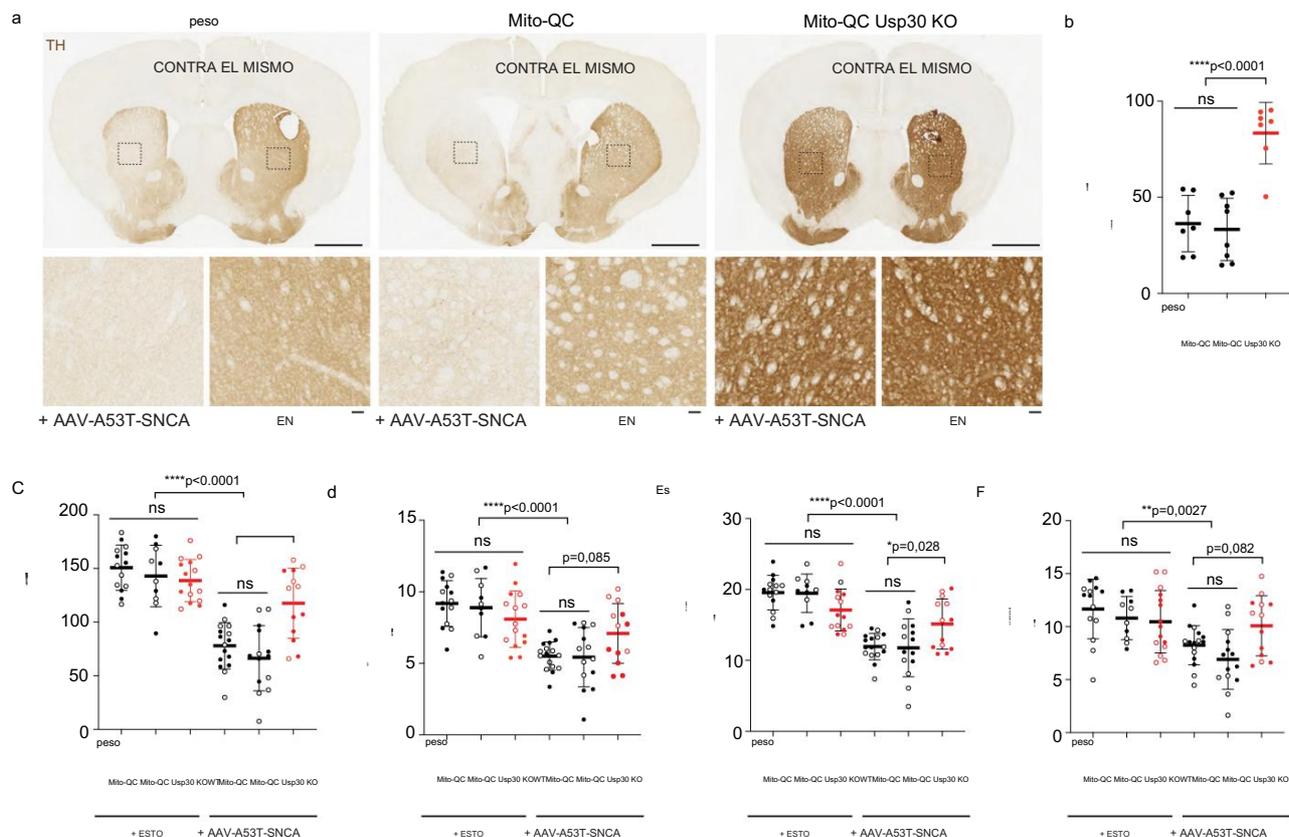


Figura 3 | Usp30 KO previene la pérdida de fibras dopaminérgicas TH+ del estriado y preserva la dopamina y sus metabolitos en el modelo de ratón basado en α -sinucleína. a Secciones estriatales representativas de inmunohistoquímica de TH en ratones macho 28 semanas después de la inyección de AAV-A53T-SNCA; ampliado en paneles inferiores. Barra de escala, 1 mm para paneles superiores, 100 μ m para paneles inferiores. b Densidad óptica relativa de las fibras TH+ en el cuerpo estriado ipsilateral en comparación con el lado contralateral de ratones machos en cada grupo (n = 7 para el grupo WT, n = 8 para el grupo mito-QC, n = 7 para el grupo mito-QC/Usp30 KO). Importancia determinada por ANOVA unidireccional. Las barras de error representan la media \pm DE; ****P < 0,0001. c Niveles medios de dopamina (ng/mg de proteína) en el cuerpo estriado ipsilateral de ratones hembra (puntos abiertos) y machos (puntos cerrados) en cada grupo (n = 14 para WT + EV, n = 10 para mito-QC + EV, n = 15 para mito-QC/Usp30 KO + EV, n = 16 para WT + SNCA, n = 14 para mito-QC + SNCA, n = 13 para grupos de ratones mito-QC/Usp30 KO + SNCA). Importancia determinada por ANOVA unidireccional. Las barras de error representan la media \pm DE; ****P < 0,001, ****P < 0,0001. d Media de los niveles de ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC, ng/mg de proteína) en el cuerpo estriado ipsilateral de ratones hembra (puntos abiertos) y machos (puntos cerrados) en cada grupo (n = 14 para WT + EV,

n = 10 para mito-QC + EV, n = 15 para mito-QC/Usp30 KO + EV, n = 16 para WT + SNCA, n = 14 para mito-QC + SNCA, n = 13 para mito-QC/Usp30 grupos de ratones KO + SNCA). Importancia determinada por ANOVA unidireccional. Las barras de error representan la media \pm DE; ****P < 0,0001. e Niveles medios de ácido homovanílico (HVA, ng/mg de proteína) en el cuerpo estriado ipsilateral de ratones hembra (puntos abiertos) y machos (puntos cerrados) en cada grupo (n = 14 para WT + EV, n = 10 para mito-QC + EV, n = 15 para mito-QC/Usp30 KO + EV, n = 16 para WT + SNCA, n = 14 para mito-QC + SNCA, n = 13 para grupos de ratones mito-QC/Usp30 KO + SNCA). Importancia determinada por ANOVA unidireccional. Las barras de error representan la media \pm DE; ****P < 0,0001; *P < 0,05. f Niveles medios de 3-metoxitiramina (3-MT, ng/mg de proteína) en el cuerpo estriado ipsilateral de ratones hembra (puntos abiertos) y machos (puntos cerrados) en cada grupo (n = 14 para WT + EV, n = 10 para mito-QC + EV, n = 15 para mito-QC/Usp30 KO + EV, n = 16 para WT + SNCA, n = 14 para mito-QC + SNCA, n = 13 para mito-QC/ grupos de ratones Usp30 KO + SNCA). Importancia determinada por ANOVA unidireccional. Las barras de error representan la media \pm DE; **P < 0,01. Los datos de origen se proporcionan como un archivo de datos de origen.

tanto en ratones WT como en mito-QC indujeron disfunción motora, como lo demuestra el menor uso de las extremidades anteriores contralaterales a la inyección (en comparación con el uso de las extremidades anteriores ipsilaterales) (Fig. 2e). En particular, Usp30 KO protegió significativamente contra los déficits motores inducidos por α Syn en ratones mito-QC/Usp30 KO hembras y machos (mito-QC AAV-A53T-SNCA versus mito-QC/Usp30 KO AAV-A53T-SNCA, p < 0,0001; WT AAV-A53T-SNCA versus mito-QC/Usp30 KO AAV-A53T-SNCA, p < 0,0001; Fig. 2e y vídeos complementarios 1-3). Estos resultados demuestran que Usp30 KO rescata los déficits motores inducidos por α Syn, medidos mediante la prueba del cilindro.

Usp30 KO protege contra la pérdida de dopamina estriado y terminales TH+ inducida por α Syn. Para probar

el impacto de Usp30 KO en la pérdida de neuritas DA inducida por α Syn que se proyectan hacia el cuerpo estriado, medimos la densidad de los terminales TH+ en el cuerpo estriado del cerebro. secciones (Fig. 3a). La densidad óptica relativa de las fibras TH+ disminuyó significativamente tanto en ratones WT (36,28 \pm 5,539 %; p < 0,0001, Fig. 3b) como en ratones mito-QC (33,26 \pm 5,721.

%; p < 0,0001, Fig. 3b), pero no en los ratones Usp30 KO (84,05 \pm 5,277 %; Fig. 3b) después de la inyección de AAV-A53T-SNCA.

Tras la tinción con TH, también observamos que la intensidad de TH tanto en el cuerpo estriado como en SNpc difería de WT a Usp30 KO incluso en el lado no inyectado. Para entender por qué, cuantificamos la densidad óptica de TH en ratones a los que se les inyectó AAV-A53T-SNCA o se les inyectó el vector AAV-Empty (Ev) en el lado ipsilateral en relación con el lado contralateral NI. Estos datos mostraron que en los ratones inyectados con AAV-A53T-SNCA, la intensidad de la tinción con TH se vio afectada no solo en el lado ipsilateral sino también en el lado contralateral (Fig. 3a, by Fig. Suplementaria 4c, d). El efecto bilateral sobre las terminales TH+ del cuerpo estriado después de la inyección unilateral de un vector AAV para sobreexpresar α Syn en SN se ha informado en un modelo de EP en ratas⁵³. Por lo tanto, es probable que la tinción con TH no sea elevada directamente por los ratones Usp30 KO, sino que Usp30 KO protege contra la pérdida de TH inducida por α Syn que ocurre tanto en el lado ipsilateral como en el contralateral. Esta observación no altera nuestros datos de interpretación ya que, para nuestros análisis, comparamos los efectos intra-ratón (ipsilateral versus contralateral).

Además, analizamos los niveles moleculares de dopamina y sus metabolitos en el cuerpo estriado ipsilateral de ratones machos y hembras. Los niveles de dopamina y sus metabolitos, incluido el ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC), 3-metoxitiramina (3-MT) y ácido homovanílico (HVA), son comparables entre genotipos en ratones inyectados con AAV-Ev (Figura 3 cf). La inyección de AAV-A53T-SNCA provocó un agotamiento de dopamina tanto en ratones WT como en mito-QC ($p < 0,0001$; Fig. 3c), pero no en ratones Usp30 KO (Fig. 3c). Además, Usp30 KO evitó la disminución de los metabolitos de dopamina HVA ($p < 0,05$, Fig. 3e) y 3-MT ($p = 0,0082$, Fig. 3f), con una tendencia no significativa para DOPAC ($p = 0,085$, Fig. 3d). Estos resultados muestran que Usp30 KO protege contra la pérdida de terminales estriales TH+ y contra la pérdida de dopamina estriatal en este modelo de EP de ratón basado en α Syn.

Validación de un inhibidor USP30 penetrante cerebral MTX115325

MTX115325 es un inhibidor USP30 patentado (USP30i) desarrollado por Mission Therapeutics con buena biodisponibilidad oral y penetración en el sistema nervioso central (SNC) (Fig. 4, Fig. complementaria 6a) (WO 2021/ 249909 A1). MTX115325 (Fig. 4a) inhibe la USP30 en un ensayo de polarización de fluorescencia bioquímica con una IC50 de 12 nM (Supl. Fig. 6a, primera fila) y, en las células, bloquea el acceso de una sonda similar a la ubiquitina al sitio activo de la enzima con un IC50 de 25 nM (Figura complementaria 6a, segunda fila). En una línea celular HeLa humana que sobreexpresa PARKIN y se expuso a las toxinas mitocondriales antimicina A y oligomicina A (A/O), MTX115325 aumentó la ubiquitilación de la proteína de la membrana mitocondrial externa TOM20, un sustrato USP30, con una EC1.5x y una EC50 de 10. nM y 32 nM respectivamente (Fig. 6a complementaria, tercera fila; en la Fig. 4b se proporciona un perfil de concentración-respuesta de TOM20-Ub representativo). Para investigar más efectos farmacológicos de MTX115325 en neuronas dopaminérgicas humanas in vitro, se probaron neuronas dopaminérgicas derivadas de iPSC (control o neuronas dopaminérgicas derivadas de iPSC mutadas con alfa-sinucleína A53T) para detectar diferencias en la ubiquitilación de TOM20 y TOM20, en ausencia o presencia de 7 días de tratamiento con MTX115325 a 10 nM, 100 nM o 1 μ M sin ningún estímulo exógeno. El tratamiento con MTX115325 provocó la regulación positiva de la ubiquitilación de TOM20 (la figura complementaria 6b, d – b contiene datos de transferencia Western de las neuronas de control). El tratamiento a corto plazo de 24 h con MTX115325 1 μ M sin ningún estímulo exógeno también aumentó la ubiquitilación de TOM20 tanto en el control como en el fondo A53T α Syn (Fig. S6c).

Para evaluar la selectividad contra DUB y otras cisteinil proteasas, se analizó el USP30i MTX115325 contra 54 DUB y cinco catepsinas en ensayos bioquímicos (Tabla 1). El nivel más alto de inhibición de DUB fue IC50 24,9 μ M, y la catepsina más alta fue para Catepsina L a IC50 42,1 μ M, lo que representa una selectividad USP30 > 2000 veces y > 3500 veces respectivamente (Figura complementaria 6a, cuarta fila y Tabla 1). Es importante destacar que, para su uso en estudios in vivo con ratones, confirmamos que USP30i MTX115325 inhibió la USP30 de ratón con una CI50 de 13 nM, lo que demuestra una potencia equivalente entre las enzimas humanas y de ratón (Figura complementaria 6a, quinta fila). Los estudios farmacocinéticos en ratones se realizaron mediante administración intravenosa (IV) para medir la eliminación del compuesto, mediante administración oral para medir la biodisponibilidad y mediante administración oral en animales con una sonda de microdialísis insertada en la corteza prefrontal para medir el perfil del fármaco libre en el cerebro. Líquido intersticial cerebral. Estos análisis revelaron que MTX115325 exhibe una excelente biodisponibilidad oral del 98% (Figura complementaria 6a, sexta fila), aclaramiento metabólico bajo a moderado de 19,7 ml/min/kg (Figura complementaria 6a, séptima fila) y buena penetración en el SNC con un coeficiente de partición independiente, K_{pu,u} de aproximadamente 0,4 (Figura complementaria 6a, octava fila). Se proporciona un perfil de concentración temporal del USP30i MTX115325 en sangre completa y dializado de corteza prefrontal después de una dosis única de 10 mg/kg, lo que demuestra una estrecha relación entre ambos perfiles de tejido (Fig. 4c) y una C_{max} libre de corteza prefrontal de 528 nM (en el punto de tiempo de 60 minutos). En un estudio separado, MTX115325 demostró un buen compromiso con el objetivo del SNC con una dosis de 10 mg/kg por vía oral, logrando aproximadamente 8 h de unión

(Figura complementaria 6e). Los estudios toxicológicos exploratorios en ratones demostraron que MTX115325 es bien tolerado sin observaciones clínicas adversas ni hallazgos patológicos después de dos semanas de dosificación con niveles de dosis de hasta 300 mg/kg/día. En células SH-SY5Y que expresan establemente mito-QC, MTX115325 produjo un aumento de la mitofagia dependiente de la concentración cuando se incubó durante 72 h en combinación con una inhibición submáxima del complejo ETC III y V (A/O 0,1 mM) (Fig. 4e). MTX115325 aumentó la mitofagia en un 22% a 37 nM con un aumento máximo del 54% en comparación con el valor inicial a 1 μ M (Fig. 4f). Estos datos muestran que la inhibición de USP30 con MTX115325 es altamente selectiva, penetrante en el SNC y bien tolerada y que MTX115325 impulsa procesos de control de calidad mitocondrial en una línea celular de neuroblastoma y en neuronas derivadas de iPSC in vitro con efectos dependientes de la concentración en presencia y ausencia de estímulos exógenos.

El inhibidor de USP30 MTX115325 previene la pérdida neuronal dopaminérgica y preserva la dopamina estriatal en un modelo de ratón AAV-A53T-SNCA. Para probar si la

inhibición de la actividad catalítica de USP30 puede recapitular los efectos protectores sobre el sistema nigroestriatal observados en ratones Usp30 KO, probamos el USP30i. MTX115325 (WO 2021/249909 A1) en una versión estrechamente relacionada del modelo de ratón AAV-A53T-SNCA PD como describimos para los estudios Usp30 KO. Después de la inyección estereotáxica unilateral de un AAV1/2 que codifica AAV-A53T-SNCA y sin inyección contralateral (NI), los ratones fueron tratados dos veces al día con 15 mg/kg o 50 mg/kg de MTX115325 mediante sonda oral, y después de 10 semanas de tratamiento. Se recogieron los cuerpos estriados ipsilateral y contralateral para medir la dopamina y sus metabolitos, y se recogió SN para medir las neuronas TH+ (solo el grupo de 50 mg/kg). En la Fig. 5a se proporcionan ejemplos de imágenes de tinción con TH. De acuerdo con el efecto de Usp30 KO descrito anteriormente, la inhibición de USP30 con MTX115325 protegió contra A53T α Syn indujo la pérdida de neuronas TH+ (Fig. 5b). Utilizando el hemisferio NI contralateral de cada animal como su propio control, el porcentaje de neuronas TH+ ipsilaterales frente a contralaterales en los animales tratados con vehículo fue del 61,7% frente al 89,08% para los animales tratados con MTX115325 (50 mg/kg dos veces al día) con un valor de p. de 0,029 (prueba t de Student no apareada), lo que indica una protección significativa contra la pérdida neuronal inducida por α Syn debido a la inhibición farmacológica de USP30. De acuerdo con estos efectos sobre las neuronas TH+, MTX115325, a dosis de 50 y 15 mg/kg dos veces al día, anuló la pérdida de dopamina y de sus metabolitos HVA y DOPAC en el hemisferio ipsilateral en comparación con el hemisferio contralateral, así como al comparar los niveles en el hemisferio ipsilateral entre los grupos de tratamiento (Fig. 5c-e). Al comparar los niveles en el hemisferio ipsilateral entre grupos de tratamiento utilizando datos normalizados, aunque las estimaciones medias de dopamina/HVA/DOPC sugieren una eficacia ligeramente menos sólida con 15 mg/kg dos veces al día en comparación con 50 mg/kg dos veces al día, son insuficientes para establecer definitivamente una respuesta a la dosis. Efecto del tratamiento con MTX115325 en este modelo.

Además, se evaluaron marcadores mecanísticos de patología relevante para la enfermedad, incluidos α Syn total, S129- α Syn fosforilado y abundancia de microgliales/astrocitos (Iba-1/GFAP). La inhibición de USP30 con MTX115325 a 50 mg/kg disminuyó significativamente el área total teñida con GFAP (Figura complementaria 7b), lo que refleja un menor número de astrocitos activados. MTX115325 a 50 mg/kg redujo significativamente el S129- α Syn fosforilado pero no el α Syn total (Figuras complementarias 7c, d).

Para confirmar la exposición al compuesto consistente con niveles sólidos de participación objetivo en el estudio, se midieron los niveles de MTX115325 en muestras de sangre tomadas 0,5, 1, 2, 4 y 6 h después de la primera dosis, siete días antes del final del estudio. MTX115325 alcanzó una C_{max} en sangre de 7546,9 ng/mL con 15 mg/kg y 16374,3 ng/mL con 50 mg/kg y exposiciones de 13606 ng*h/mL y 42959 ng*h/mL, respectivamente, en las diferentes concentraciones. diferentes dosis (Fig. 4d). Las concentraciones estimadas de fármaco libre en el cerebro estarían muy por encima de la CE50 en el ensayo de ubiquitilación TOM20 (TOM20-Ub) durante la duración del régimen de dosificación

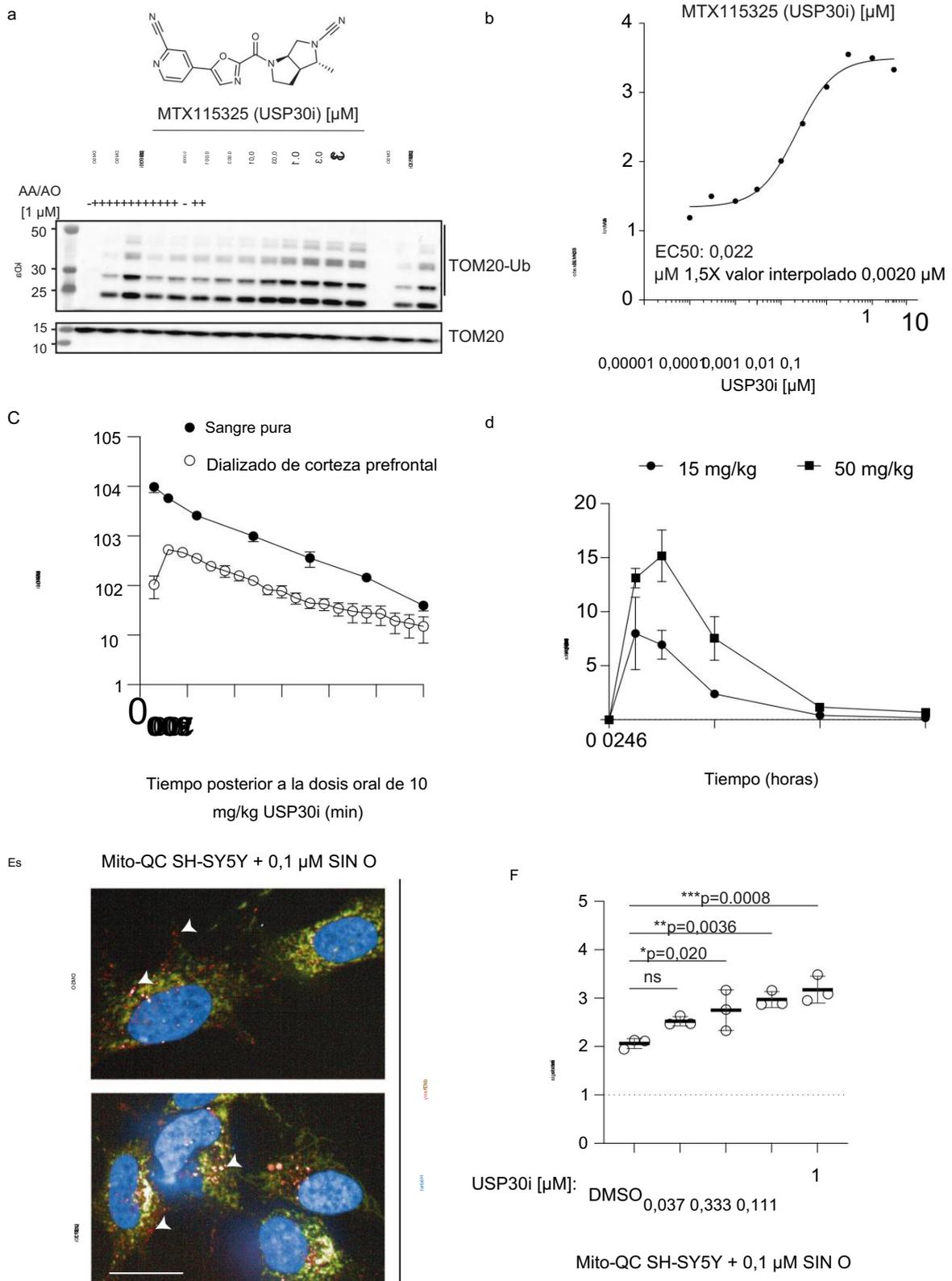


Figura 4 | Validación de la inhibición de USP30 y la farmacocinética de un inhibidor de USP30 de molécula pequeña, MTX115325. a Imágenes representativas de transferencia Western de 5 experimentos independientes muestran TOM20 y TOM20 modificado con ubiquitina (TOM20-Ub) en diversas concentraciones de MTX115325 durante 90 minutos en células HeLa. La estructura de MTX115325 se muestra arriba. b Cuantificación de TOM20-Ub normalizado en varias concentraciones de MTX115325. c Concentración dependiente del tiempo de MTX115325 en sangre total y corteza prefrontal después de la administración oral a 10 mg/kg. n = 4 ratones por grupo. d Concentraciones en sangre total de MTX115325 después de la administración oral de 15 mg/

kg y 50 mg/kg en el modelo A53T. n = 3 ratones por grupo. e Imágenes representativas que muestran señales de mito-QC en células SHSY-5Y, que se tiñeron con Hoechst para los núcleos (azul), después de exponerlas a MTX115325 a 0,333 μM durante 20 minutos. Barra de escala, 20 μm . Las imágenes sin recortar se presentan en la Fig. 9 complementaria. f Cuantificación del índice de mitofagia con tratamiento con MTX115325 (n = 3 experimentos independientes, con tres réplicas técnicas que capturan 11 campos de visión). Análisis estadístico mediante ANOVA unidireccional con prueba post-hoc de Dunnett. Las barras de error representan la media \pm DE; *P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001. Los datos de origen se proporcionan como un archivo de datos de origen.

Tabla 1 | Selectividad de MTX115325 USP30i

Enzima	CI50 (µM)
USP2	24.9
josp1	31.0
Catepsina L	42.1
CD USP21	60,7
USP16	83,7
USP25	93.2
USP6	96,3
USP28	106.1
USP10	107.2
Catepsina K	109.9
USP32	120.2
USP22	147,3
CD USP36	157,3
josp2	159,5
ATXN3L	172,5
Catepsina B	205.1
USP47	212,5
Catepsina V	247,5
Catepsina S	259,6
USP19	277,5
USP11	290,9
USP8	>300
USPL1	>300
MINDY3	>300
USP24	>300
VCIPI FL	>300
OTUD6A	>300
USP48	>300
OTUB1/UBCH5B	>300
YOD1	>300
CILINDRO	>300
CEZANNE1	>300
CD SENP2	>300
UchL5	>300
USP4	>300
USP12/UAF1	>300
NÚCLEO USP34	>300
DESDE AQUÍ CD	>300
USP35	>300
UchL1	>300
UchL3	>300
USP9x	>300
USP46/UAF1	>300
CD SENP1	>300
PERO2	>300
USP7	>300
BAP1	>300
OTUD5(p177S)	>300
USP13	>300
MINDY2	>300
CD OTUD3	>300
USP15	>300
USP14	>300
USP1	>300
Trabido	>300

Cuadro 1 (continuación) | Selectividad de MTX115325 USP30i

Enzima	CI50 (µM)
USP20	>300
USP5	>300
OTUD6B	>300
SENP6	>300

La tabla muestra la mitad de la concentración inhibitoria máxima (CI50) de MTX115325 para obtener una lista de enzimas.

En conjunto, estos resultados muestran que la inhibición de USP30 por MTX115325 recapitula los efectos de Usp30 KO en la protección contra Pérdida neuronal TH+ y pérdida de dopamina estriatal en una EP basada en α Syn modelo de ratón.

Discusión

El estudio actual investigó los efectos de la pérdida o inhibición de Usp30, con un potente inhibidor selectivo USP30, MTX115325, en un modelo de degeneración dopaminérgica crónica impulsada por α Syn. Nosotros mostramos que inhibición in vivo de USP30, mediante eliminación genética o molécula pequeña inhibición, representa una estrategia viable para mejorar la eliminación de mitocondrias dañadas a través de la mitofagia en este ratón basado en α Syn Modelo PD.

Apuntamos a USP30 para controlar experimentalmente los niveles de mitofagia mediante la desactivación genética de Usp30 y por la inhibición farmacológica de la actividad catalítica de USP30. USP30 es una deubiquitilasa, que contrarresta los efectos de PARKIN eliminando la ubiquitina de las proteínas de la membrana externa mitocondrial^{39,54}. Cisteinil proteasa USP30 la actividad catalítica prefiere cadenas de ubiquitina unidas a Lys643. Estudios recientes han mapeado ampliamente la membrana mitocondrial externa (OMM) sustratos, que incluyen varios miembros de la TOM (translocasa de membrana mitocondrial externa), proteínas de la familia VDAC (canal selectivo aniónico dependiente de voltaje), CISD1 (CDGSH dominio hierro azufre 1), y FKBP8 (FKBP proil isomerasa 8) entre otros^{41,42}. La eliminación del gen Usp30 regula positivamente la mitofagia y aumenta la eliminación de mitocondrias dañadas en neuronas inducidas derivado de células madre embrionarias y en neuroblastoma SH-SY5Y células^{41,42}. De interés, dado el fuerte vínculo entre TOM20 y vías de vesículas derivadas de mitocondrias^{55,56}, USP30 puede interactuar con vesículas derivadas de mitocondrias (MDV) para provocar más mitocondrias control de calidad⁵⁷. La USP30 también puede desempeñar un papel en la regulación de la abundancia/rotación de peroxi-algo⁵⁸. USP30 puede afectar la función mitocondrial a través de la mitofagia y la traducción de proteínas mitocondriales en Linfocitos T citotóxicos (CTL)⁵⁹. No hemos explorado ninguno de estos mecanismos en el estudio actual y no podemos excluir su potencial papel en los resultados beneficiosos para Usp30 KO/inhibición. Otros DUB, incluyendo USP13, USP14, USP15, USP33 y USP35, también han sido Se sugiere que tiene efectos antagonizantes sobre la ubiquitilación y mitofagia mediadas por PARKIN y se sabe que ligasas E3 adicionales pueden para ubiquitilar las mitocondrias^{54,60–64}, aunque con consenso limitado entre múltiples grupos independientes.

Encontramos que la desactivación del gen Usp30 en ratones condujo a un aumento Niveles basales de mitofagia en neuronas dopaminérgicas en el SN. Nuestro Los resultados en los ratones Usp30 KO se alinean con los datos de Phu et al. 1, cual demostró que el agotamiento de USP30 aceleró la mitofagia y condujo a aumento de la respiración basal pero reducción de la capacidad de reserva en las neuronas del hipocampo, destacando que USP30 juega un papel crucial en la regulación de la homeostasis mitocondrial y su ausencia influye Metabolismo mitocondrial y mitofagia en las neuronas.

La sobreexpresión de α Syn induce sinucleinopatía en las neuronas dopaminérgicas y afecta la función mitocondrial y, por lo tanto, es una opción adecuada. modelo para probar si una estrategia de regulación de la mitofagia podría proteger contra Toxicidad α Syn. La disfunción mitocondrial juega un papel central en la patogénesis de la neurodegeneración dopaminérgica en la EP. Los productos

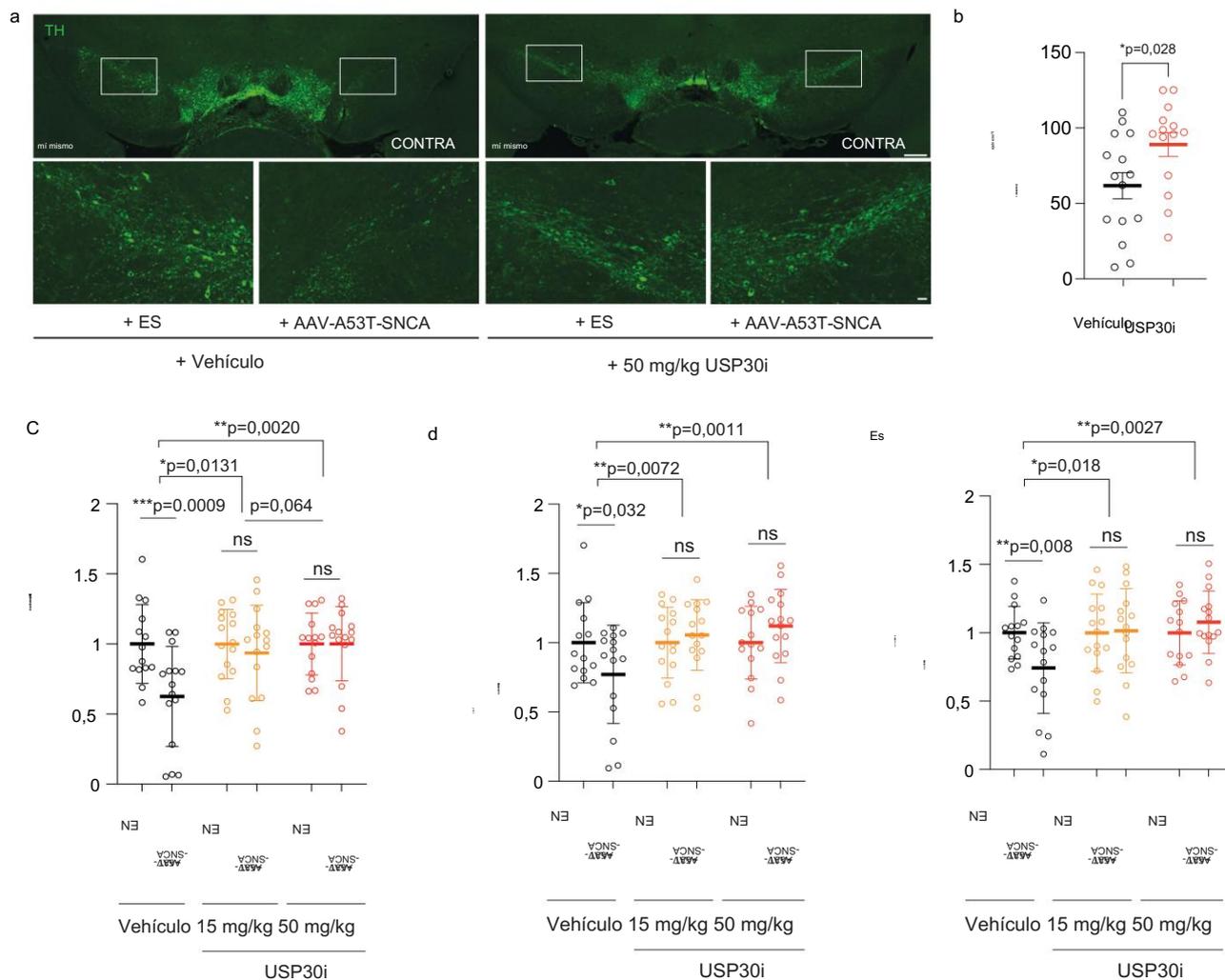


Figura 5 | La inhibición farmacológica de USP30 con MTX115325 previene la pérdida neuronal dopaminérgica y el agotamiento de dopamina en un modelo de ratón con EP basado en α -sinucleína. **a** Imágenes de inmunofluorescencia representativas de TH en el SNpc de ratones macho. Entradas ampliadas en paneles inferiores. Barra de escala, 1 mm para paneles superiores, 10 μ m para paneles inferiores. **b** Porcentaje de neuronas dopaminérgicas en el lado inyectado de AAV-A53T-SNCA versus el lado no inyectado (NI). $n = 15$ para el grupo de vehículos, $n = 14$ para el grupo USP30i. Importancia determinada mediante prueba T no apareada (de 2 colas). Las barras de error representan la media \pm sd * $P < 0,05$. **c** Niveles relativos de dopamina en el cuerpo estriado de ratones macho 10 semanas después de la inyección ($n = 14, 15, 15, 15, 14, 15$ para vehículo+NI, vehículo+SNCA, USP30i 15 mg/kg+NI, USP30i 15 mg/kg+SNCA, USP30i 30 mg/kg+NI, USP30i 30 mg/kg+SNCA respectivamente). Las barras de error representan la media \pm DE * $P < 0,05$;

** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$. **d** Niveles relativos de DOPAC en el cuerpo estriado de ratones macho 10 semanas después de la inyección ($n = 14, 15, 15, 15, 14, 15$ para vehículo+NI, vehículo+SNCA, USP30i 15 mg/kg+NI, USP30i 15 mg/kg+SNCA, USP30i 30 mg/kg+NI, USP30i 30 mg/kg+SNCA respectivamente). Las barras de error representan la media \pm DE * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$. **e** Niveles relativos de HVA en el cuerpo estriado de los ratones macho 10 semanas después de la inyección ($n = 14, 15, 15, 15, 14, 15$ para vehículo+NI, vehículo+SNCA, USP30i 15 mg/kg+NI, USP30i 15 mg/kg+SNCA, USP30i 30 mg/kg+NI, USP30i 30 mg/kg+SNCA respectivamente). Importancia de las comparaciones ipsi versus contra determinada mediante ANOVA de 2 vías con Fisher LSD sin corregir. Importancia de las comparaciones de ipsi frente a ipsi determinada mediante ANOVA de 2 vías con la prueba post-hoc de Dunnett. Las barras de error representan la media \pm DE; * $P < 0,05$; *** $P < 0,01$. Los datos de origen se proporcionan como un archivo de datos de origen.

de varios genes familiares relacionados con la EP, incluidos PARKIN, PINK1, LRRK2, DJ-1 y UCHL-1, regulan directamente la homeostasis mitocondrial^{44,65–68}. Las neurotoxinas relacionadas con el parkinsonismo, incluidas la 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), la rotenona, el paraquat y la 6-hidroxidopamina, inhiben directamente la función mitocondrial y, en última instancia, disminuyen la viabilidad neuronal⁶⁹. α Syn se une a la membrana mitocondrial a través de su extremo N lipófilo, altera los poros de transición de permeabilidad mitocondrial (mPTP) y disminuye el potencial de la membrana mitocondrial y la viabilidad celular⁷⁰. α Syn también se une a TOM20 en la membrana mitocondrial y bloquea la importación de proteínas²⁴. La acumulación de WT y A53T α Syn y la disminución de la actividad del complejo I mitocondrial se encuentran en neuronas dopaminérgicas fetales humanas que sobreexpresan α Syn⁷¹. Además, el α Syn acumulado se encuentra en las mitocondrias aisladas del SN y el cuerpo estriado de pacientes con EP, pero no en otras regiones del cerebro o en muestras de cerebro de controles sanos⁷¹, y también se detecta en el SN, el putamen, la amígdala y el hipocampo en secciones del cerebro de

Pacientes con enfermedad de cuerpos de Lewy (LBD)⁷². Además, los oligómeros pequeños de α Syn inducen la fragmentación mitocondrial independiente de la proteína de fisión DRP1 en neuronas in vitro e in vivo⁷³. La sobreexpresión de A53T α Syn humano produce daño y pérdida mitocondrial extensos, lo que conduce a déficits bioenergéticos y neurodegeneración en el cultivo neuronal primario⁷⁴. Más recientemente, se utilizaron neuronas derivadas de iPSC que albergaban mutaciones A53T de pacientes con EP para demostrar la oligomerización y la posterior agregación de α Syn desencadenada por lípidos mitocondriales (cardiolipina) y por ROS⁷⁵ generado mitocondrialmente. Estos hallazgos indican que α Syn induce disfunción mitocondrial, lo que nos lleva a probar una estrategia para mejorar la mitofagia mediante la eliminación/inhibición de USP30 como una posible estrategia neuroprotectora en un modelo de EP de ratón basado en α Syn de degeneración lenta.

Hemos probado además la vulnerabilidad de estos ratones a la toxicidad de α Syn mediante el uso de un modelo de ratón con sobreexpresión de AAV-A53T-SNCA que recapitula características clave de la EP, incluidos los déficits motores, la dopamina.

agotamiento en el cuerpo estriado y sinucleinopatía, de forma crónica a las 28 semanas posteriores a la inyección del vector. Usp30 KO previno con éxito el desarrollo de déficits motores inducidos por α Syn en ratones machos y hembras con inyecciones de AAV-A53T-SNCA. La protección de la función motora en ratones Usp30 KO fue consistente con una pérdida atenuada de neuronas TH+ en el SNpc, la preservación de la dopamina y sus metabolitos en el cuerpo estriado, una disminución significativa de la acumulación de fosfo-S129 α Syn y una mayor eliminación de fosfo-S129 α Syn deteriorada. mitocondrias en neuronas SNpc dopaminérgicas. Estos datos demuestran colectivamente que la ausencia de USP30 en los ratones Usp30 KO conduce a una mayor mitofagia y una potente protección contra la toxicidad de α Syn.

Con respecto a otros inhibidores de USP30^{42,76}, se encontró que un compuesto de N-cianopirrolidina, FT3967385, aumenta significativamente la ubiquitilación de TOM20 y los niveles de mitofagia, lo que es comparable a los efectos de la pérdida genética del gen Usp30 en células de neuroblastoma SHSY5Y, lo que respalda la noción de que la actividad catalítica de USP30 es importante para modular la mitofagia⁴². Si bien algunos derivados sintéticos de fenilalanina racémica, MF-094 y MF-09577, y un inhibidor de benzosulfonamida, CMPD-3978, también han sido identificados como inhibidores de USP30 en [ensayos bioquímicos](#)^{77,78}, no se ha observado actividad in vivo de ninguna de estas moléculas. informó. Este estudio describe el inhibidor potente y selectivo de la USP30, MTX115325, un inhibidor de la USP30 altamente selectivo con buenas propiedades similares a las de un fármaco, penetración in vivo en el SNC y un buen perfil toxicológico exploratorio. Como se esperaba, MTX115325 activa la mitofagia en células SH-SY5Y in vitro, en una magnitud similar a la observada por otros inhibidores de USP30⁴². Hemos utilizado MTX115325 para probar el efecto de la inhibición de la actividad catalítica de USP30 para complementar los datos generados en ratones Usp30 KO. La inhibición de la actividad catalítica de USP30 con MTX115325 conduce a una protección sólida de las neuronas TH+ en el SNpc y a la preservación de la dopamina y sus metabolitos en el cuerpo estriado, lo que coincide con los efectos protectores resultantes de la KO de Usp30. Nuestros resultados resaltan que la inhibición de la actividad catalítica de USP30 es prometedora como una posible estrategia terapéutica para la EP. En particular, el fenotipo exhaustivo de los ratones Usp30 KO (ver Datos complementarios 1) no reveló patologías manifiestas adversas en los ratones Usp30 KO y, en contraste, hubo beneficios potenciales para la salud contra la acumulación de grasa en el hígado relacionada con la edad, lo cual es consistente con otro estudio. Un estudio muestra que el agotamiento de USP30 atenúa la lipogénesis y protege contra la tumorigénesis en el hígado⁷⁹.

A pesar de estos interesantes resultados, el estudio tiene algunas limitaciones y direcciones futuras que nos gustaría investigar. No implementamos el sistema de investigación estereológico para el conteo neuronal TH+. El software QuPath puede identificar todas las neuronas positivas en una región cerebral designada y contar todas las neuronas de manera eficiente e imparcial^{80–82}. Datos anteriores demuestran que la estimación estereológica de neuronas dopaminérgicas en el SNpc del cerebro de ratón con el software ImageJ utilizando el método que empleamos es comparable con el recuento estereológico convencional con el método del fraccionador óptico⁸³. En el modelo genético, observamos que la expresión del mutante α Syn no afectó el nivel basal de mitofagia independientemente de la pérdida de USP30; Esto también puede deberse en parte a cambios que ocurren antes de nuestro punto de análisis seleccionado y que no podemos explicar en un modelo crónico que abarca 28 semanas para el análisis de mitofagia. En los estudios USP30i MTX115325, sólo se contaron las células TH+ con núcleo. El aumento de la mitofagia demostrada en ratones Usp30 KO y con MTX115325 in vitro plantea la posibilidad de que la mitofagia pueda ser en parte responsable del impacto de la inhibición de USP30 en la reducción de la patología α Syn in vivo, potencialmente a través de la degradación preferencial de las mitocondrias con S129- α Syn unido a la superficie. Sin embargo, no hemos establecido los mecanismos de este efecto; por ejemplo, existe evidencia de que la calidad mitocondrial puede afectar las propiedades de agregación de α Syn a través de la concentración de cardiolipina en la membrana lipídica⁷⁵ y el activador PINK1 en modelos de fibrillas preformadas (PFF) de α Syn⁸⁴. Además, la USP30 puede estar localizada en parte en los peroxisomas y puede desempeñar un papel en [la pexofagia](#)^{58,78,85}, aunque no se ha demostrado el papel de la pexofagia en la EP.

establecido. USP30 afecta la homeostasis de las mitocondrias en el linfocitos T citotóxicos (CTL) y es importante para mantener la capacidad de destrucción de los CTL contra las células diana⁵⁹. Finalmente, se desconocen las posibles interacciones de Usp30 KO con otros genes relacionados con la EP y deberían explorarse en el futuro.

En conclusión, utilizamos una estrategia para aumentar la mitofagia mediante la eliminación de Usp30, obteniendo resultados similares con un inhibidor farmacológico de USP30. Estas estrategias para reducir la USP30 conducen a una mayor mitofagia y una potente protección contra la toxicidad de α Syn. Este trabajo valida la inhibición de USP30 como una estrategia prometedora para realizar más pruebas de posibles efectos modificadores de la enfermedad en la EP.

Métodos Diseño

del estudio El

objetivo principal de este estudio fue investigar los efectos de la desactivación de Usp30 o la inhibición farmacológica en un modelo de ratón con EP basado en α Syn. Estudios anteriores han demostrado el papel de USP30 en la regulación de la mitofagia en [las células](#)^{39–41,58} y los efectos protectores de la eliminación de Usp30 en un modelo de drosophila deficiente en PARKIN39. El estudio actual demuestra el papel de USP30 en la regulación de la vía de la mitofagia en el cerebro de ratón. Además, muestra los efectos protectores de la desactivación de Usp30 contra la α -sinucleinopatía y la neurodegeneración dopaminérgica en un modelo de mamífero basado en α Syn. El vector AAV1/2-A53T α Syn se utilizó para sobreexpresar α Syn mutante A53T humano para inducir sinucleinopatía progresiva y neurodegeneración dopaminérgica en el cerebro de ratón. El tamaño de la muestra del estudio y los criterios de valoración de los experimentos se basaron en estudios publicados previamente y en nuestros resultados preliminares. Los compañeros de camada de la misma edad fueron asignados aleatoriamente a grupos de tratamiento o de control. En el estudio se incluyeron tanto mujeres como hombres, y el análisis estadístico se realizó siguiendo la [política de sexo como variable biológica \(SABV\) de 2015 de los NIH](#)^{86–88}. La dosis del fármaco se determinó como se describió anteriormente⁷¹. Todos los análisis se realizaron a ciegas.

Animales

Información ética. Los estudios con ratones en el Wellcome Sanger Institute (WSI) se realizaron de acuerdo con las regulaciones del Ministerio del Interior del Reino Unido y la Ley de Animales (Procedimientos Científicos) del Reino Unido de 2013 bajo licencias del Ministerio del Interior del Reino Unido. La Junta de Revisión Ética y Bienestar Animal de WTSI aprobó estas licencias. Los estudios con ratones en BIDMC fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales local (IACUC, número de protocolo animal 018-2019). En los laboratorios Charles River Finland (número de protocolo animal C0610721), el trabajo con ratones se realizó de acuerdo con todas las directrices nacionales, internacionales y/o institucionales aplicables para el cuidado y uso de animales (legislación nacional finlandesa): (1) Ley sobre la protección de animales utilizados con fines científicos o educativos (497/2013) (2) Decreto gubernamental sobre la protección de animales utilizados con fines científicos o educativos (564/2013) (3)

Licencia para experimentos con animales aprobada por la Junta Nacional de Experimentos con Animales: 18537-2018. Legislación y directrices europeas e internacionales: (1) Directiva 2010/63/UE (2) Recomendación de la Comisión 2007/526/CE (3) Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio (Guía), octava edición (Consejo Nacional de Investigación 2011).

Vivienda y ganadería. En BIDMC, todos los ratones, incluidos los ratones homocigotos (QC) mito-QC y los ratones homocigotos knockout mito-QC/Usp30 (QC/Usp30 KO) y los compañeros de camada de tipo salvaje (WT), se criaron y alojaron bajo una luz de 12 h/12 h. ciclo oscuro. La temperatura ambiente fue de 21 \pm 2 °C y la humedad de 55 \pm 10%. La mutación knock-in de GFP-mCherry en la línea QC y la mutación knock-in de Usp30 se confirmaron con el genotipado del tejido de la muesca de la oreja a los 21 días de edad. Un total de 183 ratones (n = 11–16 para 12 grupos de ratones de 12 semanas de edad, 6 grupos de machos y 6 de hembras: WT-Null, WT-SNCA, QC-Null, QC-SNCA, QC/KO-Null, QC /KO-SNCA) para inyección estereotáxica y 27 ratones macho (13 ratones mito-QC y 14 ratones mito-QC/Usp30 KO, 20 semanas de edad) para análisis de mitofagia. Los ratones fueron sacrificados por inhalación de dióxido de carbono.

Artículo

en el BIDMC. Los experimentos con el compuesto USP30i MTX115325 se realizaron bajo contrato en los laboratorios Charles River Finland. En WSI, los ratones se mantuvieron en una unidad específica libre de patógenos en un ciclo de 12 h de luz y 12 h de oscuridad con las luces apagadas a las 19:30 y sin período de crepúsculo. La temperatura ambiente fue de 21 ± 2 °C y la humedad de $55 \pm 10\%$. Los ratones se alojaron utilizando una densidad de población de 3 a 5 ratones por jaula en jaulas con ventilación individual (Tecniplast, Sealsafe 1284 L), recibiendo 60 cambios de aire por hora. Además del sustrato de cama Aspen, se proporcionó el enriquecimiento ambiental estándar de dos Nestlets, un divertido túnel de cartón y tres bloques de madera para masticar. Los ratones recibieron agua y dieta ad libitum. Los animales fueron sacrificados mediante anestesia profunda con pentobarbital (180 mg/kg, ip).

Generación de ratones y fenotipado. Todos los ratones tienen el trasfondo genético C57BL/6 N. Los ratones Usp30 KO se fenotiparon inicialmente como parte de los procesos estandarizados del Proyecto de Genética del Ratón (MGP) en el Instituto Wellcome Sanger (WSI)⁸⁹. El enfoque (ver Fig. 1) fue generar un "alelo knockout primero". Esta estrategia se basó en identificar el exón 4 de Usp30 común a todas las variantes de transcripción, aguas arriba del cual se insertó un casete LacZ para crear una "trampa genética" constitutiva conocida como alelo condicional tm1a. El alelo constitutivo Usp30 KO (tm1b) se creó mediante una mutación de cambio de marco tras la eliminación mediada por Cre de los sitios LoxP que flanquean el exón 4 mediante el uso de proteína CRE soluble en el cigoto del ratón.

La pantalla de fenotipado de alto rendimiento consiste en pruebas estandarizadas realizadas de acuerdo con procedimientos operativos estándar (POE) en todos los ratones que ingresan a la pantalla. Se evaluó una amplia gama de áreas biológicas, incluido el metabolismo, los sistemas cardiovascular, neurológico y conductual, los sistemas óseo, sensorial y hematológico, así como la química del plasma. Los POE están disponibles en IMPReSS (www.mousephenotype.org/impress) tardizados en función de los factores que se prevé que los afectarán. Sin embargo, se tomaron medidas para reducir posibles sesgos, como². Cuando fue posible, las variables se estandarizaron. el impacto de diferentes personas que realizan la prueba (conocido como "operador minimizado") y la hora del día de la prueba, según lo definido por Mouse Experimental Design Ontology (MEDO)⁹⁰. Los datos capturados con la ontología MEDO se pueden encontrar en <http://www.mousephenotype.org/about-impc/arrive-guidelines>. Los criterios de inclusión/exclusión de datos también se estandarizaron definiendo razones preestablecidas para las fallas del control de calidad (p. ej., muestra insuficiente, error del equipo). Para auditar los datos con errores de control de calidad, todos los datos descartados se conservaron y se rastrearon en la base de datos. Se fenotiparon ratones de tipo salvaje (control) a intervalos regulares según su edad, sexo y cepa. Generamos al menos siete ratones homocigotos por sexo para el fenotipado. El análisis estadístico tuvo en cuenta todas las variables y se realizó mediante un modelo lineal de efectos mixtos y se presenta en el archivo de Datos complementarios 1.

Cultivo celular Las

células SH-SY5Y que expresan de manera estable el reportero mCherry-GFP-Fis1101-152 (SH-SY5Y mito-QC) proporcionadas amablemente por el Dr. I Ganley (MRC PPU, Dundee) se cultivaron en medio DMEM/F12 suplementado con L-glutamina al 1%, 1% penicilina/estreptomicina, 1% aminoácidos no esenciales, 10% suero fetal bovino a 37 °C y 5% CO₂.

Cultivo de neuronas dopaminérgicas. Las

líneas DopaNeuron derivadas de donantes se generaron a partir de material fuente proporcionado por la Iniciativa de Marcadores de Progresión de Parkinson (PPMI) a través de la Fundación Michael J. Fox. Las DopaNeurons derivadas de células iPS humanas se adquirieron de Fujifilm/Cellular Dynamics.

Neuronas dopaminérgicas (dopaneuronas) derivadas de iPSC aparentemente sanas normales (AHN) (n.º de catálogo R1088) o mutadas con alfa-sinucleína A53T (A53T) (n.º de catálogo R1109) se descongelaron a partir de nitrógeno líquido. Se sembraron 400.000 dopaneuronas viables (contadas usando un contador de células) (contadas usando un contador de células) por pocillo en placas de 24 pocillos el día 0 en medio de mantenimiento completo (CMM).

Se realizó un cambio medio de medio en las células el día 3 con CMM. El día 5, las células se cambiaron a la mitad del medio con medio Brainphys completo. Las células se trataron el día 7 (para estudios de células de 2 semanas) o el día 14 para tratamientos de 7 días con MTX115325, cuando se llevó a cabo un cambio de medio completo con medio Brainphys + DMSO o MTX115325 (0,01, 0,1 o 1 μ M). A las células se les dieron cambios de medio medio con o sin compuestos (dependiendo de si se habían iniciado tratamientos con compuestos) cada 2-3 días.

Materiales Los

vectores AAV1/2-CMV/CBA-Human A53T α Syn-WPRE-BGH-polyA (GD1001-RV) y AAV1/2-CMV/CBA-Empty-WPRE-BGH-polyA (GD1004-RV) se adquirieron de Vigene Biosciences, μ AM/SAR-CBA-Human α Syn(A53T)/HA-WPRE-BGH-polyA (para estudio de compuestos) se adquirió de GeneDetect Ltd. Los siguientes anticuerpos se usaron para inmunotinción o inmunotransferencia; anti-GFP (Aves Labs Inc, catálogo n.º GFP-1010, lote n.º GFP3717982, dilución 1:500), anti-mCherry (EMDmillipore, catálogo n.º AB356482, lote n.º 3249537, dilución 1:500), anti-TH (Estudios de KO: EMDmillipore, n.º de catálogo AB152, n.º de lote 3870479, dilución 1:1000; estudio de compuestos: Abcam, n.º ab76442, n.º de lote GR3393939-2, dilución 1:1000), anti-USP30 (Santa Cruz Biotechnology, clon B-6, n.º de catálogo sc-515235, n.º de lote C2620, dilución 1:1000, validación de Usp30 KO; reactivos y servicios de MRC PPU, n.º S746D, lote n.º 4, dilución 1:600, ensayo de unión de sonda de ubiquitina celular), anti-LAMP1 (Invitrogen, clon eBio1D4B, catálogo n.º 14-1071-82, lote n.º 2162716, dilución 1:500), anticuerpo anti-alfa-sinucleína (fosfo S129) (Abcam, clon 81 A, catálogo n.º ab184674, lote n.º GR3407805-1, dilución 1:1000), anticuerpo anti-alfa-sinucleína (fosfo S129) (Abcam, clon EP1536Y, n.º de catálogo ab51253, n.º de lote GR3437967-8, dilución 1:1000), anti- α -sinucleína (humana) anticuerpo monoclonal (15G7) (ENZO, clon 15G7, número de catálogo ALX-804-258, número de lote 12071802, dilución 1:500), anti-OPA-1 (BD Transduction Laboratories, clon 18, número de catálogo 612606, número de lote 8066752, Dilución 1:1000), anti-beta-actina (Santa Cruz Biotechnology, clon 2A3, n.º de catálogo sc-517582, n.º de lote A1118, dilución 1:1000), anti-TOM20 (D8T4N) (Señalización celular, clon D8T4N, n.º de catálogo 42406, lote n.º 4, dilución 1:1000), los anticuerpos secundarios Alexa Fluor (dilución 1:500) eran de Invitrogen, los anticuerpos secundarios conjugados con HRP (dilución 1:1000) eran de tecnología de señalización celular, el anticuerpo secundario biotinilado (1:1000 dilución) de Vector Laboratories. Ub-Lys TAMRA para ensayos bioquímicos USP30 (Almac, síntesis personalizada), HA-Ahx-Ahx-Ub(1-75)- Sonda VME para ensayo de unión de sonda de ubiquitina celular (Almac, AUB-151), Human His6-USP30 (57-517) (Boston Biochem, n.º E-582), ratón USP30(57-517) (Boston Bio-chem, n.º E-582M), antimicina A (Sigma, n.º A8674), oligomicina A (Sigma, n.º 495455), triclorfón (Sigma, #45698). La ruta sintética y los métodos analíticos de MTX115325 se detallan en la solicitud de patente WO2021/249909A1. Kit de extracción genómica DNeasy de Qiagen, kit de PCR Hot Start Polymerase adquirido de EMDmillipore (n.º de catálogo TB341-KOD) y pares de cebadores sintetizados de Sigma Aldrich. El BLOXALL, el kit ABC, el kit DAB y el medio de montaje antidecoloración Vectashield se adquirieron de Vector Laboratories.

Par de cebadores para Usp30 de tipo salvaje: 5'-CTTGGGAAGGGATCTTGTGC-3', 5'-GTCTCGGTGACTTCTTGGC-3'; Par de cebadores para Usp30 mutante: 5'-CTTGGGAAGGGATCTTGTGC-3', 5'-TCGTGTATCGTTATGCGCC-3';

Par de cebadores para la construcción GFP-mCherry-FIS1: 5'-CAAA-GACCCCAACGAGAAGC-3', 5'-CCCAAGGCACAAAAAACC-3', y control de tipo salvaje: 5'-CTCTCCCTCGTGTACTGCAACTCC-3', 5'-CATGTCTTAACTACCTCGATGG-3'.

Vectores adenoasociados (AAV) 1/2 inyección estereotáxica Para estudios knockout, se anestesiaron animales de 12 semanas de edad con ketamina/xilazina y se colocaron en un marco estereotáxico (myNeuroLab, Leica Microsystems) con un adaptador para ratón. Se administraron 2 μ l de vector AAV suspendido (1 \times 10¹⁰ copias del genoma viral) a una velocidad de 50 nl/segundo a través de una micropipeta de vidrio extraída (World Precision Instruments) en el SNpc derecho con coordenadas estereotáxicas.

(AP: -3,0 mm, ML: -1,3 mm, DV: +4,7 mm). Después de un período de 5 minutos en el que la pipeta permanece en su lugar después de la dispensación del virus, la pipeta se retrae lentamente.

Para el estudio de inhibidores farmacológicos, se anestesiaron ratones macho de aproximadamente 10 semanas de edad y se colocaron en un marco estereotáctico en un sistema de manta homeotérmica con una temperatura central mantenida a 37,0 °C. Una aguja de inyección roma (30 G) conectada a una microjeringa Hamilton de 25 µL montada en una unidad de infusión guiada digitalmente (Digital Lab Standard™, Harvard Apparatus) y una bomba (Pump 11, Elite Nanomite, Harvard Apparatus) se bajó al nivel de SNC. Se infundieron unilateralmente 2 µL de AAV-A53T (5 × 10¹² genomas virales/mL) en el SNC derecho a una velocidad de 0,2 µL/min utilizando una microbomba de infusión en las siguientes coordenadas (AP/ML en relación con el bregma) AP - 3,0 mm (posterior desde bregma), ML 1,3 mm, DV -4,2 mm (desde la superficie del cerebro). Después de un período de 5 minutos en el que la pipeta permanece en su lugar después de la dispensación del virus, la pipeta se retrae lentamente durante 1 minuto. Para el estudio de inhibidores farmacológicos, no se inyectó el virus de control en el hemisferio contralateral.

Dosificación de MTX115325 y muestreo de sangre en vida para mediciones de nivel de compuestos

MTX115325 se dosificó dos veces al día a intervalos de 12 h durante diez semanas después de la administración de AAV (la primera dosis se administró aproximadamente 6 a 8 h después de la inyección viral) mediante sonda oral en HPMC al 0,5 % p/v con Tween-80 al 0,1 % v/v, 10 ml/kg. Se tomaron muestras de sangre en vida a las 0,5, 1, 2, 4, 6 h, cronometradas en relación con la primera dosis diaria, de n = 3 animales por punto de tiempo para brindar un perfil compuesto de los animales de cada grupo. Las muestras de sangre en vida se recogieron de la vena safena (20 µL), se transfirieron inmediatamente a un tubo Eppendorf y se mezclaron con un volumen igual (20 µL) de inhibidor de serina esterasa enfriado con hielo, triclórfón (100 µM), congelado, almacenado a -80 °C y niveles de compuestos analizados por LC-MS.

Evaluación del comportamiento

La prueba del cilindro evaluó el uso espontáneo de las extremidades anteriores 28 semanas después de la inyección de AAV1/2. Los ratones se colocaron en un cilindro transparente de plexiglás de 12 cm de diámetro y 30 cm de altura y se grabaron en video durante 10 minutos o 30 veces de crianza, lo que ocurra primero. Los videos fueron calificados post-hoc por un observador cegado al genotipo y la condición del tratamiento. En cada cría de los ratones se analizó el número de toques de la superficie interna del cilindro con la extremidad derecha (ipsilateral), la izquierda (contralateral) o ambas al mismo tiempo. Los datos finales se presentaron como porcentaje de la extremidad anterior contralateral (izquierda) utilizada mediante cálculo con la ecuación: $(\text{extremidad anterior contralateral} + \text{ambas extremidades anteriores}) / (\text{extremidad anterior contralateral} + \text{extremidad anterior ipsilateral} + \text{ambas extremidades anteriores} \times 2) \times 100$. el porcentaje calculado refleja el uso asimétrico de la extremidad anterior afectada de la siguiente manera: 50 % = uso simétrico de ambas extremidades anteriores; <50% = preferencia de la extremidad anterior intacta (ipsilateral); >50% = preferencia de la extremidad anterior afectada (contralateral).

Inmunohistoquímica y tinción de inmunofluorescencia Para los estudios histológicos, el cerebro se extrajo después de una perfusión transcardial con solución salina tamponada con fosfato (PBS) seguida de paraformaldehído al 4% en PBS (pH 7,0). Luego, los cerebros se fijaron durante la noche en paraformaldehído al 4% en PBS antes de sumergirlos en sacarosa al 30% en PBS para criopreservar los cerebros en preparación para el corte en criostato. La inmunotinción se realizó en secciones coronales flotantes de 40 µm de espesor. Para la tinción con DAB, las secciones de cerebro se trataron previamente con BLOXALL (Vector Laboratories) durante 10 minutos para agotar las peroxidases endógenas. Luego, las secciones de cerebro se incubaron con anticuerpo primario a 4 °C durante la noche. Las secciones se procesaron con incubación de anticuerpos secundarios con o sin un kit ABC (Vector Laboratories) y 3'-diaminobencidina como cromógeno (DAB, Vector Laboratories) al día siguiente. Las secciones fueron montadas en

Portaobjetos de microscopio Superfrost Plus (Fisher Scientific) y cubiertos con medio de montaje antidecoloración Vectashield (Vector Laboratories) para imágenes de fluorescencia o deshidratados y cubiertos con medio Per-maslip (Alban Scientific) para el recuento neuronal.

Puntos de mitofagia y análisis de colocación Para los estudios de eliminación, se capturaron imágenes de fluorescencia con un microscopio confocal Leica STELLARIS 5 equipado con un objetivo de 63X. Los puntos de mitofagia se identificaron como señal de fluorescencia exclusiva de mCherry (puntos de mitofagia) en la Fig. 1 y la señal de fluorescencia de OPA-1 y LAMP1 colocalizada en Suppl. Figura 3c. Para el análisis de los puntos de mitofagia, las imágenes se procesaron mediante la función de análisis de partículas de ImageJ (NIH). Para el análisis de colocación, las imágenes se procesaron con el complemento JACoP (Just Another Colocalization Plugin) de ImageJ (NIH).

Para los estudios de inhibidores, se aplicaron imágenes en vivo al análisis de los puntos de mitofagia en células mito-QC SH-SY5Y. Se sembraron células SH-SY5Y mito-QC durante la noche a razón de 7000 células/pocillo en microplacas PhenoPlate de 96 pocillos de paredes negras en DMEM/F-12 (sin rojo fenol) suplementadas como anteriormente. Se incubaron células SH-SY5Y mito-QC con tinción viva NucBlue™ durante 20 minutos y luego se lavaron. Las células se trataron previamente con DMSO o MTX115325 0,037 µM - 1 µM durante 20 minutos antes del tratamiento con antimicina/oligomicina 0/0 µM, 0,1/0,1 µM o 1/1 µM (concentración final de DMSO 0,11%). Se tomaron imágenes de las células en vivo utilizando el Operetta CLS tipo HH1600 (modo óptico configurado en confocal, objetivo de agua 40x) en los puntos temporales 0 h, 4 h, 20 h, 24 h, 48 h y 72 h. Las imágenes se adquirieron utilizando la siguiente configuración de canal: mCherry; excitación 530/60 nm, emisión 570/650 nm, GFP; excitación 460/90 nm, emisión 500/650 nm, Hoechst; excitación 355/85 nm, emisión 430/500 nm. Para todas las condiciones probadas, la cuantificación de la mitofagia se realizó a partir de tres experimentos independientes (con tres réplicas técnicas que capturan 11 campos de visión, 6 pilas z).

Cuantificación de imágenes: para el análisis de la mitofagia, las imágenes se procesaron con el software de análisis Harmony utilizando la secuencia "SH-SY5Y-mito-QC_analysis 2". Para la identificación de mitolisosomas se realizaron los siguientes pasos de análisis: (1) Identificación de los núcleos celulares mediante tinción de Hoechst, (2) Identificación del citoplasma celular mediante una imagen de contraste de fase profunda (DPC), (3) Identificación de la red mitocondrial, mediante la función Ser-Bright en el canal mCherry dentro del citoplasma, (4) partición de la red mitocondrial usando la función FindSpots, (5) identificación de puntos mitofágicos con la red mitocondrial dividida, usando un umbral de relación mCherry:GFP de media >+3 estándar desviaciones de las células tratadas solo con DMSO durante 24 h.

Análisis de transferencia Western para estudios knockout.

Las muestras de tejido cerebral se homogeneizaron en tampón de lisis por radioinmunoprecipitación (RIPA) helado (Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, SDS al 0,1%, NP-40 al 1%, EDTA 2 mM), DTT 1 mM, PMSF 1 mM, Na3VO4 200 µM, NaF 50 mM) e inhibidores de proteasa (Roche) en hielo durante 20 min con sonicación breve y se centrifugaron a 15.600 × g durante 15 min. Los sobrenadantes se recogieron para análisis de inmunotransferencia. La concentración de proteínas de las muestras se determinó con un kit de ensayo de proteínas BCA (Thermo Fisher Scientific). Las muestras desnaturalizadas se calentaron a 70 °C en tampón de muestra NuPAGE LDS (Invitrogen) y se cargaron en geles NuPAGE Bis-Tris (Invitrogen) para la separación de proteínas. Después de la electroforesis, las proteínas se transfirieron del gel a una lámina de nitrocelulosa mediante electroforesis. La lámina se lavó con agua desionizada y se incubó durante la noche a 4 °C con un anticuerpo primario (consulte las fuentes de anticuerpos en el segundo párrafo de la sección Materiales y métodos). Luego, la hoja se incubó en presencia de anticuerpos secundarios conjugados con HRP al día siguiente y las inmunotransferencias se visualizaron utilizando un kit de quimioluminiscencia mejorado (Thermo Fisher Scientific). Todas las transferencias representativas utilizadas en las figuras se presentan en el archivo de datos de origen.

Artículo

Cuento neuronal y densitometría

Para el conteo neuronal en el estudio knockout, se seccionó el mesencéfalo de cada ratón utilizando una máquina criostática Leica en seis series de secciones coronales de 40 μm y una serie se tiñó con anticuerpos anti-TH para dopaminérgicos (TH+). conteo neuronal, respectivamente. Luego, las secciones cerebrales en serie se escanearon con el escáner de diapositivas digital NanoZoomer XR (Hamamatsu) para el recuento neuronal con el software QuPath v0.2.0 ([//qupath.github.io](https://qupath.github.io)) como se describió anteriormente⁴⁹.

Para la densitometría estriatal en el estudio knockout, se tomaron imágenes de secciones teñidas con TH utilizando un microscopio óptico equipado con una cámara (SPOT). Las imágenes se capturaron utilizando un objetivo de 10 \times y ajustes de exposición fijos. Se realizó una densitometría para cuantificar la intensidad de la inmunotinción con TH en el cuerpo estriado ipsilateral a la inyección estereotáxica y en el cuerpo estriado contralateral. La intensidad promedio de la tinción con TH en una región fija del cuerpo estriado se cuantificó con el software ImageJ (NIH). La densidad óptica relativa de las fibras TH+ se normalizó restando la intensidad de fondo de la corteza, y se calculó y utilizó para el análisis estadístico el porcentaje de densidad relativa ipsilateral sobre contralateral.

Para el estudio compuesto, las muestras del mesencéfalo fijadas, crioprotectadas y congeladas se seccionaron como secciones coronales a intervalos de 100 μm a través de SNpc y el área tegmental ventral (VTA) y se montaron en portaobjetos de vidrio. La sección se inició a -2,6 mm desde bregma y continuó hasta -3,7 mm desde bregma en el eje AP (coordenadas basadas en Franklin & Paxinos: The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates).

Para la inmunotinción, las secciones se tiñeron con anti-TH después de la permeabilización. Las secciones teñidas se escanearon con el escáner de portaobjetos Olympus VS120 y un analista de datos ciego las analizó con un sistema integrador VIS-Visiopharm (Visiopharm, Dinamarca). Todas las células de interés con núcleos visibles se etiquetaron manualmente y se contaron utilizando un APP (paquete de protocolo de análisis), escalado por espesor de sección e intervalo de sección para estimar la población celular total en el SNpc. Para la inmunotinción de la fosforilación de Ser129 αSyn , se utilizó la amplificación de TSA con el anticuerpo primario ab51253 (Abcam). Se utilizó un análisis ciego y se determinaron las células positivas por área. Para IHC IF dual de Iba1 (WAKO) y GFAP (ab4674 - Abcam), un analista de datos ciego escaneó y analizó las secciones teñidas. El análisis determina el porcentaje de área de tinción positiva [% de área = (área teñida/área de región) * (100)]. Para calcular el porcentaje del área teñida, se aplicó el mismo valor umbral a todas las secciones con la misma tinción de anticuerpos. Todos los píxeles por encima del valor umbral se consideraron positivos.

Todos los datos de densitometría estriatal y recuento neuronal para los estudios de KO e inhibidores fueron obtenidos por un investigador ciego al genotipo y al tratamiento.

Medición de dopamina y metabolitos de dopamina Para los estudios knockout, los ratones fueron sacrificados 28 semanas después de la inyección. Los cerebros se extrajeron rápidamente, se colocaron en una matriz cerebral fría y se cortaron en secciones coronales de 1 mm de espesor en hielo. Luego, las secciones se colocaron en solución salina helada. El cuerpo estriado se diseccionó a partir de estas secciones de 1 mm, se congeló rápidamente y se utilizó para el análisis por HPLC de dopamina y sus metabolitos en el Núcleo de Neuroquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Vanderbilt. Los niveles de dopamina y sus metabolitos se normalizaron a ng/mg de proteína y se analizaron estadísticamente con el software GraphPad Prism. Para el estudio de dosificación del compuesto, los ratones se sacrificaron diez semanas después de la inyección. Se homogeneizaron muestras de tejido congeladas rápidamente, los analitos se separaron mediante HPLC en una columna de fase reversa Kinetex EVO C-18 y los niveles de analitos se calcularon utilizando estándares externos y se expresaron como ng/g de tejido húmedo.

Ensayos de polarización de fluorescencia bioquímica de USP30 La enzima USP30 se diluyó en tampón de reacción (Tris HCl 40 mM, pH 7,5, Tween 20 al 0,005 %, BSA 0,5 mg/ml, BME 5 mM) para lograr una concentración final de 8 nM para USP30 humano y 10 nM para USP30 de ratón, se añadió el compuesto y se incubó durante 30 min a temperatura ambiente y luego

reacciones iniciadas por la adición de Ub-Lys-TAMRA (conc. final de 50 nM). La fluorescencia se midió inmediatamente después de la adición del sustrato y después de una incubación de 2 h en Pherastar Plus o FSX con λ Excitación 540 nm y λ Emisión 590 nm.

Ensayo de unión de la sonda de ubiquitina USP30 en células Las células Hela que sobreexpresan establemente YFP-Parkin se trataron con concentraciones apropiadas del compuesto de prueba o control de vehículo (DMSO) durante 1 hora a 37 °C. Los lisados de células enteras se prepararon raspando las células en PBS frío, centrifugando y lisando en tampón de lisis (Tris-base 50 mM, pH 7,5, cloruro de sodio 50 mM, NP-40 al 1%/Igepal CA-630, MgCl₂ 2 mM, Se incubó un lisado celular aclarado con glicerol al 10 %, β -mercaptoetanol 5 mM, minitablesas completas sin EDTA, tabletas PhosStop) con una concentración final de sonda HA-Ahx-Ahx-Ub-VME 2,5 μM durante 15 minutos a temperatura ambiente. La reacción se detuvo añadiendo 5x SDS de tampón de carga de muestra y hirviendo durante 5 minutos a 95 °C. Las proteínas se separaron en NUPAGE 4–12% Bis-Tris Gel transferido a nitrocelulosa y se detectó USP30 usando un anticuerpo de oveja anti-USP30 y un secundario anti-oveja de conejo y se visualizó usando reactivo ECL en un generador de imágenes GE LAS4000. La participación del objetivo se midió mediante la cuantificación de las bandas correspondientes a USP30 y USP30 unidas a la sonda Ub-VME y la expresión de esta proporción en comparación con el control tratado con vehículo.

Ensayo de ubiquitinación de células TOM20

Se trataron células Hela que sobreexpresaban YFP-Parkin con antimicina A 1 μM y oligomicina A (AA/OA) 1 μM y compuesto de prueba o DMSO durante 90 minutos. Después del tratamiento, se eliminó el medio y las células se lavaron en DPBS y luego se lisaron en tampón de lisis NP40 en hielo. Las proteínas se separaron en un gel NUPAGE 4–12% Bis-Tris, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se detectó TOM20 utilizando un anticuerpo anti-TOM20 y un anticuerpo anti-conejo de cabra secundario y se visualizaron utilizando reactivo ECL en un generador de imágenes GE LAS4000. Las bandas correspondientes a todas las formas de TOM20 ubiquitilado se cuantificaron y normalizaron con las mismas bandas para las células tratadas con AA/OA. Se midió el punto donde la señal es 1,5x el control AA/OA (EC1,5x) y la EC50.

Farmacocinética en ratones y análisis de CETSA cerebral en ratones.

El aclaramiento en ratones se calculó a partir de perfiles de compuestos sanguíneos después de la administración intravenosa de 2 mg/kg de MTX115325 y un muestreo secuencial de sangre de la vena de la cola, y la biodisponibilidad oral en ratones se calculó a partir de perfiles de compuestos después de una dosificación oral mediante sonda forzada de 10 mg/kg. kg MTX115325 y muestreo secuencial de sangre de la vena de la cola. Las estimaciones de K_{pu} en ratón se calcularon a partir de perfiles de compuestos de sangre y corteza prefrontal después de una dosis oral de 10 o 30 mg/kg mediante sonda forzada, con muestreo secuencial de sangre de la vena yugular y muestreo secuencial de líquido intersticial cerebral mediante una sonda de microdiálisis en la región prefrontal. corteza. Los niveles de fármaco medidos a partir del PFC se consideraron libres, mientras que los niveles de compuestos sanguíneos se multiplicaron por la fracción libre de sangre de MTX115325 para calcular los niveles de fármaco no unido.

Se trataron ratones macho C57BL/6 J de 6 a 8 semanas de edad por vía oral con vehículo (Tween-80 al 0,1 %/HPMC al 0,5 %) o 10 mg/kg por vía oral de MTX115325 en un volumen de 10 ml/kg. Los animales se sacrificaron mediante sobredosis de isoflurano seguida de dislocación cervical 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h o 24 h después de la dosificación seguida de perfusión transcardial con PBS helado/EDTA al 10%. Se recogieron sangre entera y corteza y se congelaron en hielo seco. Las muestras se almacenaron a -80 hasta su procesamiento.

La participación del objetivo se midió mediante el ensayo de termodesplazamiento celular con tecnología de ensayo CETSA® (bajo licencia de Pelago Biosciences, Suecia). Las muestras de corteza cerebral se sometieron a choque térmico calentando a 46 °C durante 8 minutos en PBS libre de Mg⁺ y Ca²⁺ con PIC, Phospho-stop y PMSF 1 mM. Inmediatamente después del choque térmico, las muestras se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido. Las muestras se descongelaron en hielo y se homogeneizaron durante 2 \times 45 s en un homogeneizador de tejidos Retsch MM 400. Se añadió 0,4% de NP40 (concentración final) a los lisados antes de someterlos

tres ciclos de congelación y descongelación. Se retiraron alícuotas de muestras para determinar la concentración de proteína BCA antes de centrifugar las muestras a 17.000 × g durante 20 minutos y almacenar el sobrenadante a -80 C hasta la transferencia Western. Las membranas se lavaron con TBS-T y luego se bloquearon con TBS-T de leche al 10 % durante 30 minutos antes de la adición del anticuerpo USP30 (anti-USP30 policlonal de oveja (Universidad de Dundee) 1:500 en C en un TBS-T con 5% de leche) e incubación a las 4 °C en un agitador durante 2 noches. del último día, el anticuerpo USP30 se incubó a temperatura ambiente en la transferencia durante 1 h antes del lavado. El reactivo de detección ECL se utilizó durante 5 minutos antes de revelarlo en un generador de imágenes LAS AI600. Cuando las muestras se procesaron en varios geles, se utilizaron muestras de evaluación comparativa con la misma muestra procesada en cada gel. La estabilización de USP30 se determinó mediante cuantificación de transferencia Western, normalizada con la muestra de referencia y luego con HSC70 como control de carga. Los datos se presentan como promedios para cada grupo. Se calcularon el USP30 absoluto y el cambio con respecto al promedio del vehículo. La participación en el objetivo USP30 se informó como un rango porcentual, donde el promedio del grupo dosificado con vehículo fue igual al 0 % y el grupo con el cambio máximo promedio de participación en el objetivo por encima del vehículo fue igual al 100 %. Rango de porcentaje calculado: $(x-\min)/(\max-\min)*100$.

Análisis estadístico El

análisis estadístico se realizó en Prism 9 (GraphPad) y R.

Más diferencias significativas entre los dos grupos se realizaron con una prueba t de Student de varianza igual no apareada y de dos colas a menos que.

Se utilizaron pruebas no paramétricas U de Mann-Whitney cuando no se cumplieron los supuestos de la prueba t. $P < 0,05$ se consideró una diferencia estadísticamente significativa. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ y **** $P < 0,0001$. El valor de n por grupo se indica dentro de la leyenda de cada figura. Los datos fenotípicos del canal de análisis estadístico presentados en los Datos complementarios 1 y la Figura 1 complementaria, así como los datos de la Figura 4 complementaria, se realizaron en R.

Resumen del informe Hay

más información sobre el diseño de la investigación disponible en el Resumen del informe de Nature Portfolio vinculado a este artículo.

Disponibilidad de datos Todos

los datos se encuentran en el texto principal o en los materiales complementarios. Los datos de origen se proporcionan como un archivo de datos de origen con este documento. Los datos originales se proporcionan con este documento.

Referencias 1.

- Haque, ME et al. Dirigido a la agregación de alfa-sinucleína y su papel en la disfunción mitocondrial en la enfermedad de Parkinson. *Hno. J. Farmacéutica*. 179, 23–45 (2022).
- Trinh, D., Israwi, AR, Arathoon, LR, Gleave, JA y Nash, JE El papel multifacético de las mitocondrias en la patología de la enfermedad de Parkinson. *J. Neurochem* 156, 715–752 (2021).
- Cuttillo, G., Simon, DK & Eleuteri, S. VPS35 y las mitocondrias: conectando los puntos en la fisiopatología de la enfermedad de Parkinson. *Neurobiol. Dis.* 145, 105056 (2020).
- Ammal Kaidery, N. y Thomas, B. Perspectiva actual de la biología mitocondrial en la enfermedad de Parkinson. *Neurochem Int* 117, 91–113 (2018).
- Mullin, S. & Schapira, AH Mecanismos patogénicos de neurodegeneración en la enfermedad de Parkinson. *Neurol. Clínico*. 33, 1–17 (2015).
- Han, JY, Kim, JS & Son, JH Moléculas de homeostasis mitocondrial: regulación por un trío de genes recesivos de la enfermedad de Parkinson. *Exp. Neurobiol.* 23, 345–351 (2014).
- Hirsch, EC, Jenner, P. & Przedborski, S. Patogénesis de la enfermedad de Parkinson. *Mov. Desorden.* 28, 24–30 (2013).
- Subramaniam, SR & Chesselet, MF Disfunción mitocondrial y estrés oxidativo en la enfermedad de Parkinson. *Prog. Neurobiol.* 106–107, 17–32 (2013).

- Lemasters, JJ Autofagia mitocondrial selectiva, o mitofagia, como defensa dirigida contra el estrés oxidativo, la disfunción mitocondrial y el envejecimiento. *Rejuvenecimiento Res* 8, 3–5 (2005).
- Narendra, D., Tanaka, A., Suen, DF y Youle, RJ Parkin-inducido mitofagia en la patogénesis de la enfermedad de Parkinson. *Autofagia* 5, 706–708 (2009).
- Bonifati, V. et al. Parkinsonismo de aparición temprana asociado con PINK1 Mutaciones: frecuencia, genotipos y fenotipos. *Neurología* 65, 87–95 (2005).
- Li, Y. et al. Estudio clinicogenético de mutaciones PINK1 en parkinsonismo autosómico recesivo de aparición temprana. *Neurología* 64, 1955–1957 (2005).
- Vives-Bauza, C. et al. Reclutamiento de Parkin dependiente de PINK1 en las mitocondrias en la mitofagia. *Proc. Nacional. Acad. Ciencia. Estados Unidos* 107, 378–383 (2010).
- Narendra, DP et al. PINK1 se estabiliza selectivamente en mitocondrias deterioradas para activar Parkin. *PLoS Biol.* 8, e1000298 (2010).
- Kiely, AP y cols. Alfa-sinucleinopatía asociada con la mutación G51D SNCA: ¿un vínculo entre la enfermedad de Parkinson y la atrofia multisistémica? *Acta Neuropathol.* 125, 753–769 (2013).
- Zarranz, JJ et al. La nueva mutación, E46K, de la alfa-sinucleína causa Parkinson y demencia con cuerpos de Lewy. *Ana. Neurol.* 55, 164–173 (2004).
- Kruger, R. y otros. Mutación Ala30Pro en el gen que codifica la alfa-sinucleína en la enfermedad de Parkinson. *Nat. Genet* 18, 106–108 (1998).
- Polymeropoulos, MH et al. Mutación en el gen de la alfa-sinucleína identificada en familias con enfermedad de Parkinson. *Ciencia* 276, 2045–2047 (1997).
- Pasanen, P. et al. Nueva mutación A53E de alfa-sinucleína asociada con atrofia multisistémica atípica y patología tipo enfermedad de Parkinson. *Neurobiol. Envejecimiento* 35, 2180 e2181–2185 (2014).
- Proukakis, C. et al. Una nueva mutación sin sentido de alfa-sinucleína en la enfermedad de Parkinson. *Neurología* 80, 1062–1064 (2013).
- Ibáñez, P. et al. Relación causal entre la duplicación del gen alfa-sinucleína y la enfermedad de Parkinson familiar. *Lanceta* 364, 1169–1171 (2004).
- Singleton, AB y cols. La triplicación del locus de alfa-sinucleína causa la enfermedad de Parkinson. *Ciencia* 302, 841 (2003).
- Feresse, R. et al. Cuatro copias de SNCA responsables de autosómica. Enfermedad de Parkinson dominante en dos hermanos italianos. *Enfermedad de Parkinson*. 2015, 546462 (2015).
- Di Maio, R. et al. La alfa-sinucleína se une a TOM20 e inhibe Importación de proteínas mitocondriales en la enfermedad de Parkinson. *Ciencia. Traducción Medicina*. 8, 342ra378 (2016).
- Dexter, DT y cols. La peroxidación lipídica basal en la sustancia negra es aumenta en la enfermedad de Parkinson. *J. Neuroquímica*. 52, 381–389 (1989).
- Dexter, DT y cols. Aumento de los niveles de hidroperóxidos lipídicos en el Sustancia negra parkinsoniana: un estudio de HPLC y ESR. *Mov. Desorden.* 9, 92–97 (1994).
- Good, PF, Hsu, A., Werner, P., Perl, DP y Olanow, CW Nitricación de proteínas en la enfermedad de Parkinson. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 57, 338–342 (1998).
- Alam, ZI et al. Un aumento generalizado de las proteínas carbonilos en el cerebro en la enfermedad de Parkinson, pero no una enfermedad incidental con cuerpos de Lewy. *J. Neurochem* 69, 1326–1329 (1997).
- Zhang, J. et al. La enfermedad de Parkinson está asociada con la oxidación. Daño al ADN y ARN citoplasmático en las neuronas de la sustancia negra. *Soy. J. Pathol.* 154, 1423–1429 (1999).
- Sanchez-Ramos, RR, Overvik, E. & Ames, BN Un marcador de El daño al ADN mediado por oxirradicales (8-hidroxi-2'-desoxiguanosina) aumenta en el nigra-striatum de la enfermedad de Parkinson. *Neurodegeneración* 3, 197–204 (1994).
- [PubMed] 31. Shimura-Miura, H. et al. Aumento de 8-oxo-dGTPasa en las mitocondrias de las neuronas de la sustancia negra en la enfermedad de Parkinson. *Ana. Neurol.* 46, 920–924 (1999).

32. Beal, MF Envejecimiento, energía y estrés oxidativo en enfermedades neurodegenerativas. *Ana. Neurol.* 38, 357–366 (1995).
33. Jenner, P. Estrés oxidativo en la enfermedad de Parkinson. *Ana. Neurol.* 53, T26-36 (2003). Suplemento 3 discusión S36-28.
34. Creed, RB y Goldberg, MS Susceptibilidad mejorada de ratas knockout PINK1 a fibrillas de alfa-sinucleína. *Neurociencia* 437, 64–75 (2020).
35. Beilina, A. y Cookson, MR Genes asociados con el Parkinson Enfermedad: regulación de la autofagia y más. *J. Neurochem* 139, 91-107 (2016).
36. Han, R., Liu, Y., Li, S., Li, XJ y Yang, W. Mitofagia mediada por PINK1-PRKN: diferencias entre modelos in vitro e in vivo. *Autofagia* 19, 1396-1405 (2023).
37. Imberechts, D. et al. DJ-1 es un mediador descendente esencial en PINK1/mitofagia dependiente de parkin. *Cerebro* 145, 4368–4384 (2022).
38. Nakamura, N. & Hirose, S. Regulación de la morfología mitocondrial por USP30, una enzima desubiquitinante presente en la membrana externa mitocondrial. *Mol. Biol. Celda* 19, 1903-1911 (2008).
39. Bingol, B. et al. La deubiquitinasa mitocondrial USP30 se opone a la mitofagia mediada por parkina. *Naturaleza* 510, 370–375 (2014).
40. Cunningham, CN et al. USP30 y parkin se regulan homeostáticamente. ular cadenas atípicas de ubiquitina en las mitocondrias. *Nat. Biol celular.* 17, 160-169 (2015).
41. Ordureau, A. et al. Panorama global y dinámica de los ubiquitilomas dependientes de Parkin y USP30 en iNeuronas durante la señalización mitofágica. *Mol. Celda* 77, 1124–1142 e1110 (2020).
42. Rusilowicz-Jones, EV et al. USP30 establece un umbral desencadenante para la amplificación de la ubiquitilación mitocondrial por PINK1-PARKIN. *Ciencias de la vida. Alianza* 3, e202000768 (2020).
43. Gersch, M. et al. Mecanismo y regulación de la deubiquitinasa USP30 selectiva para Lys6. *Nat. Estructura. Mol. Biol.* 24, 920–930 (2017).
44. Borsche, M., Pereira, SL, Klein, C. & Grunewald, A. Mitocondrias y enfermedad de Parkinson: aspectos clínicos, moleculares y traslacionales. *J. Enfermedad de Parkinson.* 11, 45–60 (2021).
45. Phu, L. et al. Regulación dinámica de la importación mitocondrial por el sistema de ubiquitina. *Mol. Celda* 77, 1107–1123 e1110 (2020).
46. McWilliams, TG y cols. mito-QC ilumina la mitofagia y la arquitectura mitocondrial in vivo. *J. Biol celular.* 214, 333–345 (2016).
47. Koprach, JB, Johnston, TH, Reyes, MG, Sun, X. y Brotchie, JM La expresión de alfa-sinucleína A53T humana en la sustancia negra de rata utilizando un nuevo vector AAV1/2 produce una patología que evoluciona rápidamente con agregación de proteínas, arquitectura de neuritis distróficas y degeneración nigroestriatal con potencial para modelar la patología de la enfermedad de Parkinson. *Mol. Neurodegenerador.* 5, 43 (2010).
48. Koprach, JB, Johnston, TH, Reyes, G., Omana, V. y Brotchie, JM. Hacia un modelo de alfa-sinucleinopatía en primates no humanos para el desarrollo de terapias para la enfermedad de Parkinson: optimización de los parámetros de administración de AAV1/2 para impulsar la expresión sostenida de alfa sinucleína y degeneración dopaminérgica en macacos. *PLoS One* 11, e0167235 (2016).
49. Ip, CW y cols. La sobreexpresión inducida por AAV1/2 de A53T-alfa-sinucleína en la sustancia negra da como resultado la degeneración del sistema nigroestriatal con patología tipo Lewy y deterioro motor: un nuevo modelo de ratón para la enfermedad de Parkinson. *Acta Neuropathol. Comunitario.* 5, 11 (2017).
50. Éi, Q. et al. El tratamiento con trehalosa previene los déficits neuroquímicos y de comportamiento producidos en un modelo de enfermedad de Parkinson en ratas AAV alfa-sinucleína. *Mol. Neurobiol.* 53, 2258–2268 (2016).
51. Koprach, JB y cols. Neurodegeneración progresiva o compensación endógena en un modelo animal de enfermedad de Parkinson producida por dosis decrecientes de alfa-sinucleína. *PLoS One* 6, e17698 (2011).
52. Fujiwara, H. et al. La alfa-sinucleína se fosforila en las lesiones de sinucleinopatía. *Nat. Biol celular.* 4, 160–164 (2002).
53. Gubinelli, F. et al. Déficits lateralizados después del vector AAV unilateral basó la sobreexpresión de alfa-sinucleína en el mesencéfalo de ratas en pruebas de comportamiento sin drogas. *Comportamiento. Res. cerebral.* 429, 113887 (2022).
54. Wang, Y. et al. Las enzimas desubiquitinantes regulan la mitofagia mediada por PARK2. *Autofagia* 11, 595–606 (2015).
55. Soubannier, V. et al. Una vía de transporte vesicular transporta carga desde las mitocondrias a los lisosomas. *actual. Biol.* 22, 135-141 (2012).
56. Cadete, VJ et al. La formación de vesículas derivadas de mitocondrias es un proceso de control de calidad mitocondrial activo y fisiológicamente relevante en el sistema cardíaco. *J. Physiol.* 594, 5343–5362 (2016).
57. König, T. et al. MIRO y DRP1 impulsan vesículas derivadas de mitocondrias biogénesis y promover el control de calidad. *Nat. Biol celular.* 23, 1271–1286 (2021).
58. Marcassa, E. et al. Doble función de USP30 en el control de la pexofagia y la mitofagia basales. *Representante EMBO* 19, e45595 (2018).
59. Lisci, M. et al. La traducción mitocondrial es necesaria para la destrucción sostenida por parte de las células T citotóxicas. *Ciencia* 374, eabe9977 (2021).
60. Niu, K. et al. USP33 desubiquitina PRKN/parkin y antagoniza su papel en la mitofagia. *Autofagia* 16, 724–734 (2020).
61. Chakraborty, J. et al. La inhibición de USP14 corrige un modelo in vivo de mitofagia deteriorada. *EMBO Mol. Medicina.* 10, e9014 (2018).
62. Cornelissen, T. et al. La deubiquitinasa USP15 antagoniza la ubiquitinación mitocondrial y la mitofagia mediadas por Parkin. *Tararear. Mol. Genet* 23, 5227–5242 (2014).
63. Liu, X., Hebron, M., Shi, W., Lonskaya, I. y Moussa, CE La proteasa-13 específica de ubiquitina regula de forma independiente la ubiquitinación de parkin y la eliminación de alfa-sinucleína en alfa-sinucleinopatías. *Tararear. Mol. Genet* 28, 548–560 (2019).
64. Liu, X. et al. Mejora la inhibición de la proteasa-13 específica de ubiquitina Rendimiento conductual en ratones que expresan alfa-sinucleína. *Int J. Mol. Ciencia.* 23, 8131 (2022).
65. Bose, A. & Beal, MF Disfunción mitocondrial en la enfermedad de Parkinson. *J. Neurochem* 139, 216–231 (2016).
66. Haelterman, NA et al. Una visión mitocéntrica de la enfermedad de Parkinson. *Año Rev. Neurociencias.* 37, 137-159 (2014).
67. Park, GH, Park, JH y Chung, KC Control preciso de la mitofagia a través del sistema de ubiquitina proteosoma y deubiquitina proteasas y su disfunción en la enfermedad de Parkinson. *Representante de BMB* 54, 592–600 (2021).
68. Domingo, A. y Klein, C. Genética de la enfermedad de Parkinson. *Mano. Clínico. Neurol.* 147, 211–227 (2018).
69. Schapira, AH Mitocondria en la etiología y patogénesis de la enfermedad de Parkinson. *Lanceta Neurol.* 7, 97-109 (2008).
70. Shen, J. et al. El extremo amino alfa-sinucleína regula la mito-permeabilidad de la membrana condrial. *Res. cerebral.* 1591, 14-26 (2014).
71. Devi, L., Raghavendran, V., Prabhu, BM, Avadhani, NG y Anandatheerthavarada, HK La importación mitocondrial y la acumulación de alfa-sinucleína alteran el complejo I en cultivos neuronales dopaminérgicos humanos y el cerebro de la enfermedad de Parkinson. *J. Biol. Química.* 283, 9089–9100 (2008).
72. Hou, X. et al. Los cambios asociados a la alfa-sinucleína en la mitofagia mediada por PINK1-PRKN dependen del contexto de la enfermedad. *Patol cerebral.* 33, e13175 (2023).
73. Nakamura, K. et al. La asociación directa de membrana impulsa la fisión mitocondrial mediante la proteína alfa-sinucleína asociada a la enfermedad de Parkinson. *J. Biol. Química.* 286, 20710–20726 (2011).
74. Choubey, V. et al. La alfa-sinucleína A53T mutante induce la muerte neuronal al aumentar la autofagia mitocondrial. *J. Biol. Química.* 286, 10814–10824 (2011).
75. Choi, ML et al. Conversión estructural patológica de alfa-sinucleína en las mitocondrias induce toxicidad neuronal. *Nat. Neu-rosci.* 25, 1134-1148 (2022).
76. Tsefou, E. et al. Investigación de la inhibición de USP30 para mejorar la mitofagia mediada por Parkin: herramientas y enfoques. *Biochem J.* 478, 4099–4118 (2021).

77. Kluge, AF et al. Nuevos inhibidores altamente selectivos de la ubiquitina La proteasa específica 30 (USP30) acelera la mitofagia. *Bioorg. Medicina. Química. Letón.* 28, 2655–2659 (2018).
78. Rusilowicz-Jones, EV et al. Evaluación comparativa de un sector altamente selectivo Inhibidor de USP30 para mejorar la mitofagia y la pexofagia. *Ciencias de la vida. Alianza* 5, e202101287 (2022).
79. Gu, L. et al. El eje IKKbeta-USP30-ACLY controla la lipogénesis y la tumorigénesis. *Hepatología* 73, 160–174 (2021).
80. Bankhead, P. et al. QuPath: Software de código abierto para análisis de imágenes de patología digital. *Ciencia. Rep.* 7, 16878 (2017).
81. Morriss, Nueva Jersey y otros. Cuantificación automatizada de inmunohistoquímica de tejido cerebral de animales grandes utilizando el software QuPath. *Neurociencia* 429, 235–244 (2020).
82. Courtney, JM, Morris, GP, Cleary, EM, Howells, DW y Sutherland, BA Un enfoque automatizado para mejorar la cuantificación de pericitos y microglia en secciones completas de cerebro de ratón. *eNeuro* 8, ENEURO.0177–21 (2021).
83. Ip, CW, Cheong, D. y Volkman, J. Estimación estereológica de Número de neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra del ratón utilizando el fraccionador óptico y el equipo de microscopía estándar. *J. Vis. Exp.* 127, 56103 (2017).
84. Chin, RM y cols. La activación farmacológica de PINK1 mejora Patología en modelos de la Enfermedad de Parkinson. *bioRxiv* <https://doi.org/10.1101/2023.02.14.528378> (2023).
85. Riccio, V. et al. La enzima desubiquitinante USP30 mantiene la concentración basal abundancia de peroxisomas regulando la pexofagia. *J. Biol. Celular.* 218, 798–807 (2019).
86. McCullough, LD et al. Iniciativa de los NIH para equilibrar el sexo de los animales en estudios preclínicos: preguntas generativas para guiar las políticas, la implementación y las métricas. *Biol. Sexo. Diferir de.* 5, 15 (2014).
87. Clayton, JA Estudiar ambos sexos: un principio rector para los biomas dicina. *FASEB J.* 30, 519–524 (2016).
88. Miller, LR et al. Considerar el sexo como una variable biológica en la pre-investigación clínica. *FASEB J.* 31, 29–34 (2017).
89. Blanco, JK et al. La generación de todo el genoma y la fenotipificación sistemática de ratones knockout revelan nuevas funciones para muchos genes. *Celda* 154, 452–464 (2013).
90. Karp, NA y cols. Aplicando las pautas ARRIVE a un in vivo base de datos. *PLoS Biol.* 13, e1002151 (2015).

Agradecimientos Agradecemos a la

Dra. Laura Parton por la gestión/codirección del proyecto de MTX115325, proporcionando la base para los estudios de compuestos de Mission y el desarrollo de MTX115325 en EP. También agradecemos a los Dres. Krutika Joshi y Veronique VanderHorst de BIDMC por su apoyo con el escaneo de diapositivas para el recuento neuronal TH+ y la densitometría de fibras TH+. Agradecemos a Mat-thew Jacobsen por la evaluación patológica de los hígados de ratones y a Nirav Prakas Patel por los primeros trabajos sobre ESC de ratones. Nos gustaría agradecer al Prof.

María Grazia Spillantini por sus valiosos comentarios al manuscrito.

La investigación en el laboratorio DKS está financiada por una subvención del NINDS (R21NS109408), el Weston Brain Institute y la Owens Foundation. La investigación en el laboratorio de GB cuenta con el apoyo del Instituto de Investigación de Demencia del Reino Unido, que recibe contribuciones de UK DRI Ltd, UK MRC, Alzheimer's Society y Alzheimer's Research UK, así como una subvención del Ministerio rumano de Investigación, Innovación y Digitalización (n° PNRR-III-C9-2022-18-66; contrato 760114). IGG fue financiado por una subvención del Medical Research Council del Reino Unido (MC_UU_00018/2). La investigación en el laboratorio SPJ está financiada por la subvención Cancer Research UK Discovery (DRCPGM \100005) y la subvención ERC Synergy DDREAMM (855741). Este proyecto tiene

recibió financiación para SJ de la subvención del programa CRUK C6/A11224, C6/A18796 y el premio Wellcome Investigator Award (206388/Z/17/Z) junto con financiación de infraestructura central de Cancer Research UK (C6946/A24843) y Wellcome (WT203144). El proyecto Sanger Mouse Genetics contó con el apoyo de Wellcome Trust (098051). CRUK soporta DJA

Contribuciones de los autores DKS, GB,

SJ y PT obtuvieron la financiación y supervisaron el proyecto; DKS y T.-SZF concibieron y diseñaron el estudio genético α Syn. T.-SZF realizó los experimentos y el análisis de datos para el estudio genético. GB, DJA y SJ crearon y fenotiparon los ratones Usp30 KO con la ayuda de CJL e YS; NAK realizó el análisis estadístico del fenotipado de la tubería del ratón Usp30 KO; IGG y JFZ cruzaron Usp30 KO con ratones mito-QC y llevaron a cabo análisis de mitofagia periférica. ACP y PT dirigieron el estudio del fármaco y crearon todos los datos relacionados con el trabajo del inhibidor USP30 con la ayuda de MK, CAL, RW, RM, SA, LB y NMGBT-SZF, SEPT y DKS revisaron y editaron el manuscrito. Todos los autores aprobaron el manuscrito.

Conflicto de intereses

ACP, MK, CAL, RW, RM, SA, LB y NM y PT son empleados o ex empleados de Mission Therapys. SJ es fundador, accionista y miembro de la junta directiva de Mission Therapeutics. Todos los demás autores no declaran tener intereses en competencia.

Información adicional

Información complementaria La versión en línea contiene material complementario disponible en <https://doi.org/10.1038/s41467-023-42876-1>.

La correspondencia y las solicitudes de materiales deben dirigirse a Tracy-Shi Zhang Fang, Paul W. Thompson o Gabriel Balmus.

Información de revisión por pares Nature Communications agradece a Heather Mor-tiboy y a los demás revisores anónimos por su contribución a la revisión por pares de este trabajo. Un archivo de revisión por pares está disponible.

La información sobre reimpresiones y permisos está disponible en <http://www.nature.com/reprints>

Nota del editor Springer Nature se mantiene neutral con respecto a reclamaciones jurisdiccionales en mapas publicados y afiliaciones institucionales.

Acceso Abierto Este artículo está bajo una Licencia Internacional Creative Commons Attribution 4.0, que permite el uso, compartir, adaptación, distribución y reproducción en cualquier medio o formato, siempre y cuando se dé el crédito apropiado a los autores originales y a la fuente. proporcione un enlace a la licencia Creative Commons e indique si se realizaron cambios. Las imágenes u otro material de terceros en este artículo están incluidos en la licencia Creative Commons del artículo, a menos que se indique lo contrario en una línea de crédito al material. Si el material no es

incluido en la licencia Creative Commons del artículo y su uso previsto no está permitido por la normativa legal o excede el uso permitido, deberá obtener el permiso directamente del titular de los derechos de autor. Para ver una copia de esta licencia, visite <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© El autor (es) 2023