
**TESINA PARA OPTAR POR EL GRADO DE
LICENCIADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Alfa-sinucleína: alteraciones en
las propiedades de agregación
inducidas por nitración en tirosina**

Rodrigo Ivagnes Green

*Orientador: José M. Souza**
*Coorientadora: Cecilia Chavarría**

**Centro de Investigaciones Biomédicas, Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina*

*Tribunal evaluador: José M. Souza
Verónica Demicheli
Matías Möller*

Diciembre, 2020

Agradecimientos

A todos los servicios que contribuyeron a realizar este trabajo:

A Dolores Piñeyro (Instituto Pasteur de Montevideo), por permitir participar en la obtención de mutantes y permitirme trabajar en su laboratorio.

A Ari Zeida (Facultad de Medicina, UdelaR), por la gran ayuda en discusiones de resultados y obtención de datos por difracción circular.

A Mauricio Mastrogiovanni (Facultad de Medicina, UdelaR) por su participación en el espectrómetro de masa, así como análisis y discusión.

A Federico Carrión (Instituto Pasteur de Montevideo), por la ayuda en las mediciones de DLS.

A Gabriela Casanova (Unidad de Microscopía, Facultad de Ciencias, UdelaR), por contribuir en la obtención de imágenes por microscopía electrónica.

Al Laboratorio de Biofármacos del Instituto Pasteur de Montevideo, por permitir utilizar el equipo para Difracción circular.

A mis tutores, Pepe y Ceci.

A todo el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, UdelaR.

A mi familia, que con su apoyo me lo dan todo.

A amigos y colegas.

A mi compañera.

Este trabajo se culminó el año de pandemia causada por Sars-Cov-2, causando un gran reconocimiento del sistema científico del Uruguay.

Contenido

1. Introducción	6
1.1. Alfa-Sinucleína.....	6
1.1.1 Estructura de alfa-sinucleína.....	6
1.1.2 Función de alfa-sinucleína.....	7
1.2 Alfa-sinucleinopatías.....	8
1.3. Modificaciones oxidativas.....	10
1.3.1. Especies reactivas del oxígeno y nitrógeno.....	10
1.3.2 Oxidación y nitración de aminoácidos en proteínas.....	12
1.4 Formación de especies agregadas de alfa-sinucleína.....	15
1.4.1 Mecanismo de agregación.....	16
1.4.2. Rol biológico de estructuras de alfa sinucleína agregada.....	17
2. Objetivos	19
3. Materiales y métodos.....	20
3.1 Obtención de formas de alfa-sinucleína mutantes en tirosina.....	20
3.1.1 PCR para mutagénesis.....	20
3.1.2. Colony PCR.....	21
3.1.3. Electroforesis de ADN.....	21
3.1.4. Transformación en células DH5- α quimiocompetentes.....	21
3.1.5. Transformación en células DH5- α electrocompetentes.....	22
3.1.6. Extracción de ADN plasmídico.....	22
3.2 Expresión y purificación de las proteínas recombinantes.....	22
3.2.1 Transformación en vector de expresión.....	22
3.2.2. Expresión de alfa sinucleína.....	23
3.2.3. Purificación de alfa sinucleína.....	23
3.2.4 Cuantificación de proteínas.....	24
3.3. Caracterización de la proteína a nivel estructural y funcional.....	24
3.3.1. Nitración por peroxinitrito.....	24
3.3.2. Western blot.....	25
3.3.3. Espectrometría de masas.....	25
3.3.4. Ensayo de formación de fibras.....	25
3.3.5. Ensayo de formación de oligómeros.....	26
3.3.6. Cromatografía de exclusión molecular.....	26

3.3.7. Electroforesis nativa.....	26
3.3.8. Dicroísmo circular.....	27
3.3.9. Dispersión dinámica de luz.....	27
3.3.10. Microscopía electrónica de transmisión	27
4. Resultados	28
4.1. Obtención de formas mutantes Y39 e Y136	28
4.2 Expresión y purificación de alfa sinucleína wild-type y de las formas mutantes	31
4.3 Caracterización de la proteína a nivel estructural y funcional	36
4.3.1 Nitración en residuos de tirosina.....	36
4.3.2 Dicroísmo circular de las proteínas	42
4.3.3 Formación de fibras	42
4.3.4 Formación de oligómeros.....	46
5. Discusión.....	49
5.1 Obtención de formas mutantes	49
5.2 Expresión y purificación de las proteínas	50
5.3 Nitración en residuos de tirosina.....	51
5.4 Caracterización de las proteínas por dicroísmo circular	54
5.5 Formación de fibras.....	55
5.6 Formación de oligómeros.....	57
6. Conclusión y perspectivas	58
7. Referencias bibliográficas	59
8. Anexos.....	67

Resumen

La alfa-sinucleína (aS) es una proteína que se encuentra fuertemente asociada al establecimiento de un conjunto de enfermedades neurodegenerativas denominadas sinucleinopatías. Dentro de estas enfermedades, la enfermedad de Parkinson es la más frecuente, y la segunda enfermedad neurodegenerativa con mayor prevalencia a nivel mundial. Este conjunto de enfermedades se caracteriza, aparte de la muerte neuronal, por la presencia de agregados de aS insolubles en el citoplasma de neuronas y astrocitos. La capacidad de la aS para formar agregados proteicos radica en una serie de interacciones entre las regiones N y C-terminales, determinando la formación de estructuras mal plegadas que tienen la capacidad de agregarse y acumularse.

Para este trabajo de tesina de grado se construyeron dos mutantes de aS que poseen un único residuo de tirosina, con el objetivo de estudiar desde un enfoque estructural su contribución a la formación de fibras y oligómeros. Además, se evaluó el efecto de la nitración en residuos de tirosina específicos, siendo esta una modificación relevante en un contexto neurodegenerativo. Para cumplir con estos objetivos se realizó mutagénesis dirigida por PCR sustituyendo residuos de tirosina por fenilalanina. Las proteínas expresadas y purificadas, fueron nitradas con peroxinitrito, y las consecuencias de este efecto se evaluaron mediante ensayos de formación de fibras y de oligómeros. Los monómeros, fibras y oligómeros formados fueron caracterizados por dicroísmo circular, dispersión dinámica de luz y microscopía electrónica de transmisión.

En cuanto a los resultados obtenidos, se logró construir y purificar las proteínas mutantes con un residuo de tirosina en cada extremo de la cadena polipeptídica (Y39 e Y136). Se encontraron diferencias tanto en la formación de fibras como de oligómeros, así como la modificación de estos procesos por efecto de la nitración en tirosinas. Las estructuras oligoméricas también presentan diferencias estructurales.

1. Introducción

1.1. Alfa-Sinucleína

La proteína alfa-sinucleína (aS), es una proteína citoplasmática formada por 140 aminoácidos, con una masa molecular de 14 kDa. Junto a la β y γ sinucleínas (β S y γ S respectivamente), pertenece a la familia de las sinucleínas, siendo todas ellas codificadas por genes diferentes. Esta familia de proteínas, se expresa en distintas regiones del encéfalo de vertebrados, no habiéndose encontrado genes ortólogos en otros grupos (1,2). aS y β S se encuentran en las terminales presinápticas, particularmente en la neocorteza, el hipocampo, el cuerpo estriado, el tálamo y el cerebelo (3–5). Por otro lado, la γ S se expresa fundamentalmente en la sustancia nigra, y se ha encontrado un aumento de su expresión en tumores mamarios (6). Además, en los últimos años se ha demostrado que estas proteínas se expresan de forma variable en tejidos por fuera al sistema nervioso, como por ejemplo en eritrocitos y células eritroides (7,8).

1.1.1 Estructura de alfa-sinucleína

La aS es una proteína que no presenta una estructura terciaria definida en solución, por lo que pertenece al grupo de proteínas intrínsecamente desordenadas (9,10). Algunos autores han demostrado que puede formar un tetrámero estable, aunque no hay consenso en la literatura sobre este aspecto (9,11). Como muestra la figura 1, la estructura primaria de aS puede dividirse en tres regiones: la región N-terminal (aminoácidos 1-60), la región central (aminoácidos 61-95) y la región C-terminal (aminoácidos 96-140). La región N-terminal contiene un número variable de repeticiones degeneradas con la secuencia KTKEGV. Esta región sufre un plegamiento a dos alfa-hélices separadas por un fragmento de 10 aminoácidos al interactuar con vesículas lipídicas o con el detergente SDS (12,13). La región central también se denomina “componente no amiloide” o “NAC” por su sigla en inglés (Non amyloid- β component). Esta región es capaz de inducir a la proteína a adoptar una estructura de hoja- β plegada, con lo que puede interactuar con otras regiones NAC y formar agregados fibrilares intracelulares (14). La región C-terminal es rica en prolina y aminoácidos ácidos como glutamato y aspartato, lo que le otorga a la proteína un punto isoeléctrico de 4,7 (15).

Al igual que la β S y γ S, la aS evita la agregación de proteínas *in vitro* e *in vivo* al poseer actividad chaperona en el extremo N-terminal (28,29). Por último, la aS puede interactuar con otras proteínas intracelulares, como la proteína parkina, una E3:ubiquitina ligasa (30,31) y la proteína chaperona DJ-1 (32), lo que le otorga un papel fundamental en mantener la homeostasis vesicular de las sinapsis.

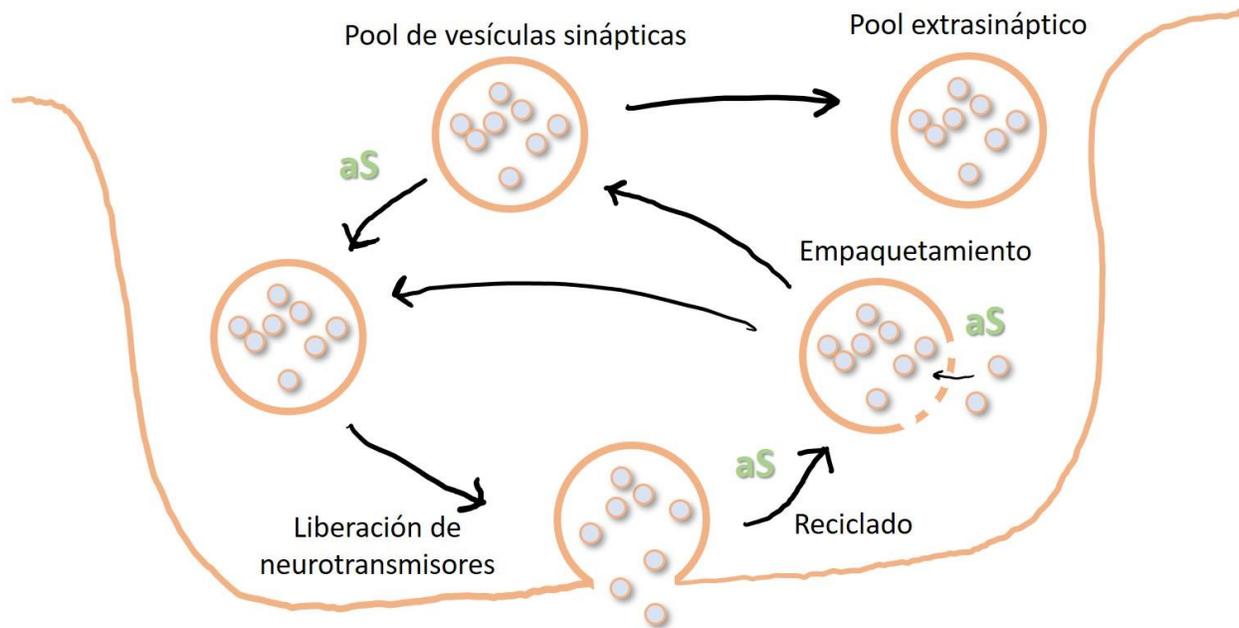


Figura 2. Función de aS. Se representa esquemáticamente algunos de los momentos durante el tráfico vesicular en los que interviene la aS. Adaptado de (33).

1.2 Alfa-sinucleinopatías

La región central de aS fue aislada por primera vez a partir de inclusiones citoplasmáticas insolubles conocidas como placas amiloides (34). Estas inclusiones son características de algunas poblaciones neuronales de pacientes diagnosticados con enfermedad de Alzheimer (EA) (35,36). Años más tarde, se despertó un gran interés por la aS al publicarse dos hallazgos que la vinculan directamente con la enfermedad de Parkinson (EP). Primero, en la “Familia Contursi” (una familia extensa de origen italiano), con muchos de sus miembros diagnosticados con EP, se descubrió una mutación puntual en la región codificante del gen SNCA. La mutación encontrada corresponde al cambio de la base guanina en la posición 209 por adenina, codificando para el aminoácido treonina en la posición 53 en lugar de alanina (mutación A53T) (37). A partir de este caso la EP comenzó a considerarse como una enfermedad hereditaria autosómica dominante. Actualmente se conocen otras mutaciones puntuales de aS que causan distintas formas de EP (38–41), así como duplicaciones y triplicaciones génicas (42,43). Segundo, ese mismo año, se

identificó mediante el uso de inmunohistoquímica a la aS como componente principal de los Cuerpos de Lewy (44).

Los cuerpos de Lewy son agregados proteicos insolubles, eosinófilos, de forma circular y diámetro variable entre 1 a 20 μm (45), formados por aS (44), componentes del citoesqueleto (46) y ubiquitina (47). Estas estructuras se encuentran principalmente en el citoplasma de ciertas neuronas en pacientes afectados por EP, así como en otras enfermedades neurodegenerativas, tales como atrofia multisistémica y demencia con cuerpos de Lewy. Dichas enfermedades se agrupan dentro de las alfa-sinucleinopatías, dado que la aS juega un rol importante en su patogenia.

La EP constituye la causa más frecuente de parkinsonismo (48) y es la enfermedad neurodegenerativa más prevalente a nivel mundial, con 1 a 2 casos cada 1000 habitantes (49,50), aumentando su incidencia con la edad (51). Los signos de la EP se caracterizan principalmente por ser motores: bradiquinesia, temblor en reposo, rigidez e inestabilidad postural. Además, pueden aparecer otros signos no motores como demencia, depresión, disfunción autonómica, constipación, pérdida del olfato y trastornos del sueño REM (52). La mayoría de los signos motores se deben a la muerte selectiva de neuronas dopaminérgicas de la *substantia nigra pars compacta*, neuronas que intervienen en la regulación del movimiento voluntario y el aprendizaje. La visión más actual acerca de la enfermedad, se basa en los estadios postulados por Braak que describen la progresión histológica de los cuerpos de Lewy (53).

Actualmente no es posible detener la muerte neuronal de los pacientes y por ello el tratamiento se dirige a corregir los síntomas y retrasar su aparición. La implementación del precursor de dopamina L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) fue sin duda un avance importante que permitió el tratamiento de la mayoría de los síntomas. Sin embargo, este deja de ser efectivo con el tiempo y da paso a la reaparición y agravamiento de los síntomas (períodos "on-off") (52). Otras aproximaciones terapéuticas posibles incluyen la administración de agonistas dopaminérgicos, la inhibición de receptores colinérgicos centrales e inhibición de enzimas responsables del catabolismo de la dopamina (54). Se recomienda indicar estos fármacos, previo a la administración de L-DOPA con tal de evitar el uso de dosis elevadas de esta, así como la pérdida temprana del efecto terapéutico (54). Existe también la posibilidad de tratamiento no farmacológico, mediante el cual por un procedimiento quirúrgico se logra la estimulación eléctrica de núcleos encefálicos diana por medio del implante de electrodos (52).

1.3. Modificaciones oxidativas

1.3.1. Especies reactivas del oxígeno y nitrógeno

Las células se encuentran constantemente bajo la amenaza del “estrés oxidativo”, término acuñado para representar el desbalance que puede ocurrir entre la producción de especies oxidantes y los sistemas de protección celular ante estos. En los últimos años, se ha extendido el uso de este concepto, involucrando un desequilibrio en la señalización redox (55). Estas especies son conocidas como especies reactivas del oxígeno (ROS) y del nitrógeno (RNS), siendo algunas de ellas radicales libres (moléculas con un electrón desapareado en su orbital molecular externo). Entre las más relevantes a nivel biológico podemos describir los siguientes.

Radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$): se forma mayoritariamente por las enzimas xantina oxidasa, NADPH oxidasas de macrófagos y neutrófilos, oxigenasas y los complejos mitocondriales I y III de la cadena respiratoria en la reacción $O_2 + e^- \rightarrow O_2^{\bullet-}$. Es eliminado por las enzimas superóxido dismutasa (SOD) (56), que catalizan la formación de H_2O_2 en la reacción $2O_2^{\bullet-} + 2H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$.

Óxido nítrico (NO^{\bullet}): este radical se descubrió debido a su función biológica en el endotelio vascular como un potente vasodilatador, por lo que inicialmente se le llamó “Factor de relajación derivado del endotelio” (EDRF) hasta conocerse su identidad química. Es sintetizado por la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) a partir de L-arginina y O_2 , con participación de los cofactores NADPH, FAD, FMN y tetrahidrobiopterina (57). Existen varias isoformas dependiendo de su localización tisular: la forma inducible de macrófagos (iNOS), endotelial (eNOS) y neuronal (nNOS). El $^{\bullet}NO$ es una molécula no cargada, apolar, que puede difundir libremente por las bicapas lipídicas de las membranas, lo que le permite llegar a varios compartimentos celulares. Los eritrocitos participan de la eliminación del $^{\bullet}NO$ al reaccionar con Fe^{2+} -oxihemoglobina formando Fe^{3+} -metahemoglobina y nitrato (NO_3^-).

Peróxido de hidrógeno (H_2O_2): es un oxidante que participa en reacciones de oxidación por dos electrones. Es formado por acción de la SOD y otras oxidasas, y es degradado por varias enzimas, siendo la primera en ser caracterizada la catalasa (que genera O_2 y H_2O). Su toxicidad se produce principalmente al reaccionar con hierro libre en estado ferroso, en la reacción de Fenton ($Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + ^{\bullet}OH + OH^-$), formando radical hidroxilo, un radical muy reactivo que puede causar la oxidación de lípidos, ADN y proteínas.

Peroxinitrito (ONOO⁻): al igual que el H₂O₂, el ONOO⁻ no es un radical libre. Es un oxidante fuerte que puede participar en reacciones de uno o dos electrones. Se encuentra en equilibrio ácido-base con su forma protonada ONOOH, teniendo un pK_a de 6,8 a 37°C, por lo que a pH fisiológico se encuentran ambas especies en solución (58). La importancia biológica del ONOO⁻ se sustenta en que es producido por la reacción entre •NO y O₂•⁻, con una constante de velocidad cercana al límite de difusión (1x10¹⁰ M⁻¹s⁻¹) (59). En este trabajo se utilizará peroxinitrito como agente oxidante de proteínas.

Existen varias rutas por las cuales el ONOO⁻ puede oxidar las biomoléculas: de forma directa (reacciona con tioles, metionina, triptófano o metales de transición) o indirecta a partir de especies radicalares formadas a partir de su homólisis (59). El ONOOH sufre homólisis espontánea a los radicales •OH y •NO₂, especies reactivas que pueden oxidar las biomoléculas (60). El rendimiento de la ruta de homólisis se ha estimado en un 30% (61), aunque también se ha propuesto un rendimiento del 5% (62). EL ONOOH restante sufre isomerización a nitrato (NO₃⁻) (59). Sin embargo, la contribución de la reacción de homólisis a la producción de especies oxidantes es presumiblemente baja, debido a la presencia de otras reacciones más rápidas que compiten por el peroxinitrito. Por el contrario, al considerar entornos hidrofóbicos como las membranas biológicas, la reacción de homólisis del peroxinitrito puede tomar un papel significativo, debido a la ausencia de otros blancos biológicos (63).

Una de las reacciones más importantes del ONOO⁻ es con el CO₂, en una reacción rápida que forma el aducto nitrosoperoxicarbonato (ONOOCO₂⁻). Esta reacción es importante debido a la alta concentración de CO₂ en los sistemas biológicos (1-2 mM) y su distribución en todos los tejidos. El ONOOCO₂⁻ sufre homólisis a •NO₂ y CO₃•⁻, especies relacionadas al estrés nitro-oxidativo (64).

Las reacciones de formación y consumo de las especies descritas son muy complejas, dado que existen reacciones intrínsecas de isomerización, oxidación y equilibrio ácido-base. Por otra parte, existen numerosos factores que dificultan el estudio de los mecanismos oxidativos, como son: la reactividad con diferentes biomoléculas, la concentración de estas últimas, la compartimentalización de las especies oxidantes y la permeabilidad de la membrana a las mismas. Por este motivo también se debe tener cautela al proponerse proyectar resultados a modelos biológicos desde estudios *in vitro*.

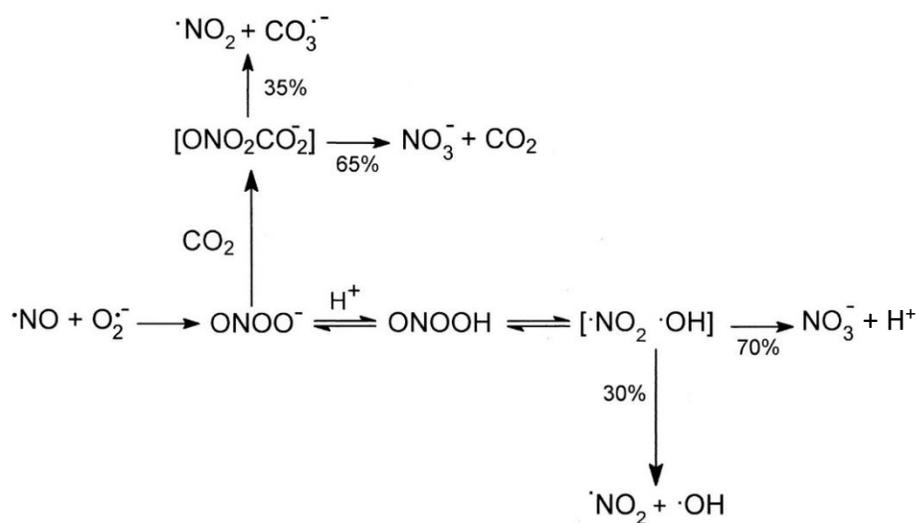


Figura 2. Reactividad del ONOO⁻. Se muestran las reacciones explicadas en el texto. Se esquematizan algunas de las reacciones implicadas en las vías de formación y consumo de ONOO⁻, como su síntesis a partir de óxido nítrico y radical superóxido, la descomposición por homólisis, y la reacción con CO₂. Adaptado de (65)

1.3.2 Oxidación y nitración de aminoácidos en proteínas

La producción de ROS Y RNS descrita es de gran interés biomédico por su rol en determinadas situaciones celulares, como por ejemplo la disfunción mitocondrial, los estados inflamatorios y la limitación de los sistemas antioxidantes. Se ha encontrado que el estrés oxidativo interviene en el establecimiento de varias enfermedades neurodegenerativas como sinucleinopatías, EA y esclerosis lateral amiotrófica (ELA) (66–70).

Las especies reactivas se caracterizan por oxidar biomoléculas tales como proteínas, lípidos y ADN, pudiendo alterar su estructura y/o función. En el caso de las proteínas, entre los aminoácidos que pueden oxidarse encontramos triptófano, cisteína, histidina, metionina y tirosina. Este trabajo será enfocado en particular a la oxidación y nitración de tirosina, dado que aS presenta varios residuos de tirosina susceptibles de nitración en regiones importantes.

Nitración de tirosina

La nitración de tirosina es una modificación postraduccional que implica la sustitución de un hidrógeno por un grupo nitro (-NO₂) en la posición 3 del anillo fenólico, formando 3-nitrotirosina (3-NT). Esta es una reacción mediada por radicales libres que ocurre en dos pasos: la formación del radical tirosilo ([•]Tyr) al abstraerse un electrón del anillo fenólico, y luego la reacción con radical dióxido de nitrógeno ([•]NO₂). Los oxidantes que pueden generar [•]Tyr son principalmente [•]OH, CO₃^{•-}, [•]NO₂ y radicales lipoperoxilos (LOO[•]). Como se mencionó anteriormente, la reacción

del ONOO^- con CO_2 da origen a las especies $\text{CO}_3^{\bullet-}$ y $\bullet\text{NO}_2$, lo que genera una fuente importante de agentes nitrantes. Sin embargo, el radical $\bullet\text{NO}_2$ no es capaz por sí solo de nitrar tirosina, dado que primero se debe generar el radical $\bullet\text{Tyr}$ en una reacción lenta comparada con otras reacciones que compiten por el $\bullet\text{NO}_2$. El proceso de formación de 3-NT es de bajo rendimiento, confirmándose esto mediante observaciones *in vivo*, donde la relación 3-NT/Tyr es 1 a 10 en 100.000 en condiciones inflamatorias (71).

Debido al mecanismo radicalar de la formación de 3-NT, pueden formarse otros productos como 3,3-ditirosina (al reaccionar dos radicales tirosilo) (72) o 3-hidroxitirosina (reacción entre $\bullet\text{Tyr}$ y $\bullet\text{OH}$). La presencia de entrecruzamientos de ditirosina ha sido observada en condiciones de estrés nitro-oxidativo, y está relacionada con la agregación de proteínas como aS y tau en EP y EA respectivamente (73–75).

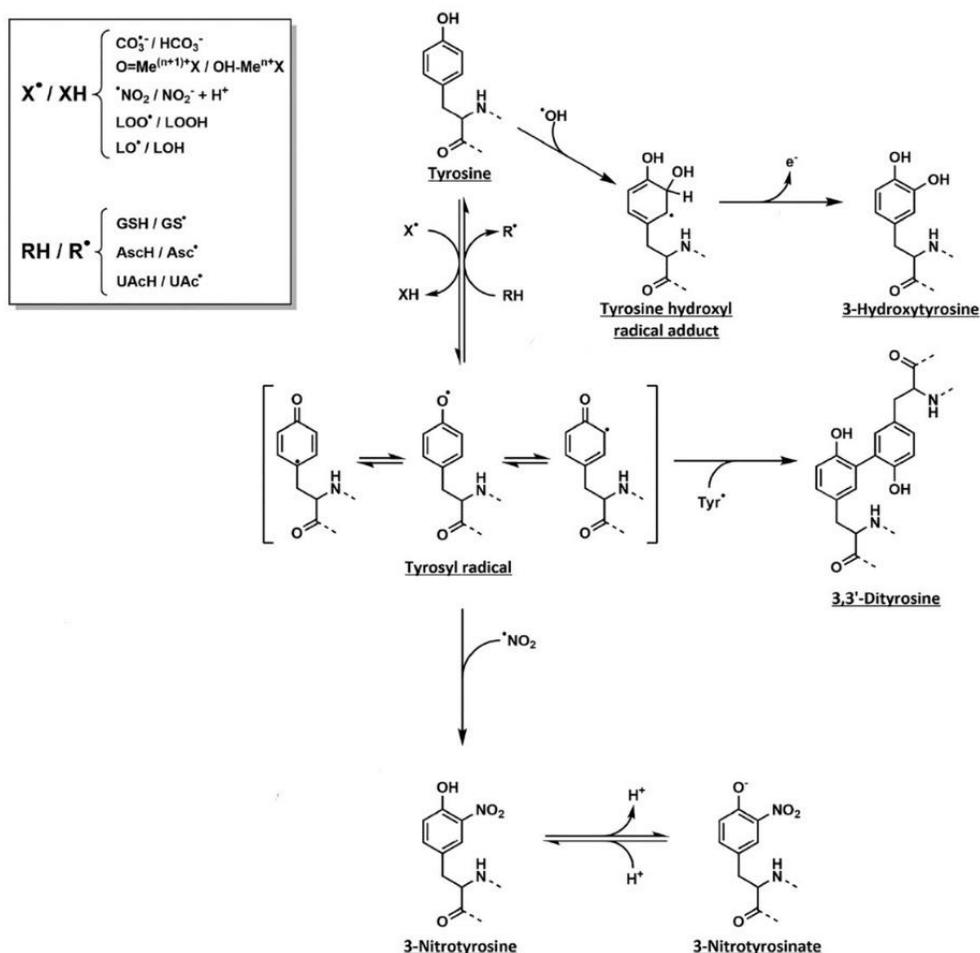


Figura 3. Mecanismos de nitración de tirosina. La nitración de tirosina ocurre por un mecanismo mediado por radicales libres. Las especies involucradas en la formación del radical tirosilo en solución acuosa, relevantes para este trabajo, son el $\text{CO}_3^{\bullet-}$ y $\bullet\text{NO}_2$, siendo este último el agente nitrante. Otros productos formados pueden ser 3-hidroxitirosina y 3,3-ditirosina. Adaptado de (59).

Por otro lado, la nitración de tirosina es altamente selectiva, ya que no todas las proteínas ni todas las tirosinas dentro de una misma proteína son susceptibles de nitración. Esta selectividad depende fundamentalmente del entorno fisicoquímico en que se encuentra la tirosina, favoreciéndose la nitración si se encuentra expuesta al solvente. Actualmente no se ha establecido ninguna secuencia consenso que permita predecir si un residuo de tirosina será blanco de nitración. Sin embargo, se han establecido algunas pistas. Inicialmente, se planteó que la presencia de residuos ácidos cercanos a los residuos de tirosina favorecía su nitración (76). Posteriormente, se propuso que la presencia de metionina y glutamato en un entorno cercano favorece la nitración, al mismo tiempo que la cisteína tiene el efecto opuesto (77). Esto puede explicarse debido a la existencia de transferencias electrónicas intramoleculares entre los residuos. Además, la presencia cercana de residuos que introduzcan giros en la estructura tridimensional, como prolina o glicina, también puede favorecer la nitración (78). Finalmente, usando modelos bioinformáticos estructurales de proteínas e identificando los sitios efectivos de nitración en las mismas, se plantea que los entornos de nitración serían fundamentalmente aquellos más polares, en un entorno no ácido y libres de residuos voluminosos (fenilalanina, isoleucina, leucina y metionina) (79).

Actualmente se conoce que la nitración de proteínas puede llegar a generar cambios en la funcionalidad de las mismas, dando como resultado la pérdida de función, como es el caso de la MnSOD (80,81), o una ganancia de función, como ocurre en el citocromo c (82). Hay que considerar que adjudicar un cambio en la función de una proteína debido a la formación de 3-NT no es sencillo, debido a que, por lo general, las condiciones de nitración pueden inducir la oxidación de más de un residuo (59). Por otro lado, la 3-NT no es blanco de fosforilación por tirosina quinasas, por lo que pueden bloquearse varias cascadas de fosforilación de distintas proteínas (83).

La incorporación del grupo nitro a la tirosina tiene consecuencias fisicoquímicas importantes. A partir de la nitración, el pK_a para el grupo hidroxilo disminuye de 10,5 a entre 7-7,5 (84), por lo que a pH fisiológico aumenta la cantidad de fenolato, aunque a pH ácido habitualmente aumenta la hidrofobicidad de los péptidos con 3-NT. Como consecuencia, se espera que la nitración pueda alterar la estructura tridimensional de una proteína. El grupo nitro es también un sustituyente de gran tamaño, por lo que puede ejercer grandes impedimentos estéricos.

La nitración de una proteína puede promover su degradación por el sistema proteasomal 20S (85,86). En acuerdo con esto, la inhibición del proteasoma genera un aumento en las modificaciones nitro-oxidativas de proteínas (87). Sin embargo, para algunas proteínas

(incluyendo aS), la nitración en residuos de tirosina inhibe su degradación por esta vía, lo que podría derivar en la acumulación de la proteína modificada o anómala (88).

Una de las propiedades más interesantes de las proteínas nitradas es su capacidad de desencadenar una respuesta inmunitaria. Esto se debe al reconocimiento específico del péptido nitrado por linfocitos T CD4⁺ (89,90). Es importante destacar que en caso de la EP y otras sinucleinopatías, se ha encontrado la activación de una respuesta inmune que podría potenciar la muerte neuronal (91), siendo la aS nitrada uno de los posibles antígenos reconocidos (92,93).

Por último, la disminución de 3-NT independientemente de las vías de degradación proteica, ha sugerido la existencia de una enzima “denitrasa” que catalizaría la reducción de 3-NT por un mecanismo aún no determinado (94).

Oxidación de metionina

La metionina es un aminoácido con un grupo tioéter que puede oxidarse a metionina sulfóxido (MetO) por varios oxidantes como ONOO⁻, H₂O₂ o hipoclorito (HClO). Esta modificación puede alterar la estructura y la función de las proteínas, pero a diferencia de la nitración de tirosina, es reversible. La oxidación a MetO genera una mezcla de los enantiómeros (S)-MetO, y (R)-MetO, que podrán ser sustrato de las enzimas metionina sulfóxido reductasa A (MsrA) y B (MsrB) respectivamente (95), utilizando el sistema dependiente de tioredoxina. Los 4 residuos de metionina de aS pueden oxidarse *in vitro* a MetO (96).

En cambio, en presencia de oxidantes fuertes, la metionina puede oxidarse a metionina sulfona (MetO₂), la cual es una reacción irreversible. *In vivo* se han encontrado residuos oxidados MetO₂ en la proteína DJ-1, en pacientes con diagnóstico de algunas formas hereditarias de EP o EA (97).

1.4 Formación de especies agregadas de alfa-sinucleína

La aS es una proteína intrínsecamente desordenada, pero dispone de una gran diversidad conformacional. La región NAC tiene capacidad de interactuar con otras regiones NAC y formar agregados de alto peso molecular. Estos agregados pueden ser de dos formas muy heterogéneas: fibras y oligómeros. La agregación a fibras implica la transición de aS desde una estructura desordenada, a una forma insoluble con una estructura secundaria predominante de hoja-β. Dado que los cuerpos de Lewy contienen aS en forma fibrilar, se propuso inicialmente que la agregación de aS a estas estructuras estaría implicada directamente con la patogénesis de EP. Sin embargo, el descubrimiento de variantes de EP con aparición temprana causadas por

mutaciones en aS que enlentecen la formación de fibras, y de otras variantes de EP sin cuerpos de Lewy, desafiaron esta hipótesis.

1.4.1 Mecanismo de agregación

El proceso de agregación desde el monómero de aS a fibras se ha estudiado en profundidad en modelos *in vitro*. El proceso de formación de agregados consta de 3 fases: fase de latencia, fase de elongación y una fase estacionaria. Esto es consistente con un mecanismo dependiente de nucleación (98), que ocurre en la fase de latencia. Aquí, el monómero de aS se reordena formando un núcleo sobre el que continúan agregándose más monómeros. Esta fase es la etapa limitante de la velocidad del proceso. En la fase de elongación ocurre la formación de otras especies intermediarias como oligómeros y protofibrillas. Por último, en la fase estacionaria se han formado fibras maduras que están en equilibrio con el monómero.

Muchos resultados reportados acerca de las especies que intervienen en la agregación son contradictorios y difíciles de interpretar, debido a la heterogeneidad de las distintas formas de aS involucradas, y de las condiciones experimentales.

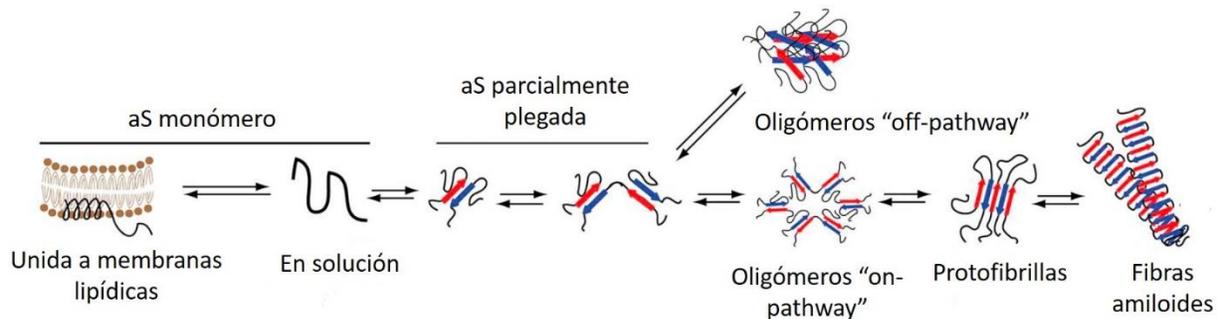


Figura 4. Mecanismo de formación de fibras y oligómeros. El monómero en solución tiene una estructura "random coil". Al exponerse las regiones NAC, estos interactúan formando agregados. Dependiendo de los factores que regulan estos mecanismos, se pueden formar fibras amiloides u oligómeros que se desvían de esta ruta. Adaptado de (99).

Actualmente se propone que la vía formadora de fibras requiere la formación de oligómeros denominados "on-pathway" y una especie rica en α -hélice (100). Esto se ha denominado "nucleación primaria". Sin embargo, las fibras pueden romperse, generando fragmentos más pequeños y otros oligómeros que pueden catalizar una nucleación secundaria. Además de este camino en la formación de estructuras de aS agregadas, existen vías en las que pueden formarse oligómeros "off-pathway". Estos oligómeros serían estructuralmente diferentes a los anteriores, e incapaces de proceder hacia la formación de fibras (99).

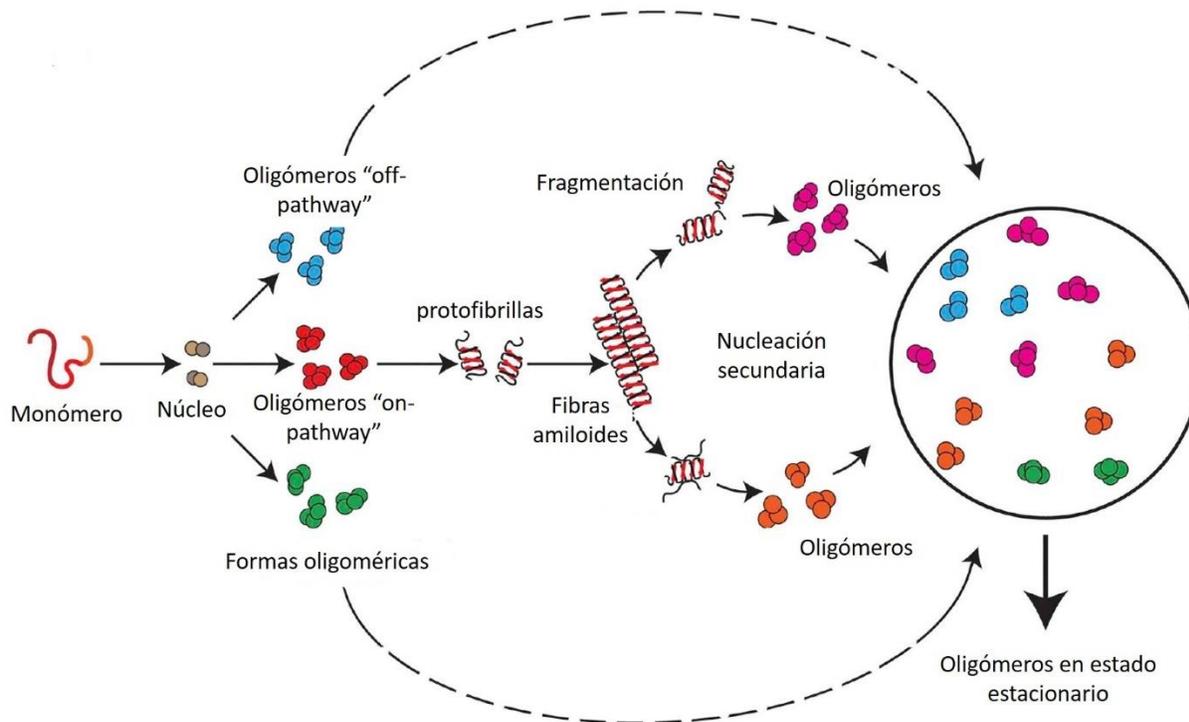


Figura 5. Formación de oligómeros. Los oligómeros representan agregados de aS. Los oligómeros denominados “on-pathway” conllevan a la formación de fibras amiloides. Estas pueden romperse generando nuevas especies de oligómeros que intervienen en una nucleación secundaria. También se pueden formar oligómeros “off-pathway” que no forman fibras. El resultado es una población muy heterogénea de oligómeros, en equilibrio con las fibras formadas y el monómero. Adaptado de (99)

Muchos factores pueden alterar la cinética del proceso de fibrilización. Entre ellos se destacan la concentración proteica, el pH, mutaciones puntuales, y modificaciones postraduccionales (15,98).

1.4.2. Rol biológico de estructuras de alfa sinucleína agregada

La capacidad de aS para formar un grupo tan heterogéneo de estructuras, ha generado el debate acerca de la relevancia particular de cada una de ellas en el establecimiento de la EP. Algunos hallazgos sugirieron que los oligómeros son los primeros responsables de la neurotoxicidad (101). Esta teoría es apoyada por la observación de que las neuronas que presentan cuerpos de Lewy no se muestran en estado senescente. Se ha propuesto que la toxicidad de los oligómeros se basa en la formación de poros en las membranas biológicas, lo que determinaría un influjo de Ca^{2+} capaz de potenciar efectos citotóxicos (102,103). Sin embargo, también se han publicado resultados que colocan a las especies fibrilares de aS como

neurotóxicas (104).

Por último, la aS anómala puede propagarse por el sistema nervioso de forma priónica (105,106). Un prion es una proteína con un plegamiento particular, que tiene la capacidad de generar el mismo plegamiento en otras proteínas, haciendo que éstas pierdan su función normal. En caso de la aS, la muerte de neuronas actuaría como el mecanismo que libera las especies agregadas al tejido, pudiendo entonces ser capturadas por neuronas vecinas. Los mecanismos de incorporación de estas proteínas del medio extracelular abarcan la endocitosis, la transmisión directa y la interacción con un receptor (107).

2. Objetivos

Objetivo general

Estudiar el impacto de la formación de 3-nitrotirosina en la proteína α S, evaluando las alteraciones en sus propiedades biofísicas, fundamentalmente en la capacidad de formar fibras y oligómeros.

Objetivos específicos

- 1- Obtención de formas mutantes de la proteína alfa-sinucleína que presentan un único residuo de tirosina (Y39 e Y136).
- 2- Expresión y purificación de la proteína recombinante de alfa-sinucleína wild-type y de las formas mutantes.
- 3- Caracterización de la proteína a nivel estructural y funcional.

3. Materiales y métodos

Para abordar los objetivos planteados se propuso la creación de 2 proteínas mutantes, portadoras de un residuo de tirosina. Partiendo de la secuencia wild-type (wt) la estrategia para desarrollar los mutantes se representa en la figura 6. En este trabajo se comenzó a trabajar a partir del doble mutante Y125F/Y133F, obtenido previamente por el laboratorio.

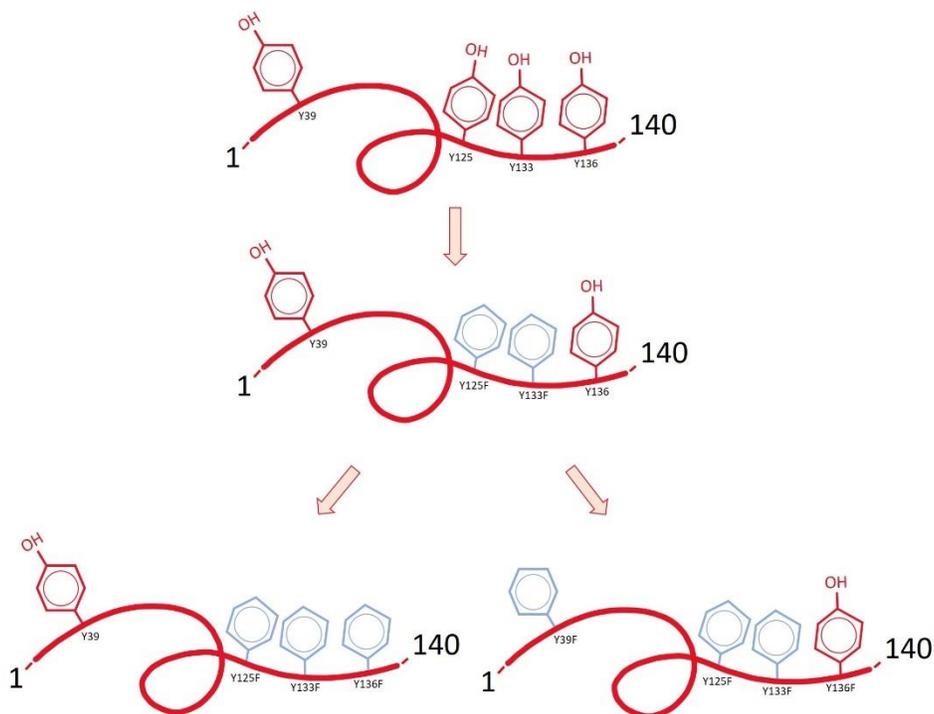


Figura 6. Estrategia experimental para obtener mutantes de aS con una sola tirosina en los extremos N y C-terminal. Desde la secuencia de aS wt clonada, se comenzó la mutagénesis en los residuos de tirosina 125 y 133. En este trabajo se propuso obtener los mutantes con una sola tirosina.

Los ensayos para la obtención de proteínas mutantes fueron realizados con Dolores Piñeyro, en el Laboratorio de Interacciones Hospedero-Patógeno del Instituto Pasteur de Montevideo.

3.1 Obtención de formas de alfa-sinculeína mutantes en tirosina

3.1.1 PCR para mutagénesis

Para obtener las formas mutantes de aS se utilizó el vector pET-30 con resistencia al antibiótico kanamicina, en el cual se encuentra clonado el gen de aS wt (figura 1, anexo).

La mutagénesis dirigida se realizó utilizando el kit “QuikChange II Site-Directed Mutagenesis” (Agilent Technologies), siguiendo las indicaciones del fabricante y la enzima ADN

polimerasa PfuTurbo, que presenta una alta fidelidad de replicación. Los cebadores utilizados para la mutagénesis se diseñaron utilizando los software Primer Blast (NCBI) y Oligo Analyzer™ Tool (Integrated DNA technologies), siguiendo las especificaciones del kit de mutagénesis. En particular, estos cebadores deben tener preferentemente 25 pb de longitud, una temperatura de melting (T_m) entre 55° y 80°C, y poca probabilidad de formar estructuras secundarias como horquillas o loops. En el anexo se detallan los cebadores diseñados (tabla 1 y figura 2, anexo) y las condiciones de PCR para la mutagénesis (tabla 2, anexo). Como control negativo de cada reacción de PCR se realizó la reacción en ausencia del molde de ADN.

Previo a la transformación, el producto de PCR fue tratado con 0,5 μ L de la enzima endonucleasa *Dpn-1*, la cual es específica para el ADN parental. Luego de agregar la enzima, se incubó la mezcla de reacción durante 60 minutos con agitación a 300 rpm y a 37°C.

3.1.2. Colony PCR

Para evaluar la presencia del gen aS en las colonias de bacterias transformadas, se realizaron Colony PCR. Las condiciones de la PCR se detallan en la tabla 3 del anexo. Dado que se pretende evaluar únicamente la presencia del gen, se utiliza la enzima Taq ADN polimerasa. Los cebadores utilizados fueron el cebador 1 forward y el cebador 6 reverse (tabla 1 del anexo), por lo que se espera un amplicón de aproximadamente 300 pb.

3.1.3. Electroforesis de ADN

Todos los productos de PCR y el ADN plasmídico obtenido fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa 1% o 1,5%. La electroforesis se realizó en buffer de corrida TAE (Tris-Acetato-EDTA, pH 8,0) a 100 voltios durante aproximadamente 20 minutos. Para revelar las bandas de ADN se utilizó el intercalante “Good View” similar al bromuro de etidio y un transiluminador UV para visualizar el gel. Se utilizaron marcadores de peso molecular de 100pb o 1 kb (Invitrogen y ThermoScientific respectivamente).

3.1.4. Transformación en células DH5- α quimiocompetentes

Para preparar células *E. coli* DH5- α quimiocompetentes, se tomó una colonia y se precultivó en 10 mL de medio de cultivo LB no selectivo over-night (O.N.) con agitación a 37°C. Posteriormente, se transfieren 100 μ L del precultivo a 10 mL de medio LB no selectivo y se incubó con agitación a 37°C hasta una densidad óptica de 0,4 a 600 nm (DO_{600}). Luego se transfirió el cultivo a un tubo de centrifuga estéril, se incubó en hielo 10 minutos y se centrifugó a 1000g por

10 minutos a 4°C. El pellet obtenido se dejó escurriendo y se resuspendió en 5 mL de solución de TSS fría (Solución 1, anexo). A continuación, se volvió a centrifugar y el pellet fue resuspendido en 1 mL de solución TSS por agitación suave. Las células se almacenaron a -70°C en alícuotas.

Para la transformación, se mezclaron 24 µL de bacterias quimiocompetentes con 8 µL del producto de PCR, incubando la mezcla en hielo por 15 minutos. Se realizó un golpe térmico a 42°C durante 30 segundos y se incubó nuevamente en hielo durante 60 segundos. Posteriormente, se agregaron 250 µL de medio de cultivo SOC o LB, y se incubó a 37°C con agitación durante 60 minutos. Por último, se plaqueó en medio LB-agar con kanamicina 25 µg/mL. Como control negativo se transformó el control de la PCR sin molde de ADN.

3.1.5. Transformación en células DH5-α electrocompetentes

Para preparar células electrocompetentes de la cepa *E. coli* DH5-α, se realizó un precultivo O.N. Luego se agregaron 150 mL de medio LB y se incubó hasta una DO₆₀₀ de 0,6. Se centrifugó a 4000g y a 4°C durante 15 minutos y se resuspendió el pellet en 1 volumen de H₂O fría. Se repitió 3 veces el paso de centrifugación, resuspendiendo el pellet en 1/2 volumen de H₂O, 0,02 volúmenes de H₂O y 0,03 volúmenes de glicerol al 10% respectivamente. Las bacterias se almacenaron a -70°C.

3.1.6. Extracción de ADN plasmídico

La extracción del ADN plasmídico (miniprep) se realizó utilizando el kit comercial ZymoPure™ plasmid miniprep (Zymo Research), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las miniprep obtenidas fueron cuantificadas por Nanodrop, analizadas por electroforesis en gel de agarosa 1,5% y enviadas a secuenciar.

3.2 Expresión y purificación de las proteínas recombinantes

3.2.1 Transformación en vector de expresión

Los plásmidos fueron transformados en cepas de *E. coli* BL21/DE3. Para ello, se realizó un precultivo de 3 mL en medio LB hasta una DO₆₀₀ de 0,4. Las células se centrifugaron a 10.000g durante 60 segundos y el pellet de bacterias fue resuspendido en 100 µL de CaCl₂ 0,1 M estéril frío. Este paso se repitió dos veces. A continuación, se agregaron 100 ng del plásmido a transformar incubando la mezcla 60 minutos en hielo. Luego se incubó 3 minutos a 37°C y 3 minutos en hielo. A continuación, se agregaron 400 µL de LB no selectivo y se incubó durante 1

hora a 37°C con agitación a 220 rpm. Por último, se plaqueó en LB-agar con kanamicina 30 µg/mL.

3.2.2. Expresión de alfa sinucleína

La expresión se realizó mediante inducción por IPTG (isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido). Por cada proteína, se realizaron dos precultivos de 10 mL de LB con kanamicina 30 µg/mL desde colonias aisladas. Los precultivos fueron inoculados a dos matraces de 400 mL de LB con kanamicina, incubándose a 37°C con agitación durante 3 horas. Luego de ese tiempo y al alcanzar una DO₆₀₀ entre 0,6 y 0,8, se agregó IPTG 0,5 mM sólido. La inducción se llevó a cabo durante 4 horas a 37°C. Se extrajeron alícuotas de 1 mL en cada paso, centrifugando y resuspendiendo el pellet en 100 µL de H₂O. La expresión se corroboró mediante electroforesis SDS-PAGE 12%, comparando en el gel las muestras del cultivo tomadas antes y después de la inducción. Transcurrido el tiempo de incubación, se centrifugaron los cultivos y se guardaron los pellets bacterianos a -20°C hasta la etapa de purificación.

3.2.3. Purificación de alfa sinucleína

Para la purificación de proteínas, los pellets bacterianos obtenidos en la sección anterior se resuspendieron en 20 mL de buffer de lisis (Tris 10 mM; pH 7,5; NaCl 750 mM; EDTA 1mM; PMSF). Las bacterias resuspendidas fueron homogeneizadas en cámara fría utilizando un mortero de vidrio conectado a un motor giratorio, repitiendo 8 veces el proceso de homogeneizado.

El lisado se incubó durante 10 minutos a 100°C por baño maría, generando que la mayoría de proteínas precipiten, excepto aS. Se centrifugó a 10.000 rpm durante 15 minutos a 4°C y el sobrenadante se filtró con papel whatman 4M.

A continuación, se añadió sulfato de estreptomina (10 mg/mL) y se centrifugó a 13.000 rpm durante 15 minutos a 4°C, para precipitar ácidos nucleicos.

Se precipitó la aS con sulfato de amonio 0,36 g/mL con agitador magnético durante 30 minutos a 4°C. Luego se centrifugó a 13.000 rpm durante 10 minutos. El pellet se resuspendió en 3 mL de buffer Tris 10 mM (pH 7,5) y fue sometido a diálisis O.N. contra buffer Tris 10 mM (pH 7,5; EDTA 1 mM) con el fin de eliminar el exceso de sales.

El último paso de purificación consistió en realizar una cromatografía HPLC de intercambio iónico detectando la absorbancia a 280 nm. Se utilizó una columna Resource Q para una cromatografía de intercambio aniónico, ya que la aS tiene un punto isoeléctrico teórico de 4,6. Por cada cromatografía se inyectaron 2,5 mL (el volumen obtenido por la diálisis fue

aproximadamente 5 mL). La elución de la proteína se logró cambiando la fuerza iónica en gradiente, pasando de un buffer A (Tris 10mM; pH 7,5), a un buffer B (Tris 10 mM; pH 7,5; NaCl 1 M), fijando el flujo en 2,5 mL/min. El gradiente de fuerza iónica es el siguiente: de 0-5 minutos 100% buffer A, de 5-20 minutos se establece un gradiente lineal entre 0-20% de B. Entre 20-35 minutos el gradiente aumenta de 20-35% de B, entre 35-50 minutos el gradiente es de 35-100% de B y entre 50-60 minutos se mantiene un 100% de B.

El pico correspondiente a aS fue dializado contra buffer Tris 5 mM (pH 7,5) O.N. y concentrado con un sistema Amicon Ultra 10 kDa, centrifugando a 3000 rpm durante 10 minutos.

En cada paso de purificación se tomaron alícuotas de las fracciones para analizarlas por SDS-PAGE 12% y la fracción final fue analizada por espectrometría de masa para corroborar su peso molecular.

Para evitar la formación de estructuras agregadas, las proteínas obtenidas fueron alícuotadas a concentraciones bajas (aproximadamente 300 μ M), liofilizadas y almacenadas a -80°C

3.2.4 Cuantificación de proteínas

Para cuantificar las proteínas se utilizó el método de ácido bicinconínico (BCA). Este método se basa en la reducción del Cu^{2+} a Cu^{1+} por el enlace peptídico (y algunos residuos aminoacídicos como metionina y tirosina), y en la formación de un complejo coloreado entre el Cu^{1+} y el BCA (con un máximo de absorbancia a 562 nm). La cuantificación se realizó por triplicado, utilizando una curva de calibración con albúmina sérica bovina (BSA).

Alternativamente, la cuantificación se realizó por absorbancia a 280 nm utilizando $\epsilon_{280} = 5960 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para aS wt, y $\epsilon_{280} = 1490 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para las mutantes, calculado utilizando la herramienta ProtParam (Expasy).

3.3. Caracterización de la proteína a nivel estructural y funcional

3.3.1. Nitración por peroxinitrito

Se evaluaron las mejores condiciones para obtener las proteínas nitradas utilizando ONOO^{-} como agente nitrante. Las proteínas liofilizadas fueron disueltas a 100 μ M en 100 μ L de buffer de nitración (fosfato 0,1 M; pH 7,4; DPTA 0,1 mM; HCO_3^{-} 25 mM). El ONOO^{-} se administró por infusión o por bolo a las concentraciones 0, 0,5, 1 o 2 mM. La nitración por infusión se realizó con un sistema KDSscientific, a un flujo de 1,7 μ L/min durante 30 minutos. La nitración se confirmó por espectrometría de masa, reconociendo la adición de 45 Da, correspondiente al incremento

asociado a la incorporación de un grupo nitro. Además, se evaluó la nitración de aS mediante western-blot con anticuerpos anti-aS y anti-3-NT.

La cuantificación de ONOO^- se realiza por espectrofotometría de absorbancia UV utilizando $\epsilon_{302} = 1,7 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

3.3.2. Western blot

Las proteínas nitradas fueron analizadas por electroforesis SDS-PAGE 12% y western-blot mediante transferencia húmeda a membrana de nitrocelulosa O.N. Para verificar la transferencia, las membranas fueron teñidas con Rojo Ponceau, el cual fue lavado con buffer fosfato salino (PBS). El bloqueo de la membrana se realizó con PBS-leche 5% durante una hora. Se utilizaron anticuerpos primarios anti-3-NT policlonales producidos en conejo (1:500) y anti-aS monoclonales producidos en ratón (1:1000), diluidos en PBS-tween 0,1%. La incubación con anticuerpos primarios se realizó O.N. a 4°C. Posteriormente se realizaron lavados de 5, 10 y 15 minutos con el buffer PBS-tween y se incubó con anticuerpos secundarios anti-conejo o anti-ratón durante 1 hora. Luego de una segunda serie de lavados, para remover el anticuerpo secundario no unido, las proteínas inmunoreactivas se visualizaron utilizando el sistema de revelado LI-COR Odyssey Imaging System (Biosciences).

3.3.3. Espectrometría de masas

Las proteínas aS obtenidas fueron analizadas por espectrometría de masa (ESI-MS) (Applied Biosystems) para corroborar la masa esperada. Se diluyeron 10 μL de proteína 0,1 mM (en buffer fosfato 100 mM o de nitración), en 90 μL de ácido fórmico 0,1% (concentración final). Se realizó la ionización en modo positivo, obteniendo el espectro m/z .

3.3.4. Ensayo de formación de fibras

Las proteínas (100 μM) se incubaron en buffer de nitración a 37°C con agitación (1400 rpm). Alícuotas de 5 μL del ensayo, a varios intervalos de tiempo, se mezclaron con 1 mL de Tioflavina T 10 μM (ThT) preparada en buffer Glicina-NaOH (50 mM; pH 8,5). A esta mezcla se le midió la fluorescencia utilizando $\lambda_{\text{ex}} = 450 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{em}} = 482 \text{ nm}$. Las fibras amiloides son estructuras con una disposición particular de hojas- β . La unión de la ThT a estas estructuras aumenta el rendimiento cuántico de fluorescencia, en una medida proporcional a la cantidad de fibras formadas (108).

En paralelo, se tomaron alícuotas de 100 μ L a los mismos tiempos y se midió la absorbancia a 280 y a 600 nm. Las alícuotas se devolvieron a la reacción una vez tomada la medida. Las muestras del tiempo final se analizaron por electroforesis nativa y SDS-PAGE 12% para evaluar la composición de fibras, oligómeros y monómeros presentes. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

3.3.5. Ensayo de formación de oligómeros

Las proteínas liofilizadas se resuspendieron a una concentración de 300 μ M en 1 mL de buffer Hepes 10 mM (pH 7,4) y se incubaron a 37°C sin agitación durante 24 horas. Se extrajeron muestras para analizar por cromatografía de exclusión molecular y por electroforesis nativa.

Una vez incubadas las muestras, se procedió a su purificación mediante centrifugación a 14.100g durante 40 minutos a 4°C. Se filtró el sobrenadante mediante filtros con “cut-off” de 100 kDa por centrifugación a 5000g durante 6 minutos a 4°C. Luego se realizaron 3 lavados con 400 μ L del mismo buffer, por centrifugación a 6000 g durante 10 minutos cada uno. Los oligómeros se resuspendieron y eluyeron invirtiendo el filtro y centrifugando a 6000g durante 10 minutos. Por último, fueron resuspendidos en 40 μ L del buffer Hepes.

3.3.6. Cromatografía de exclusión molecular

Los oligómeros formados sin purificar fueron analizados por cromatografía de alta resolución HPLC de exclusión molecular, utilizando una columna de Superosa 6 (30 x1 cm) evaluando la formación de agregados de alto peso molecular, así como la presencia del monómero.

3.3.7. Electroforesis nativa

Los ensayos de agregación a fibras y oligómeros fueron analizados por electroforesis en gel poliacrilamida 7,5% en condiciones nativas. En cada caso se cargó 1 μ g de proteína total. Para revelar los geles nativos se utilizó la tinción de plata. Para ello, se fijó el gel en solución de fijación (solución 2, anexo) durante 60 minutos con agitación lenta y se lavó 3 veces con solución de lavado (solución 3, anexo), durante 5, 10 y 15 minutos cada uno. Luego se enjuagó rápidamente con solución de tiosulfato (solución 4, anexo) y se lavó con H₂O nanoQ 3 veces. Seguido a esto, se incubó durante 20 minutos en solución de nitrato de plata (solución 5, anexo) y se enjuagó 3 veces. Finalmente, se reveló con la solución de revelado (solución 6, anexo) hasta observar bandas.

3.3.8. Dicroísmo circular

Las proteínas sin modificar y nitradas fueron analizadas por dicroísmo circular (DC) en la región UV lejano (190-260 nm). También se evaluó la capacidad de formación de estructuras secundarias con el agregado del detergente SDS 2 mM. Por otra parte, con este método también se analizaron muestras de los ensayos de agregación, con el fin de realizar el seguimiento temporal de la misma. Para ello se extrajeron 20 μ L de reacción a cada intervalo temporal y se diluyeron en buffer fosfato 20 mM (pH 7,4).

3.3.9. Dispersión dinámica de luz

Para caracterizar los oligómeros purificados, se utilizó la técnica “Dispersión dinámica de luz” (DLS) (Zetasizer NanoS, Malvern Instruments Ltd). Previamente, los oligómeros purificados fueron cuantificados utilizando el equipo Qubit (Life Technologies). Las medidas por DLS se tomaron por triplicado a 25°C. La luz total dispersada con un ángulo de 90° fue registrada usando un tiempo de adquisición de 10 segundos.

3.3.10. Microscopía electrónica de transmisión

Las muestras de oligómeros purificados se tiñeron con acetato de uranilo y se tomaron imágenes utilizando un microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM-1010.

4. Resultados

4.1. Obtención de formas mutantes Y39 e Y136

La mutagénesis por PCR permite obtener mutantes de aS sustituyendo tirosina por fenilalanina, para ello se diseñaron varios cebadores que permiten cambiar una o dos bases por mutagénesis (tabla 1 del anexo). La cantidad de bases a modificar varía en relación a los codones codificantes para tirosina (UAU o UAC) presentes en el gen, que podrán mutarse por codones que codifican fenilalanina (UUU o UUC respectivamente).

En este trabajo, se comenzó construyendo el mutante Y125F/Y133F/Y136F, denominado Y39 por poseer únicamente esa tirosina. Esto fue llevado a cabo utilizando el par de cebadores número 4 (tabla 1, anexo) y partiendo del doble mutante Y125F/Y133F. Luego del protocolo de transformación en células DH5- α y la extracción de ADN plasmídico (figura 7), se secuenció el gen obtenido (secuencia 4, figura 3 del anexo). Sin embargo, esta secuencia corresponde al doble mutante Y125F/Y136F, y no al triple mutante esperado, debido a que el cebador utilizado revirtió la mutación en la posición 133.

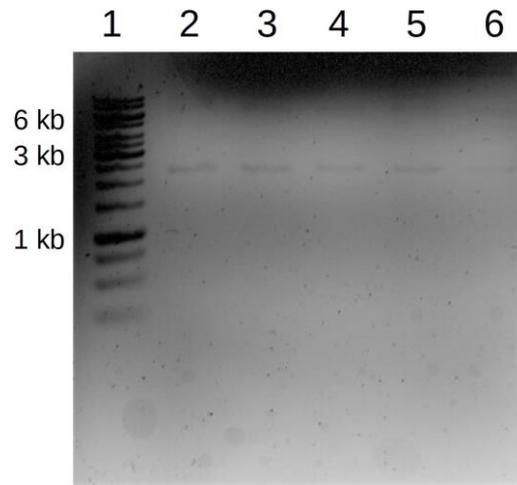


Figura 7. Minipreps Y125F/Y136F. Gel de agarosa 1% en el cual se sembraron las minipreps extraídas del primer intento para la generación del mutante Y39. La banda correspondiente al plásmido se observa muy tenue entre los 3 y 6 kb. Carril 1: GeneRuler. Carriles 2-6: minipreps de 5 colonias diferentes.

Se intentó utilizar un par de cebadores que realice en forma simultánea las mutaciones Y133F e Y136F (par número 5, tabla 1 anexo), ya adquirido por el laboratorio, pero no se logró amplificar el gen.

Se decidió entonces, diseñar un nuevo par de cebadores (par 6, tabla 1 anexo), que permita mantener la mutación en la posición 136 al mutar la tirosina 133, partiendo del molde obtenido (Y125F/Y136F). Con este cebador se realizó la reacción de PCR y el amplicón se verificó por electroforesis (figura 8), observándose el tamaño esperado (5 kb), sin amplificación en el control negativo.

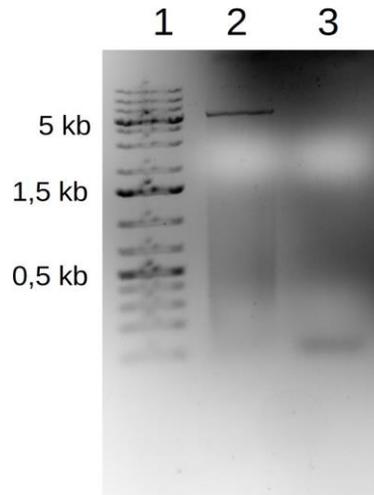


Figura 8. PCR Mutagénesis para Y39. Electroforesis en gel de agarosa 1%. Fueron sembrados los productos de PCR de mutagénesis. Carril 1: Marcador GeneRuler. Carril 2: Amplicón de mutante Y39. Carril 3: Control negativo de PCR.

Se realizó la transformación con bacterias quimiocompetentes pero no se obtuvo crecimiento de colonias. Por lo tanto, se utilizaron bacterias DH5- α electrocompetentes. La presencia del plásmido se corroboró mediante "Colony PCR" de 7 colonias de la misma placa, utilizando los pares de cebadores 1 y 6 (tabla 1 del anexo), generando un producto de 314 pb (figura 9).

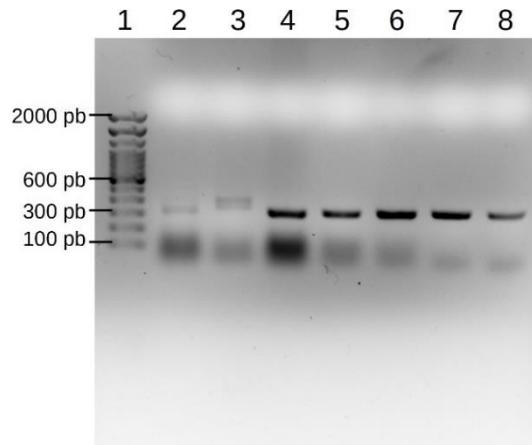


Figura 9. Colony PCR Y39. Gel agarosa 1,5%. Amplicones de Colony PCR para distintas colonias (carriles 2-8) de células DH5- α transformadas con aS Y39. Carril 1: Marcador GeneRuler 100pb.

La extracción de ADN plasmídico no tuvo buen rendimiento, lo que logró mejorarse utilizando el kit comercial ZymoPure (figura 10) obteniendo en promedio 1,7 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de ADN. La secuencia del mutante obtenida corresponde a la secuencia 4 en la figura 3 del anexo.

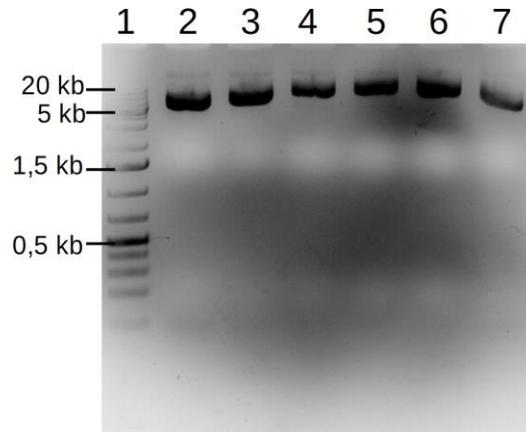


Figura 10. Minipreps Y39 e Y136. Gel agarosa 1%. Minipreps preparadas de colonias de células DH5- α transformadas con aS Y136 (Carriles 2-4) e Y39 (Carriles 5-7).

A continuación, se realizó la construcción del mutante Y39F/Y125F/Y133F, denominado Y136. Para ello se introdujo la mutación Y39F partiendo del doble mutante Y125F/Y133F y utilizando el par de cebadores número 1 (tabla 1 del anexo). La amplificación por PCR (figura 11) muestra el amplicón de 5 kb, sin amplificación para el control negativo.

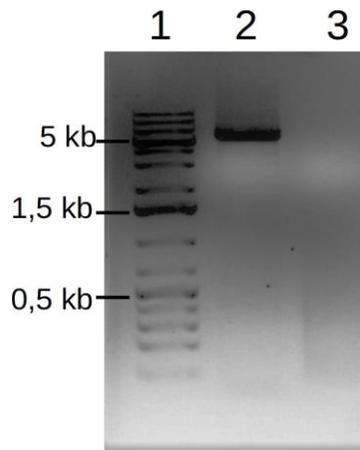


Figura 11. PCR mutagénesis para Y136. Electroforesis en gel de agarosa 1%. Amplicón de PCR de mutagénesis. Carril 1: Marcador GeneRuler. Carril 2: Amplicón de mutante Y136. Carril 3: Control negativo de PCR.

Luego del protocolo de transformación se realizó colony PCR a 7 colonias, para confirmar la presencia del inserto de aproximadamente 300 pb (figura 12). De igual forma que el mutante anterior, la extracción de ADN plasmídico no tuvo alto rendimiento, por lo que se utilizó el kit comercial (figura 10). El ADN plasmídico obtenido fue secuenciado y se muestra en la secuencia 5 (figura 3, anexo).

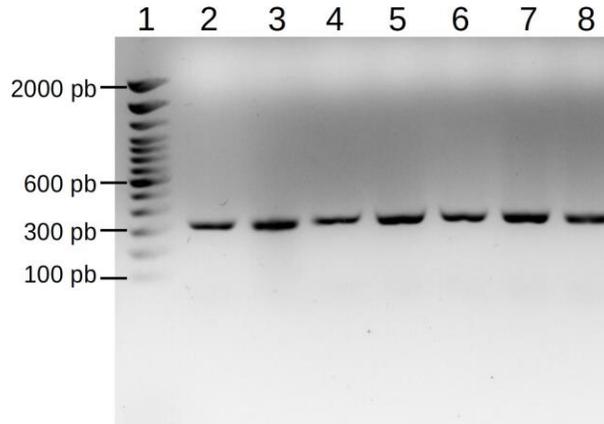


Figura 12. Colony PCR Y136. Electroforesis en gel de agarosa 1,5%. Amplicones de Colony PCR para distintas colonias (carriles 2-8) de células DH5- α transformadas con aS Y136. Carril 1: Marcador GeneRuler 100pb.

4.2 Expresión y purificación de alfa sinucleína wild-type y de las formas mutantes

Para verificar la expresión de aS wt y formas mutantes, se analizó por electroforesis SDS-PAGE el patrón de bandas antes y después de la inducción (figura 13). El aumento de una proteína que corresponde con el peso molecular de aS luego de la inducción indica una expresión

exitosa. Una vez verificado que la proteína se encuentra expresada, se prosiguió con el protocolo de purificación.

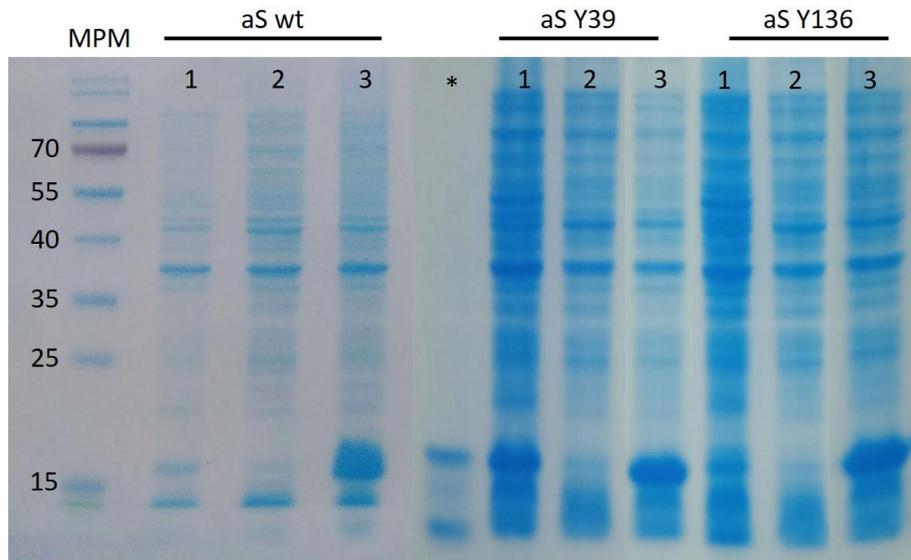


Figura 13. Expresión de proteínas. Electroforesis SDS-PAGE 12% de expresión para aS wt, Y39 e Y136. Tinción con azul de Coomassie. Se detallan los pesos moleculares del marcador de peso molecular (MPM). 1- precultivo; 2-antes de la inducción; 3-luego de la inducción con IPTG 0,5 mM. *- aS wt estándar (debido al tiempo de almacenamiento pueden observarse productos de degradación). Se observa aS en los precultivos, probablemente debido a un fenómeno de autoinducción por las condiciones de crecimiento.

El precipitado de aS obtenido por precipitación por sulfato de amonio fue sometido a diálisis para posteriormente purificarse por cromatografía de intercambio iónico. La figura 14 muestra los cromatogramas representativos obtenidos para las proteínas purificadas. La aS wt tuvo un tiempo de retención entre 30 y 35 minutos, observándose un pico ancho y definido. Las proteínas mutantes Y39 e Y136 nunca habían sido purificadas por el laboratorio, por lo que se desconocía su comportamiento en la cromatografía. Por esta razón, se colectaron varios picos a distintos tiempos, y para evaluar si contenían aS se realizó un dot-blot con anticuerpo primario anti-aS policlonal (figura 15). Ambas mutantes tuvieron un tiempo de retención menor al wt, entre 22 a 25 minutos para la Y39, y de 22 a 26 minutos la Y136. La proteína Y136 eluyó en dos picos durante esa purificación. Al final de las cromatografías, entre 40 y 45 minutos, eluyen las proteínas restantes.

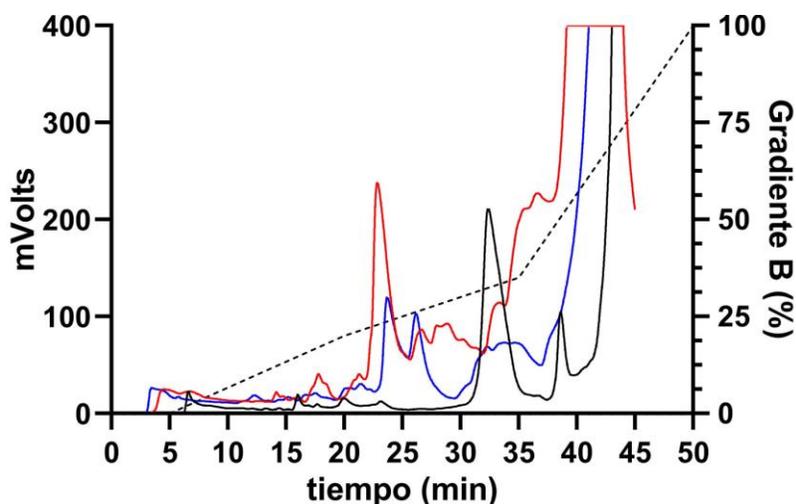


Figura 14. Cromatografías de intercambio iónico. Cromatogramas representativos de purificación por HPLC de proteína aS wt (línea negra), mutante Y39 (línea roja) y mutante Y136 (línea azul). La detección se realiza por un detector de absorbancia a 280 nm. Línea negra punteada corresponde al gradiente de buffer de elución (eje Y derecho).

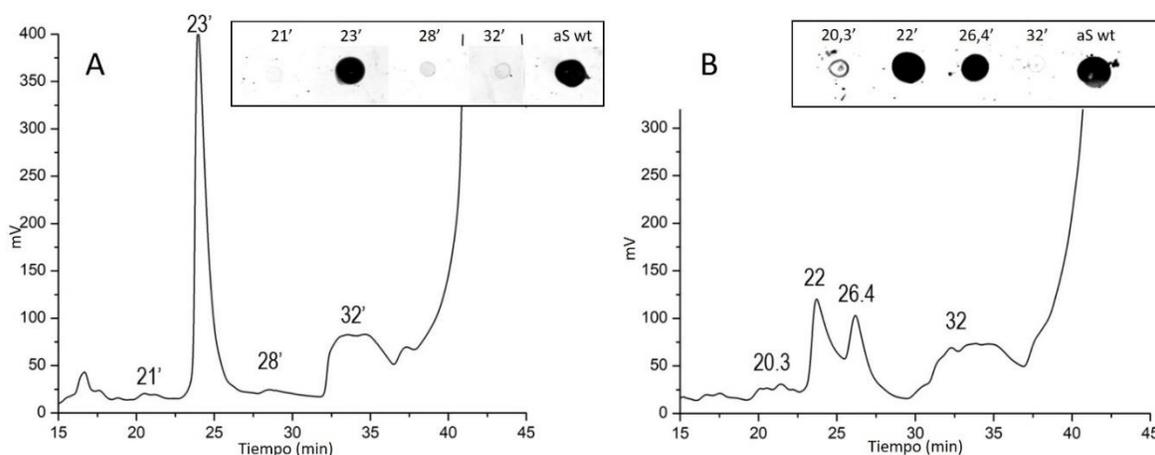


Figura 15. Análisis de elución para aS mutantes. Cromatogramas de purificación por HPLC por intercambio iónico de las proteínas aS mutantes Y39 (A) e Y136 (B). Se señalan los picos (en minutos) que fueron analizados por dot-blot y el resultado de estos en los insertos. Se utilizó aS wt como control positivo y un anticuerpo anti-aS. Los dos picos de aS Y136 (a los 22 y 26,4 minutos de elución) fueron colectados por separado y se juntaron posteriormente al análisis por dot-blot.

El proceso de purificación se evaluó mediante electroforesis SDS-PAGE de todas las fracciones (figuras 16, 17 y 18). Al finalizar se obtuvo una proteína del tamaño adecuado y con un nivel de pureza aceptable para los ensayos siguientes, como se observa en los carriles correspondientes. En los gels de purificación se pudo observar la presencia de bandas de alto PM que no logran ingresar al gel separador, por lo que las proteínas se filtraron con un “cut-off” de 100 kDa, logrado su eliminación (figura 19). Esto permitió partir de las mismas condiciones en los ensayos posteriores.

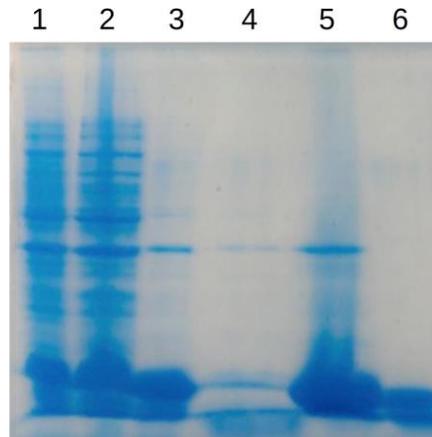


Figura 16. Purificación aS wt. Electroforesis SDS-PAGE 12%. Tinción azul de Coomassie. Carril 1: Fracción +IPTG; Carril 2: Lisado bacteriano; Carril 3: Desnaturalización térmica; Carril 4: Precipitación (sobrenadante); Carril 5: Precipitación (pellet); Carril 6: aS wt purificada (dilución 1:10).

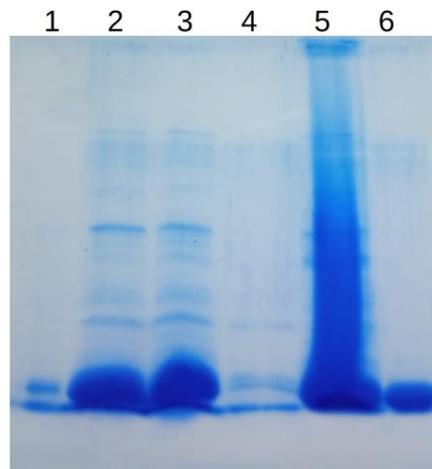


Figura 17. Purificación aS Y39. Electroforesis SDS-PAGE 12%. Tinción azul de Coomassie. Carril 1: Estándar aS wt; Carril 2: Desnaturalización térmica; Carril 3: Precipitación de ácidos nucleicos; Carril 4: Precipitación (sobrenadante); Carril 5: Precipitación (pellet); Carril 6: aS Y39 purificada (dilución 1:10).

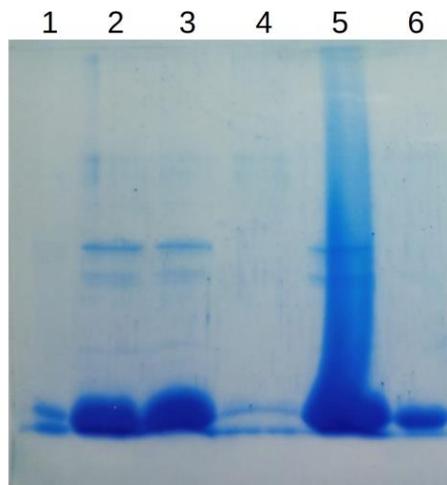


Figura 18. Purificación aS Y136. Electroforesis SDS-PAGE 12%. Tinción azul de Coomassie. Carril 1: Estándar aS wt; Carril 2: Desnaturalización térmica; Carril 3: Precipitación de ácidos nucleicos; Carril 4: Precipitación (sobrenadante); Carril 5: Precipitación (pellet); Carril 6: aS Y136 purificada (dilución 1:10)

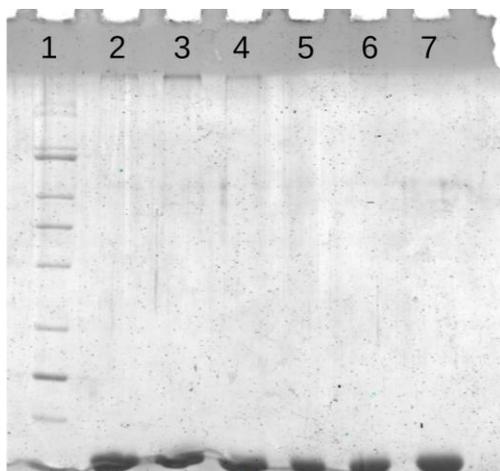


Figura 19. Electroforesis filtración de proteínas. Electroforesis SDS-PAGE 12% con tinción azul de Coomassie comparando las proteínas antes (carriles 2-4) y después (5-7) de filtrarlas por un filtro 100 kDa. aS wt (carriles 2 y 5), Y39 (carriles 3 y 6) e Y136 (carriles 4 y 7). Carril 1: marcador de peso molecular. Se aprecia la desaparición de las bandas sobre el gel separador después de la filtración.

La concentración de proteína se determinó por absorbancia a 280 nm y utilizando el método de ácido bicinonínico (BCA). En la figura 20 se presenta la curva de calibración para este último método.

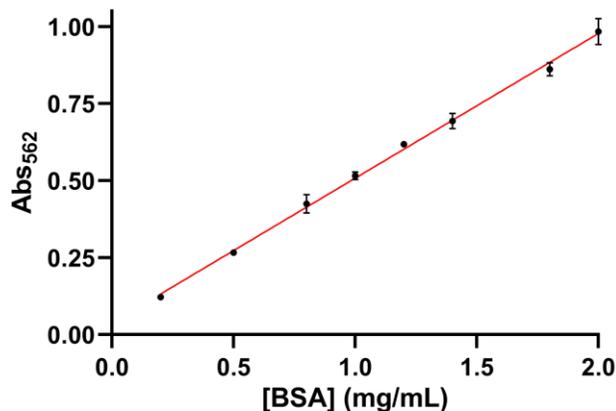


Figura 20. Cuantificación de aS por BCA. Curva de calibración con BSA y el método BCA, registrando absorbancia a 562 nm. Se realizó con 25 μ L de muestra más 200 μ L de reactivo. El blanco se construyó con 20 μ L de H₂O y 200 μ L reactivo. La recta obtenida se ajusta a la ecuación $y=4765x+0,0299$.

Las concentraciones obtenidas por BCA para las proteínas mutantes Y39 e Y136 fueron 719,8 μ M y 536,5 μ M respectivamente. Por el método de absorbancia estas fueron 703 μ M y 388,3 μ M respectivamente.

La masa molar esperada de las proteínas mutantes se calcula restando la diferencia de masa entre los aminoácidos tirosina (181,19 Da), y fenilalanina (165,19 Da). Esta diferencia es

de 16 Da, la correspondiente al grupo hidroxilo. Por lo tanto, la diferencia entre la wt y las mutantes corresponde a 48 Da, el equivalente a 3 mutaciones tirosina por fenilalanina. Los resultados de la espectrometría de masa de las proteínas (figura 21) muestran que sus pesos coinciden con los calculados (Tabla 4, anexo) siendo de 14460 Da la proteína wt, y de 14412 Da las mutantes. También se observa la presencia minoritaria de otros pesos moleculares, atribuibles a especies de aS con metionina oxidada a MetO.

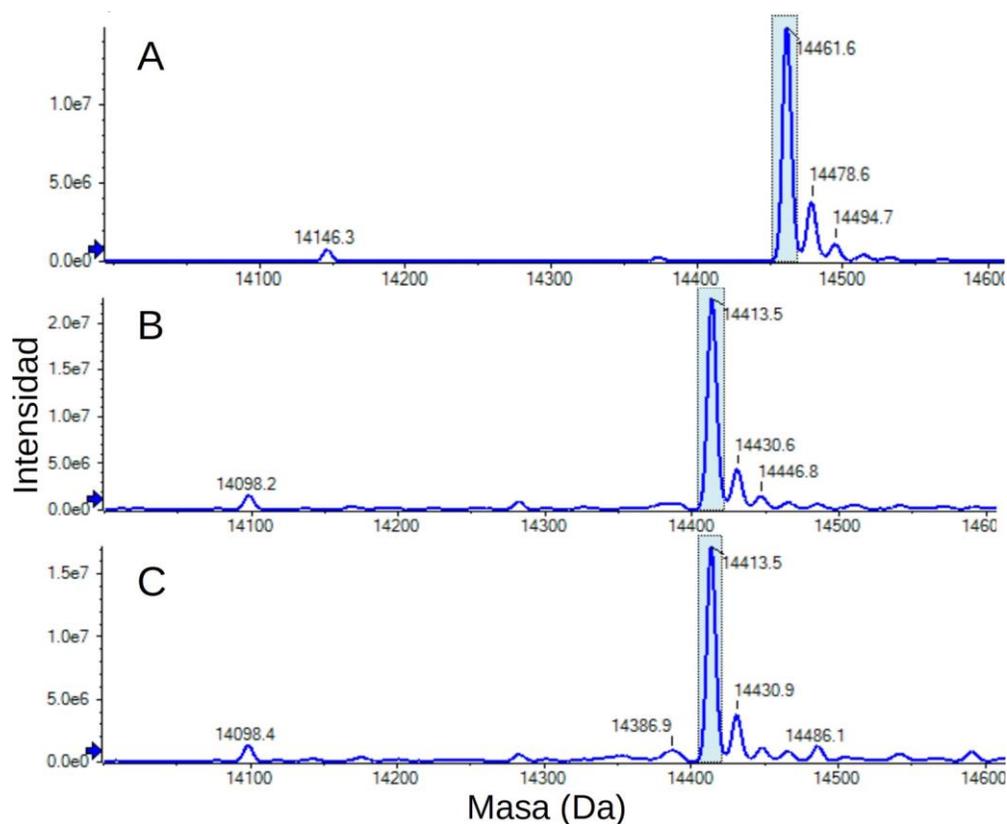


Figura 21. Espectros obtenidos por ESI-MS de las proteínas aS wt (A), y mutantes Y39 (B) e Y136 (C) purificadas. Los picos mayoritarios corresponden a aS purificada. Los picos visibles con una diferencia de +17 Da pueden atribuirse a especies de aS con MetO, producidas en la purificación.

4.3 Caracterización de la proteína a nivel estructural y funcional

4.3.1 Nitración en residuos de tirosina

El protocolo de nitración fue puesto a punto utilizando dos metodologías diferentes, así como varias concentraciones del agente nitrante ONOO^- . Como primera forma de obtener las proteínas nitradas, se administró el ONOO^- en bolo a distintas concentraciones. Los resultados de espectrometría de masas para el mutante Y39 (figura 22 izquierda) muestran la aparición de una mayor cantidad de especies al incrementar la concentración de ONOO^- . Sin embargo, al

comparar las masas obtenidas con las masas teóricas que pueden formarse (por combinación entre nitración y oxidación), se obtuvo una gran proporción de especies atribuibles a oxidación de metioninas, en combinación con especies mono y dinitradas para el mutante Y39. Por otro lado, la Y136 no sufrió modificaciones con 0,5 mM de ONOO⁻ y a concentraciones mayores se observa únicamente oxidación de metioninas (figura 22 derecha).

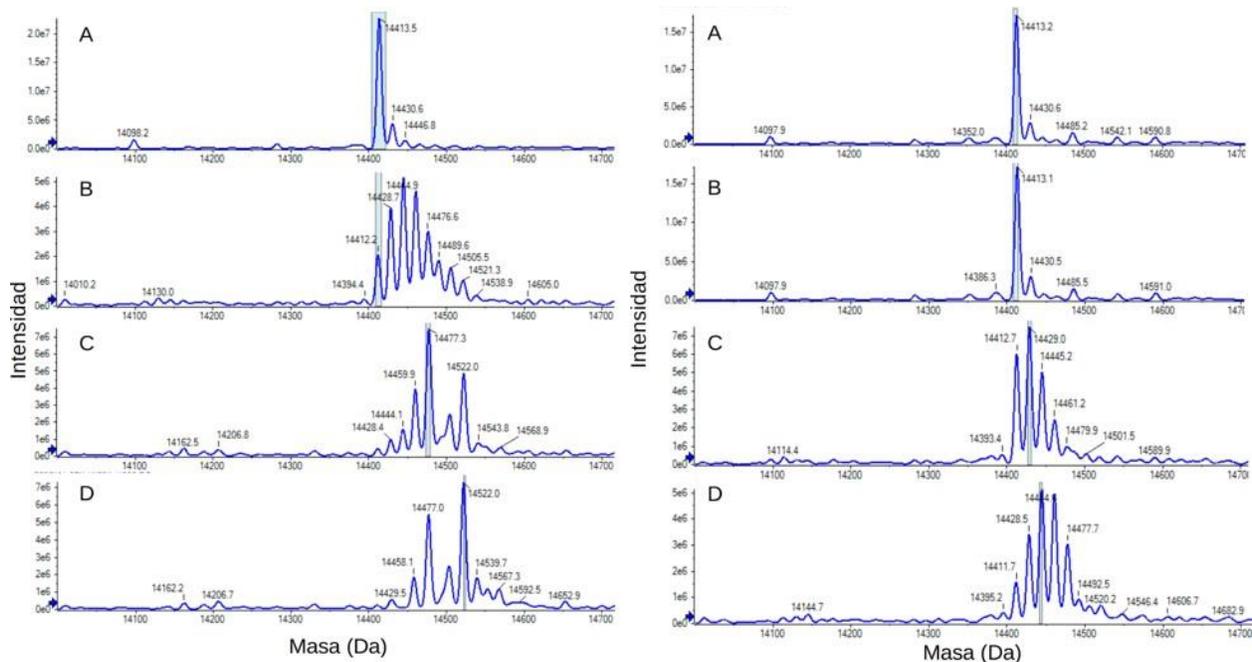


Figura 22. Nitración de mutantes utilizando diferentes concentraciones de ONOO⁻. Espectros obtenidos por ESI-MS para la nitración de aS Y39 (izquierda) e Y136 (derecha) con ONOO⁻ 0mM (A), 0,5 mM (B), 1 mM (C) o 2 mM (D).

La segunda metodología utilizada se basó en la administración de ONOO⁻ por infusión a flujo constante, extrayendo alícuotas a distintos tiempos (0, 20 y 40 minutos). Se decidió realizar el ensayo únicamente con aS wt, aS Y39, y aS Y39 con tirosina libre (300 μM) en el buffer de reacción (figura 23). Con esta última condición (aS Y39+Tirosina libre) se intentó generar la misma relación ONOO⁻/Tirosina que ocurre cuando se utiliza aS wt. Al final del ensayo, las muestras fueron analizadas por western-blot, utilizando anticuerpos anti-3-NT y anti-aS (figura 24). La nitración de aS wt mostró la presencia de 3-NT, pero no el mutante Y39, a pesar de ser reconocido por el anticuerpo anti-aS. La nitración, también favoreció la formación de especies de

alto peso molecular, generando un patrón “en escalera”, presumiblemente formados por dímeros, trímeros y tetrameros.

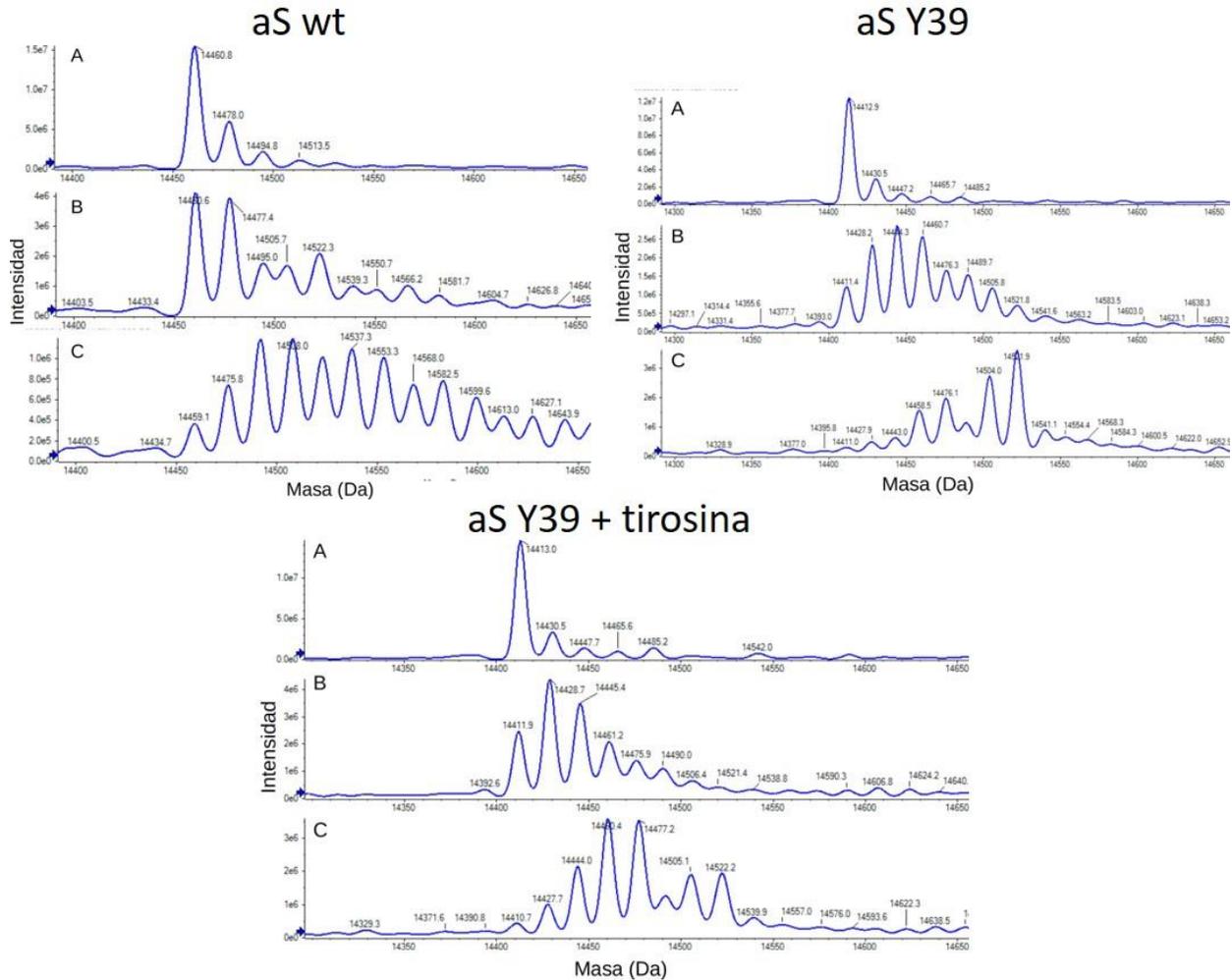


Figura 23. Nitración de proteínas por infusión. Espectros obtenidos por ESI-MS para la nitración de aS wt, Y39, e Y39+tirosina libre con ONOO⁻ por infusión. Se extrajeron muestras a 0 (A), 20 (B) y 40 (C) minutos. Las concentraciones de ONOO⁻ equivalen aproximadamente a 0mM (A), 0,5 mM (B) y 1 mM (C).

En base a los resultados obtenidos se decidió continuar realizando los ensayos utilizando la administración de ONOO⁻ en bolo. Se evaluó, además, el agregado NaNO₂ 5 mM en el buffer de nitración, con tal de generar una mayor cantidad de •NO₂ (figura 25) utilizando ONOO⁻ 1 mM. Como resultado se obtuvieron muchos productos de oxidación, aumentando la presencia de especies nitradas.

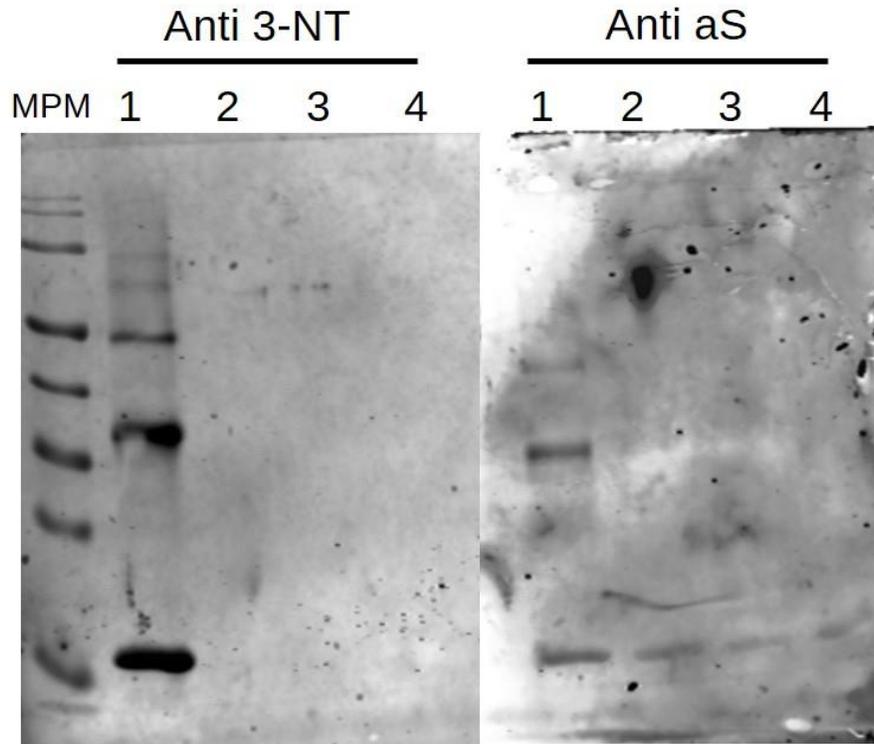


Figura 24. Western-blot de nitración por infusión. Se utilizaron anticuerpos anti-3NT (policlonal) y anti-aS (monoclonal). Carril 1: aS wt; Carril 2: aS Y39; Carril 3: aS Y39 con tirosina 300 μM en buffer; Carril 4: aS wt estándar.

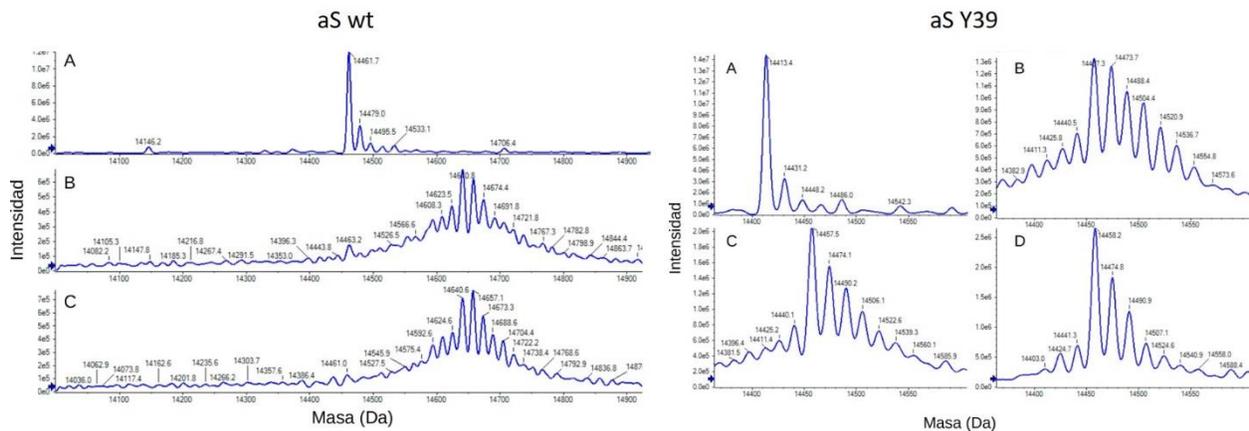


Figura 25. Nitración de aS por ONOO^- 1 mM e bolo. Espectros obtenidos por ESI-MS para la nitración de aS wt e Y39 tratadas con ONOO^- 0 mM (A) ONOO^- 1 mM (B), ONOO^- 1 mM + NO_2^- 5 mM (C) y ONOO^- 1 mM + NO_2^- 5 mM + tirosina libre 300 μM (D).

Dado que: a) utilizando 1 mM de PN se obtuvieron muchos productos de nitración y oxidación, y b) no se encontraron grandes diferencias entre incorporar o no tirosina libre en el buffer, se eligió como condición definitiva de nitración utilizar ONOO^- 0,5 mM, y NO_2^- 5 mM en el buffer (figura 26).

Para corroborar la presencia de aS nitrada se realizó un segundo western-blot con anticuerpos anti-aS y anti-3-NT (figura 27). Se observó la formación de aS monomérica nitrada y especies de alto PM con presencia de 3-NT, exceptuando en las mutantes.

Por otro lado, al realizar espectros de absorción a muestras de 100 μM de aS antes y luego de la nitración, se observó un aumento en la absorbancia a 280 nm y a 430 nm, consistente con la absorción de nitrotirosina (figura 28).

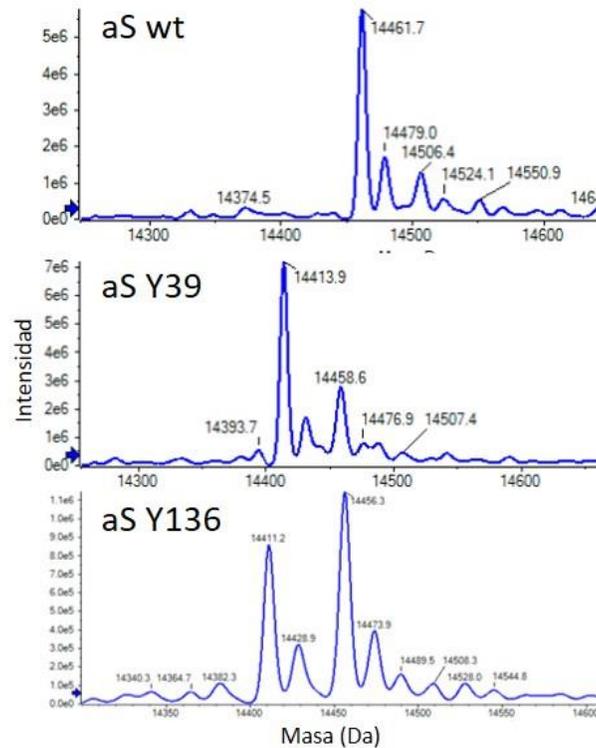


Figura 26. Nitración de proteínas wt, Y39 e Y136. Espectros obtenidos por ESI-MS para la nitración para las proteínas aS wt y mutantes, utilizando ONOO^- 0,5 mM y NO_2^- 5 mM.

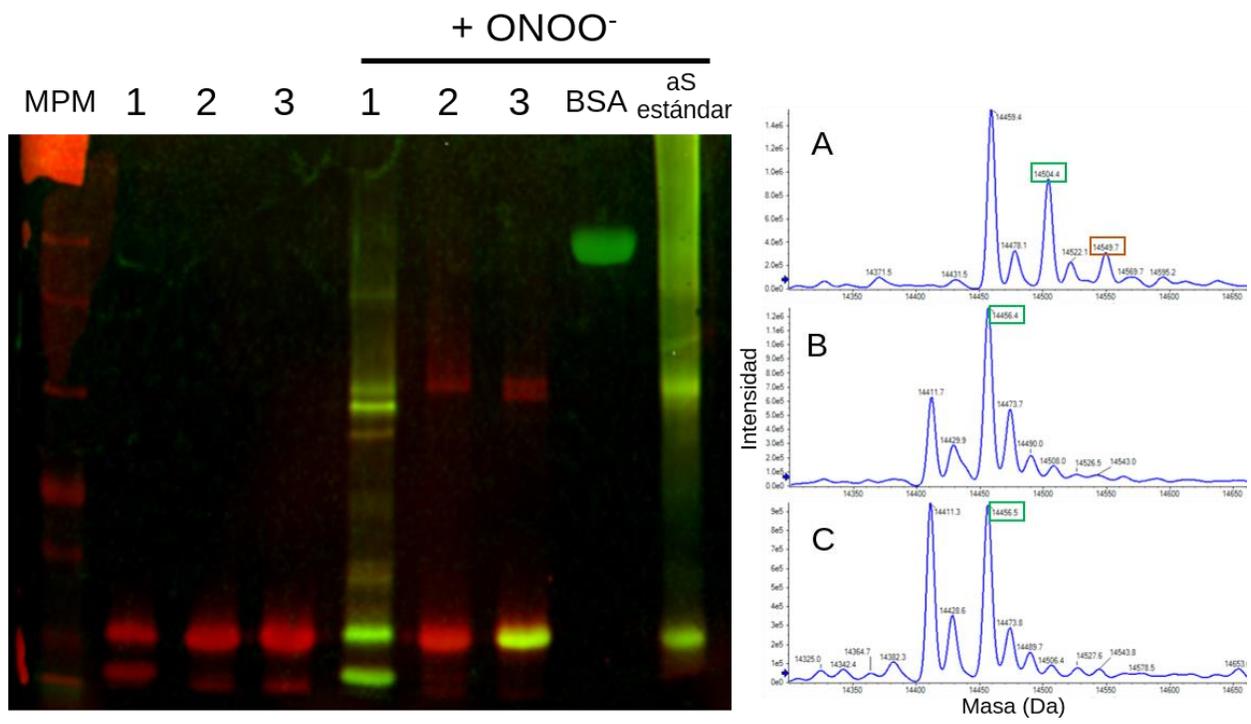


Figura 27. Resultado de nitración por western-blot. Western-blot de proteínas aS sin nitrar y nitradas, con anticuerpos anti aS (rojo) y anti 3NT (verde). Carril 1: aS wt; Carril 2: aS Y39; Carril 3: aS Y136. A la derecha, espectros de masa de las proteínas nitradas aS wt (A), Y39 (B) e Y136 (C). Recuadros verdes indican la posición de picos correspondientes a especies mononitradas, recuadros rojos a especies dinitradas. Estas muestras se emplearon para el ensayo de agregación a oligómeros.

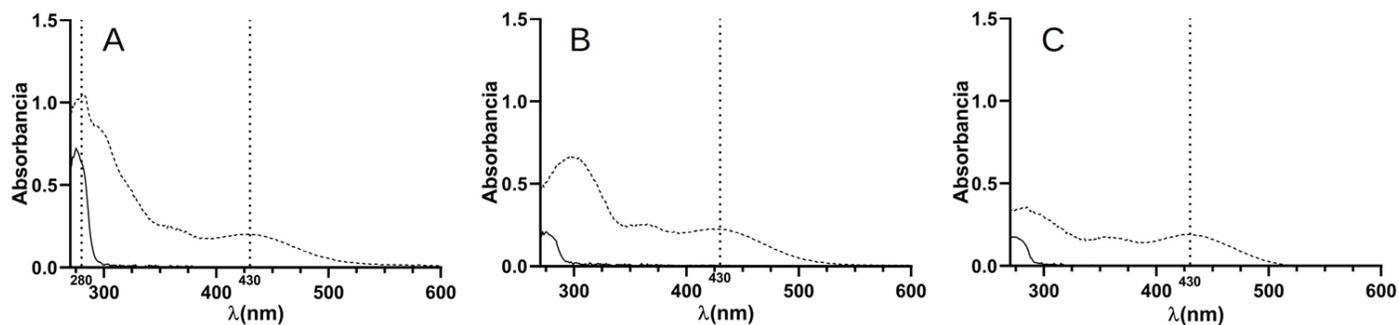


Figura 28. Espectros de absorción UV. Espectros de absorción UV-visible para las proteínas aS wt (A), Y39 (B) e Y136 (C), para las condiciones sin modificar (línea sólida) y nitradas (línea punteada). Se detalla la longitud de onda 430 nm, máximo de absorción de 3-NT a pH 7,4.

4.3.2 Dicroísmo circular de las proteínas

El dicroísmo circular en la región del UV lejano (190-260 nm) nos permite inferir acerca la estructura secundaria de las proteínas. Esto es debido a que las conformaciones regulares de los enlaces peptídicos (que permiten formar α -hélices u hojas- β) exhiben un espectro de DC característico. La figura 29A muestra los espectros para las proteínas aS wt, Y39 e Y136. La proteína wt mostró un mínimo de intensidad cercano a los 200 nm, correspondiente con una forma “random coil” y no se observaron diferencias entre ésta y las proteínas mutantes. En la misma figura se muestra el efecto de agregar SDS 2 mM. La presencia de SDS hace que el espectro cambie hacia un máximo a 190 nm, y dos mínimos a 210 y 222 nm, característico de una estructura en α -hélice. Las proteínas nitradas muestran comportamientos muy similares, en comparación a la proteína wt nitrada, y la presencia de SDS no genera grandes diferencias entre ellas (figura 29B).

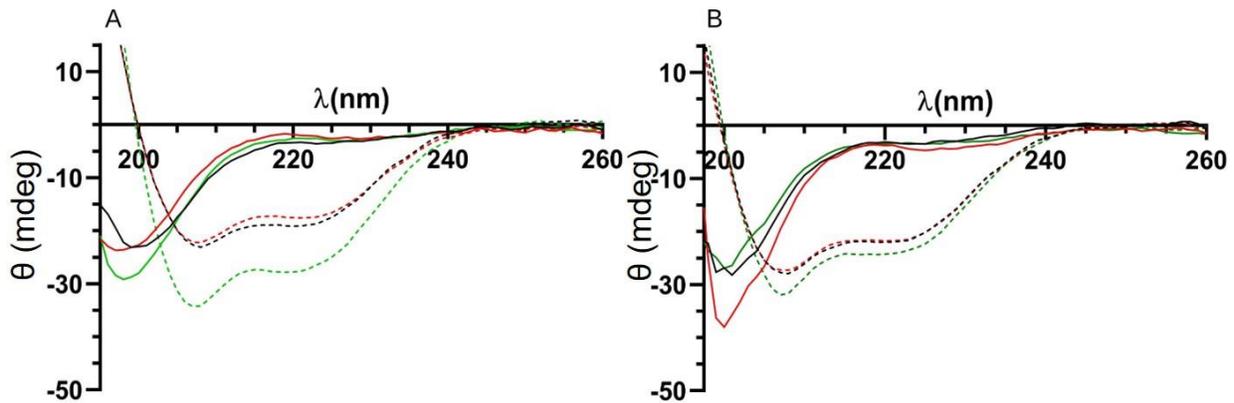


Figura 29. Comparación estructural de proteínas por dicroísmo circular. Se muestran los espectros de DC para las proteínas aS wt (línea negra), Y39 (línea roja) e Y136 (línea verde) en buffer (líneas continuas) o en presencia de SDS 2 mM (líneas punteadas). A: proteínas sin nitrar, B: proteínas tratadas nitradas.

4.3.3 Formación de fibras

Dada la capacidad que tiene la aS de formar agregados fibrilares *in vitro*, se buscó evaluar las diferencias en esta capacidad debido a la presencia de un solo residuo tirosina, así como su nitración.

La ThT es una molécula que emite fluorescencia al unirse con fibras amiloides, por lo que puede utilizarse para seguir el proceso de fibrilización de la aS, teniendo como ventaja que no fluoresce en presencia de otras especies de aS (ya sean monoméricas u oligoméricas). Además, la ThT no unida tampoco presenta fluorescencia a las longitudes de onda de trabajo.

Los resultados de la agregación a fibras de aS se representan en la figura 30. Se puede observar que el proceso de formación de fibras para la proteína wt se detuvo alrededor de las 30 horas, alcanzando un valor estable. En cambio, al nitrarse la aS, la cinética de agregación se inhibe. En cuanto a la aS Y39, su cinética tuvo un comportamiento similar a la aS wt, deteniéndose a las 30 horas, aunque llegando a un valor de intensidad menor. De la misma forma que la aS wt nitrada, no se detectaron aumentos en la fluorescencia cuando la aS Y39 se encuentra nitrada. En el caso de la proteína Y136, la cinética no parece haber alcanzado un valor máximo estable debido a la gran variación registrada, aunque la tendencia es semejante comparada con el mutante Y39.

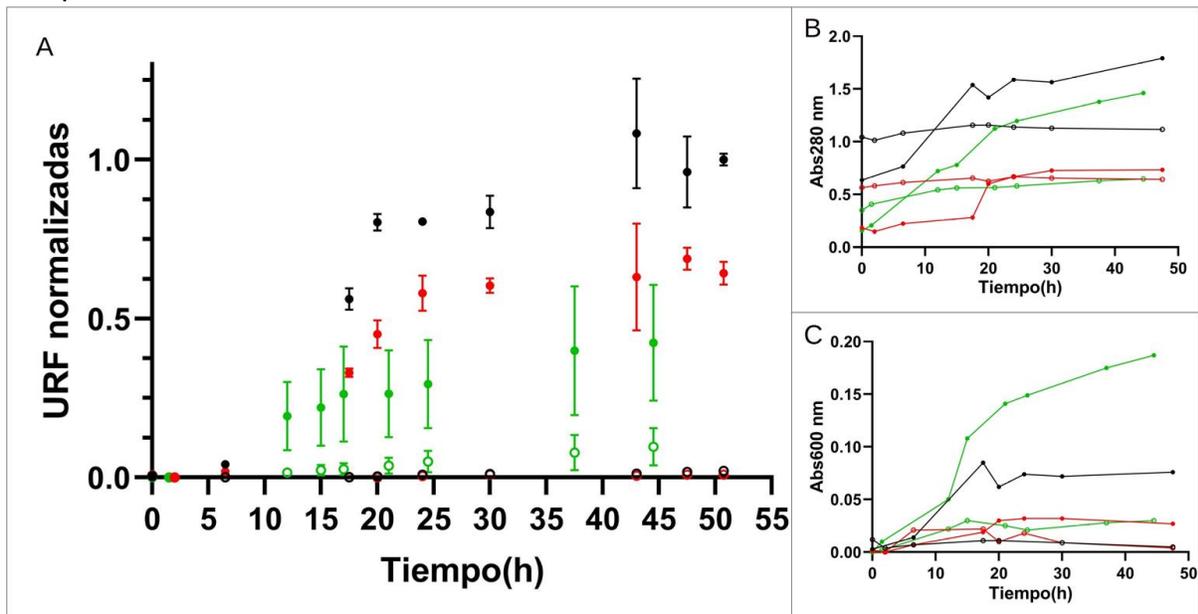


Figura 30. Ensayo de formación de fibras por ThT y absorbancia. Agregación de aS wt (negro) y mutantes Y39 (rojo) e Y136 (verde). A: ensayo por fluorescencia de ThT ($\lambda_{ex} = 450$ nm, $\lambda_{em} = 482$ nm). B: Absorbancia a 280 nm. C: Absorbancia a 600 nm. Círculos llenos: proteínas sin modificar; Círculos vacíos: proteínas nitradas. Se observan los aumentos en fluorescencia de ThT por el aumento de fibras.

Durante el proceso de agregación también pudieron registrarse cambios en la absorbancia a 280 y 600 nm (figuras 30B y 30C, respectivamente), en donde se observó un incremento de absorbancia a ambas longitudes de onda solo para las proteínas no nitradas, posiblemente debido al aumento en dispersión de luz y turbidez.

Para observar cambios en las distintas especies de aS durante la agregación, las muestras del tiempo final se analizaron mediante electroforesis en condiciones desnaturalizantes y nativas (figura 31). Con esto se pudo visualizar cambios en la cantidad de monómero presente en las condiciones sin nitrar, y una mayor cantidad de especies de distinto peso en los carriles correspondientes a las proteínas nitradas.

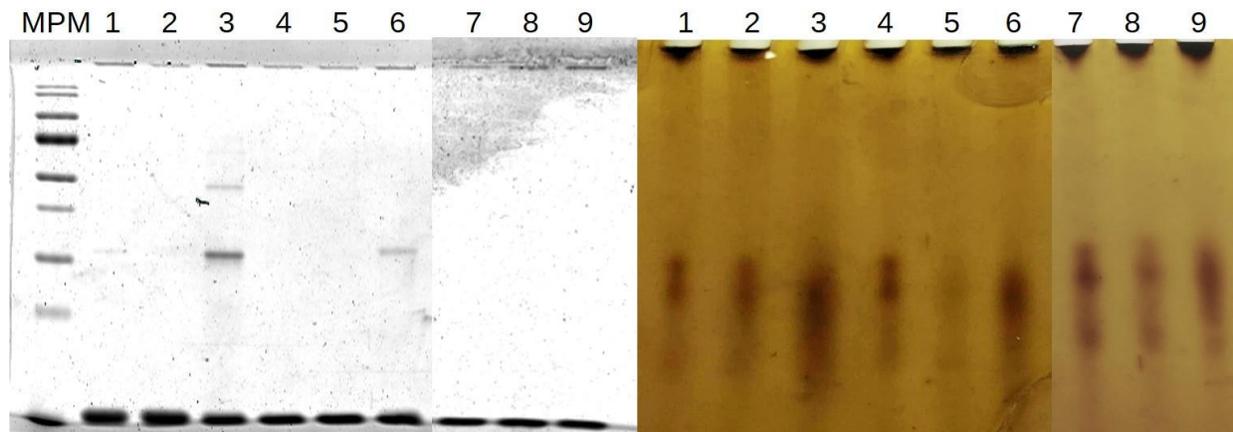


Figura 31. Electroforesis del ensayo de formación a fibras. Izquierda: electroforesis SDS-PAGE 12% teñido con Azul de coomasie. **Derecha:** electroforesis nativa, gel poliacrilamida 7,5% teñido con nitrato de plata. Se analizan las muestras del tiempo final del ensayo para agregación a fibras de aS wt (1-3), Y39 (4-6) e Y136 (7-9). Carriles 1, 4 y 7: aS stock; Carriles 2, 5 y 8: aS sin nitrar; Carriles 3, 6 y 9: aS nitrada.

La agregación también fue analizada por los cambios espectrales de DC en el UV lejano a distintos tiempos (figura 32). Se observaron cambios graduales desde un mínimo a 200 nm hacia un mínimo a 220 nm para las proteínas sin modificar, sin observarse dichos cambios en las proteínas nitradas. Este cambio es consistente con la aparición de estructuras en hoja- β .

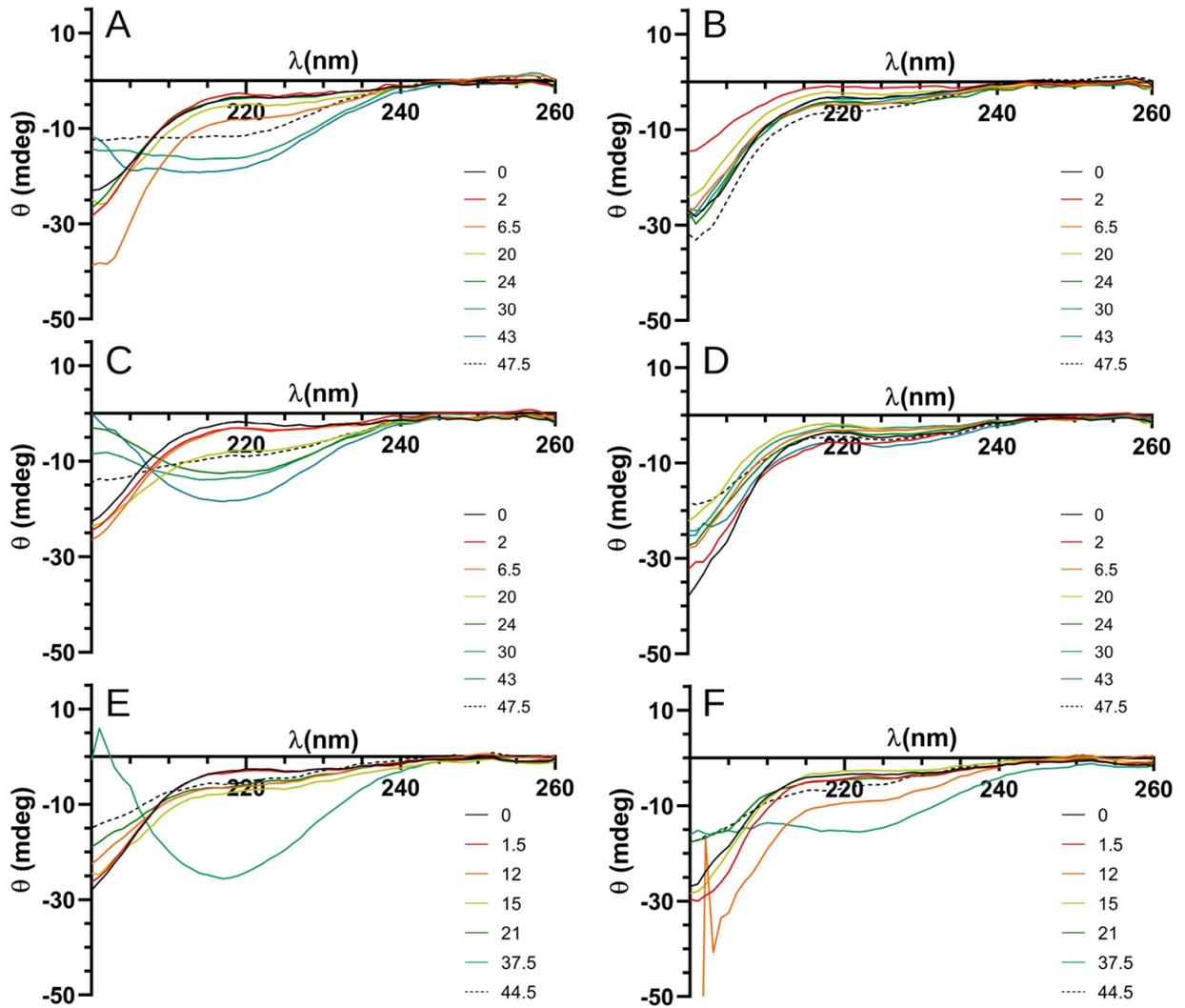


Figura 32. Ensayo agregación a fibras por DC. Espectros de DC a distintos tiempos de reacción para la formación de fibras en las proteínas α S wt (A y B), Y39 (C y D) e Y136 (E y F). A, C y E: proteínas sin nitrar; B, D y F: proteínas nitradas.

4.3.4 Formación de oligómeros

La formación de especies oligoméricas de aS se evaluó inicialmente por cromatografía HPLC de exclusión molecular (figura 33). Se observa un pico único definido que corresponde con la elución del monómero estándar (31,4 minutos). El perfil de elución para la muestra de aS wt mostró gran cantidad de monómero presente, a la vez que se observa un hombro más pequeño sobre los 20 minutos. Las proteínas mutantes presentan un comportamiento similar, eluyendo el monómero a los 30 minutos, pero no se observan indicios de especies de mayor peso molecular.

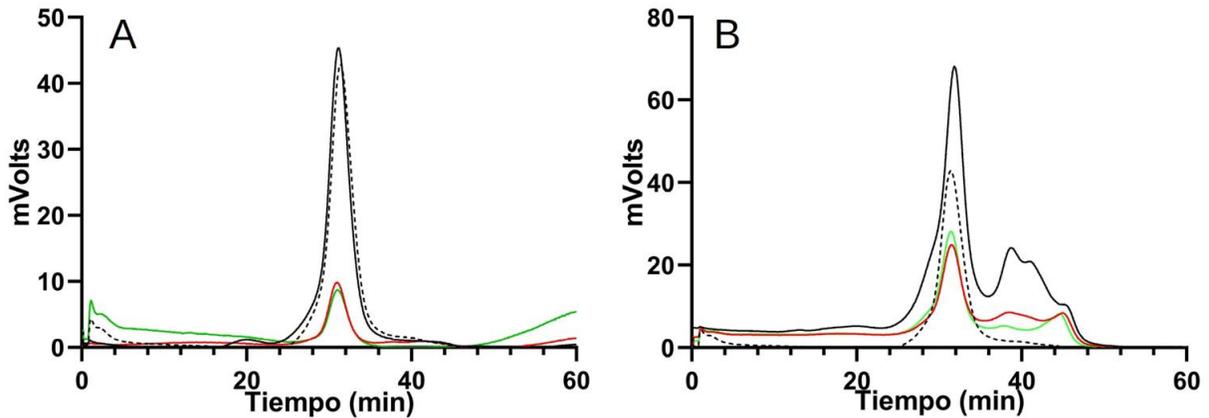


Figura 33. Cromatografía de exclusión molecular de especies oligoméricas formadas. Cromatografías HPLC de exclusión molecular con detección a 280 nm. Se analizó la formación de oligómeros para aS wt (línea negra continua), Y39 (línea roja) e Y136 (línea verde) para las condiciones sin nitrar (A) y nitradas (B). Línea negra punteada: aS wt estándar.

Para las proteínas nitradas (figura 33B), se observa el pico correspondiente al monómero eluyendo a los 30 minutos, a la vez que se observan picos que eluyen luego de los 36 minutos, correspondientes con fragmentos de menor tamaño, productos de degradación.

La purificación de los oligómeros obtenidos por filtración con un filtro 100 kDa, se evaluó por electroforesis nativa (figura 34) en la que se observó que no se logró una completa purificación, ya que se mantuvo el monómero en las fracciones purificadas. A pesar de esto, se logró un enriquecimiento de los oligómeros respecto a las demás especies. La fracción de oligómeros purificados se cuantificó utilizando el equipo Qubit obteniéndose las concentraciones especificadas en la tabla 1.

Las muestras obtenidas de oligómeros purificados se estudiaron por DLS, pudiendo evaluar su tamaño (figura 35 y tabla 5, anexo). En la figura 36 se muestran los perfiles representativos obtenidos, corregidos por el volumen de muestra. La figura 37 muestra las imágenes obtenidas a partir de los oligómeros purificados en las distintas condiciones mediante microscopía electrónica.

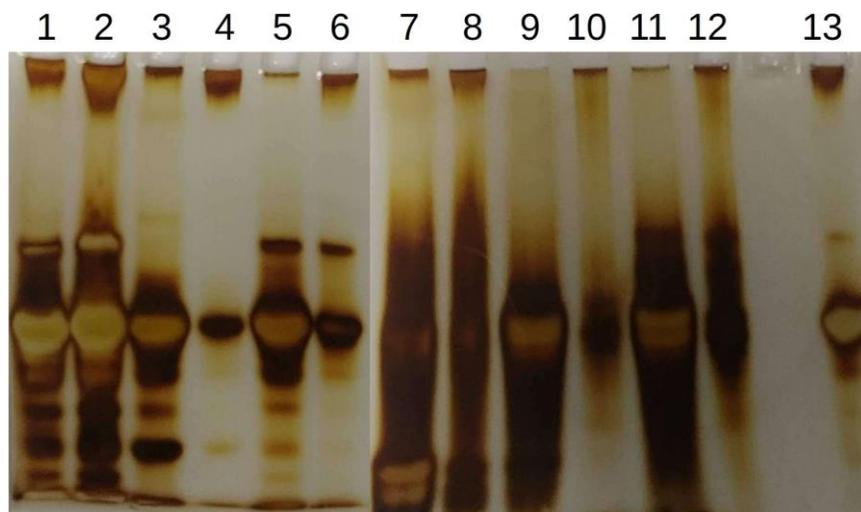


Figura 34. Purificación de oligómeros evaluada por electroforesis nativa. Electroforesis nativa para la purificación de oligómeros de aS wt (Carriles 1,2,7 y 8), Y39 (Carriles 3, 4, 9 y 10), e Y136 (Carriles 5, 6, 11 y 12), en las condiciones sin nitrar (Carriles 1-6) y nitradas (Carriles 7-12). Las muestras sin purificar se muestran en carriles impares, mientras que las fracciones purificadas en los carriles pares. Carril 13: aS estándar.

Tabla 1. Cuantificación de oligómeros por Qubit.

Muestra	Concentración ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)
wt	0.35
Y39	0.23
Y136	0.25
Wt+ ONOO ⁻	0.35
Y39 + ONOO ⁻	0.2
Y136 + ONOO ⁻	0.48

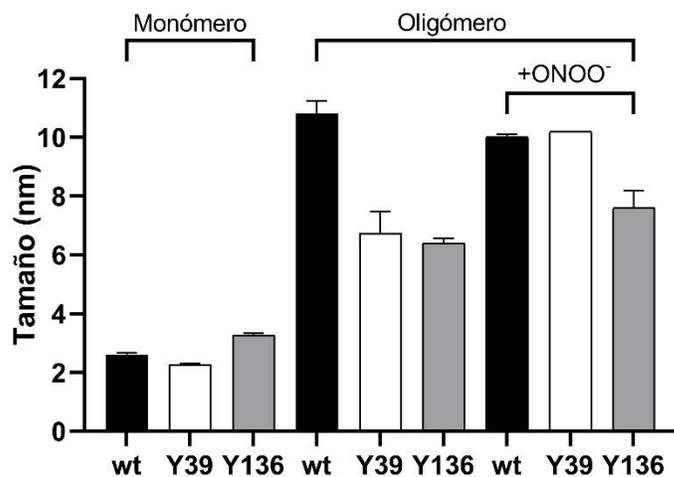


Figura 35. Tamaños de oligómeros obtenidos por DLS. Tamaños obtenidos por DLS para las distintas proteínas (monómeros y oligómeros formados). Cada medición se realizó por triplicado, a excepción del oligómero nitrado Y39 que se realizó una vez.

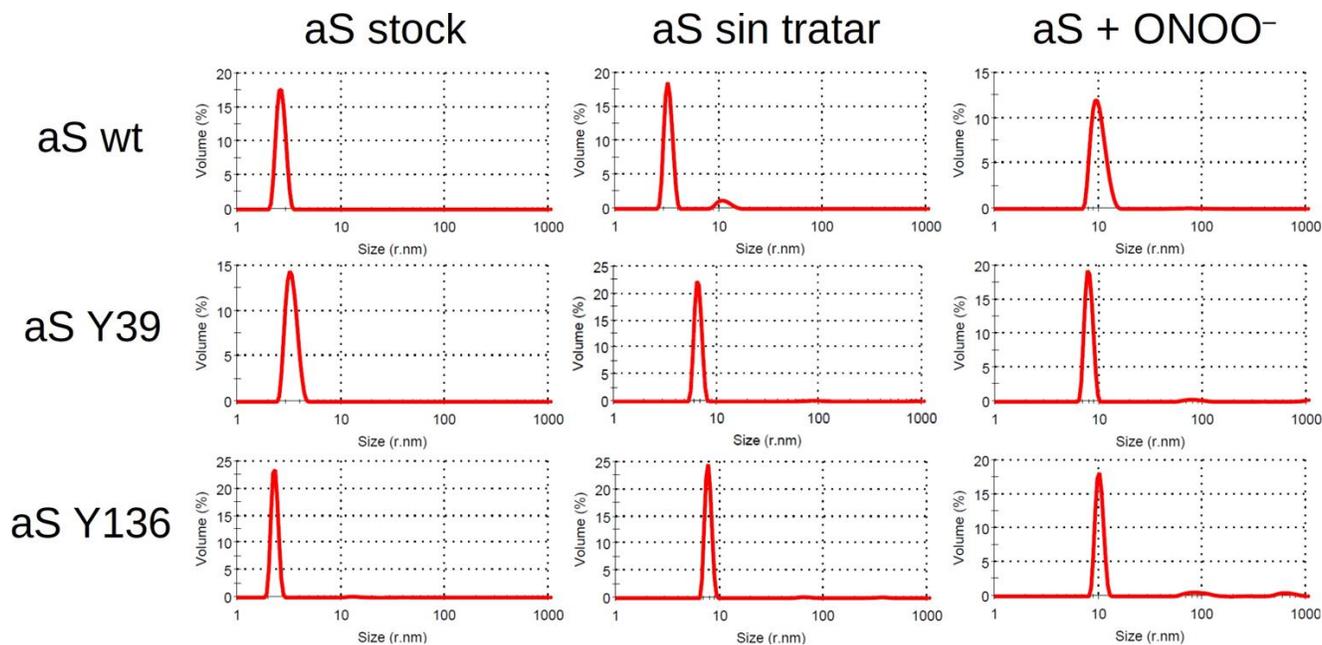


Figura 36. Resultados por DLS de oligómeros formados. Perfiles de DLS obtenidos para las proteínas aS wt, Y39 e Y136 monoméricas (stock), así como el resultado de su agregación a formas oligoméricas sin tratar y tratadas con ONOO⁻. La concentración de aS utilizada fue 300 μ M para los stocks y $13,7 \pm 5$ μ M para las muestras de oligómeros.

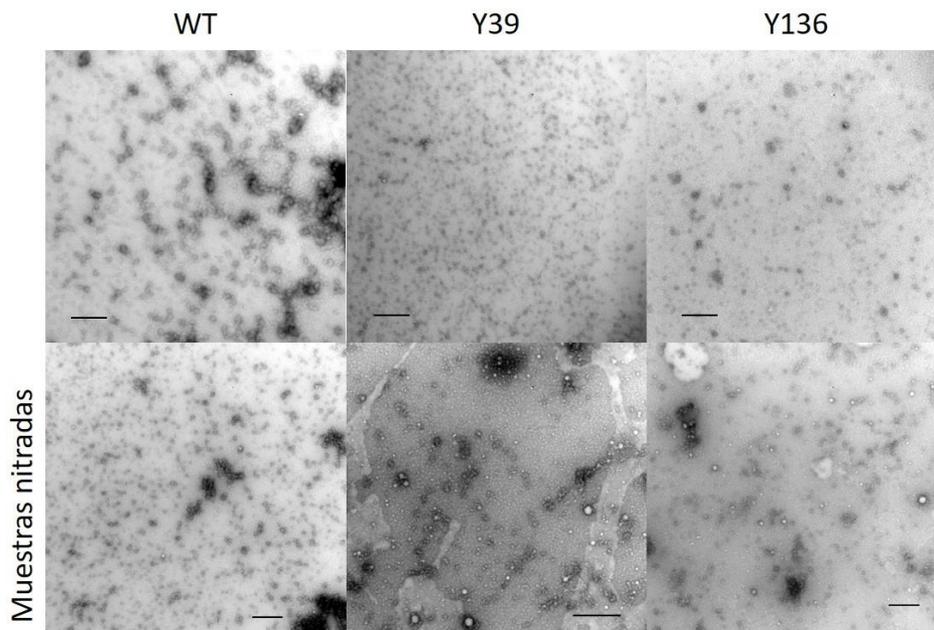


Figura 37. Oligómeros visualizados por MET. Los oligómeros formados fueron caracterizados por MET, tanto las formas sin modificar como nitrada.

5. Discusión

5.1 Obtención de formas mutantes

La estrategia de generar mutantes en residuos aminoacídicos con el fin de estudiar su rol en una proteína, es una técnica que ha sido muy utilizada en los últimos años. En este trabajo, se propuso el diseño de mutantes que presenten un único residuo de tirosina, para obtener sus derivados nitrados. De esta forma se plantea analizar el rol de la nitración en las regiones N y C-terminal de la proteína aS.

El trabajo se comenzó con el uso de cebadores diseñados previamente a partir de la secuencia wt, para generar la sustitución de tirosina por fenilalanina. Inicialmente se mutó la tirosina 125 y posteriormente la tirosina 133, generando el molde sobre el cual se continuó trabajando en dos caminos. Por un lado, se generó la mutación para la tirosina en el extremo N-terminal, y por otro, para la tirosina del extremo C-terminal.

Para la mutagénesis, se requirió de un cuidadoso diseño de cebadores, ya que sus características fisicoquímicas y estructurales influyen en el proceso de amplificación. En este sentido, la mutación a realizar debe encontrarse equidistante de los extremos del cebador, para maximizar la hibridación.

Se enfrentaron dificultades experimentales para el caso de los residuos Y133 e Y136. Dado que los codones codificantes para estos residuos se encuentran a solo 9 bases de distancia, la secuencia del cebador diseñado, necesariamente abarca al codón codificante para la tirosina vecina. Al realizar la mutagénesis en la tirosina 136, partiendo del molde doble mutante Y125F/Y133F, el resultado que se obtuvo indica que se revirtió la mutación en la posición 133, debido a la cercanía entre ambos codones. En la figura 2 del anexo se detallan los sitios de hibridación para los cebadores y la mutación que realizan. Allí se aprecia que el cebador utilizado, restituye el codón UAU (secuencia wt) codificante para Y133. Por lo tanto, cuando se diseñan cebadores para introducir mutaciones en codones cercanos, se debe considerar el orden en el que se introduce cada mutación.

Una posible solución a este problema, consiste en utilizar un cebador que realice ambas mutaciones a la vez, el cual fue diseñado previamente por el grupo de trabajo (número 5, tabla 1 anexo). Sin embargo, utilizando este abordaje no se obtuvo amplificación por PCR. Esto podría deberse a la presencia de dos sitios que no pueden establecer interacción por puentes de hidrógeno con el molde de ADN, lo que desestabilizaría la unión cebador-molde. Por otro lado, la presencia de estos sitios podría favorecer la formación de homodímeros.

La forma de conseguir el triple mutante Y125F/Y133F/136F, consistió en diseñar un nuevo cebador que mantenga el cambio de codón para Y133F y que a su vez mantenga el codón para Y136F al partir del mutante obtenido (Y125F/Y136F). Con esta estrategia se logró llegar a la secuencia deseada, el mutante Y39.

En cuanto al mutante Y136, se diseñó el par de cebadores número 1 (tabla 1, anexo) debido a que, utilizando un par diseñado previamente por el laboratorio, no se obtuvieron buenos resultados en la amplificación. El nuevo cebador diseñado consiste en un fragmento más corto, con un mayor contenido %GC, y con menor facilidad de formar estructuras secundarias.

5.2 Expresión y purificación de las proteínas

Los plásmidos extraídos con los genes de aS wt y mutantes fueron transformados en cepas *E. coli* BL21/DE3. Esta cepa contiene el gen para la ARN polimerasa del fago T7, la cual se encarga de transcribir los genes clonados en el vector pET por poseer su promotor. El gen de la ARNpol T7 está controlado por una variante del promotor *Lac*, regulado de forma constitutiva por el represor Lacl, el cual puede removerse al unirse con el inductor IPTG. Por lo tanto, al agregar IPTG, se sintetiza la polimerasa que transcribirá la proteína recombinante.

El protocolo de expresión de la aS wt, ya había sido puesto a punto por el grupo de trabajo, por lo que se esperaba obtener una buena expresión para las formas mutantes. Esto se confirmó al observar una banda correspondiente al aumento de expresión de aS luego de la inducción por IPTG. Dado que se obtuvieron buenos rendimientos de expresión, no fue necesario optimizar las condiciones de expresión para el trabajo con los mutantes.

Durante la purificación por cromatografía de intercambio iónico, el comportamiento de las proteínas mutantes fue diferente al de aS wt, eluyendo con un tiempo de retención menor. Esto podría ser debido a que la sustitución de tres aminoácidos polares por fenilalanina, un aminoácido apolar, podría interferir en la interacción con la columna. Además, a pH 7,5 existe un 0,27% de las tirosinas en su forma ionizada, y a pesar que es un porcentaje muy bajo, podría ser relevante al eliminar tres residuos de tirosina. Aun así, no es posible determinar que el cambio observado en el tiempo de retención pueda explicarse únicamente por las mutaciones generadas.

Al finalizar la purificación, obtuvimos proteínas con un criterio de pureza aceptable para seguir con los siguientes ensayos. Previo al almacenamiento y dado que los ensayos posteriores consisten en evaluar la capacidad de agregación de la aS, las proteínas tuvieron que ser filtradas. Esta filtración permitió excluir las bandas de alto peso molecular observadas por electroforesis, que podrían corresponderse con agregados de aS, incluyendo oligómeros y fibras pre-formadas.

Esto es relevante porque los oligómeros pueden acelerar el proceso de nucleación y fibrilización. En este sentido, almacenarlas a baja concentración (300 μM) y a -80°C liofilizadas, ayuda a mantener la proteína en su forma monomérica.

La cuantificación de las proteínas utilizando absorbancia a 280 nm para aS wt es un método fiable ya que conocemos su coeficiente de absorción molecular. A esa longitud de onda, la absorción se debe principalmente a los residuos de tirosina presentes. Sin embargo, las proteínas mutantes presentan una absorción mucho menor, ya que solo cuentan con un único residuo de tirosina en su secuencia. Por lo tanto, se debe utilizar un coeficiente de absorción molecular estimado, por lo que la cuantificación por este método podría generar resultados poco fiables. El ensayo de BCA es más preciso y sensible.

Por último, las masas moleculares obtenidas por espectrometría de masas coinciden con las esperadas, con una diferencia de 48 Da entre wt y mutante, correspondiente a la diferencia de peso entre ellas. Otros fragmentos que se observan en estos espectros podrían ser atribuidos a la aS con algunos residuos de metionina oxidados a metionina sulfóxido, debido a que la diferencia de masas es de 16-17 o 33 Da. Estas especies aparecen en todas las purificaciones realizadas, por lo que podrían ser producidas durante las etapas de purificación.

5.3 Nitración en residuos de tirosina

Se ha encontrado aS nitrada en neuronas de pacientes con patologías neurodegenerativas y se conoce que sus modificaciones nitro-oxidativas pueden alterar la estructura y la función de la proteína. En adición a esto, la aS es una proteína con alta capacidad de formar agregados insolubles, los cuales también tienen un rol preponderante en la patogenia de dichas enfermedades. Por este motivo es importante estudiar el efecto de la nitración de tirosinas sobre su capacidad de agregación. Con esta finalidad se utilizó ONOO^- como agente nitrante en distintas condiciones.

El ONOO^- produce la nitración de residuos de tirosina al generar la especie nitrante $\bullet\text{NO}_2$. Sin embargo, también necesita producir el radical tirosilo, el cual es mayormente producido por acción del radical $\text{CO}_3\bullet^-$. Para ello, el buffer de nitración contiene HCO_3^- , el cual está en equilibrio con CO_2 en solución, siendo este último el que reacciona con el ONOO^- .

Para evaluar la nitración se realizó espectrometría de masa y en su análisis se correlacionaron los picos obtenidos con los pesos moleculares teóricos de las posibles combinaciones de aS oxidada y/o nitrada. Esta correlación se muestra en la tabla 4 del anexo. Sin embargo, para una confirmación precisa de la presencia de dichas especies, se requeriría hidrolizar la proteína y analizar sus aminoácidos constituyentes por ESI-MS.

En cuanto a la nitración de las proteínas mutantes, la administración de ONOO^- en bolo a las concentraciones descritas (0, 0,5, 1 y 2 mM), generó especies atribuibles a aS con metioninas oxidadas y/o tirosinas nitradas. No habiéndose generado productos que contengan únicamente la adición del grupo nitro (45 Da). Solamente para la proteína aS Y39 con 2 mM ONOO^- se detectó un pequeño pico con un aumento de masa de 45 Da (14458.1 Da). Esta no es una situación ideal, ya que se busca la menor cantidad de MetO posible.

Al administrar el ONOO^- en infusión, ocurrió un incremento mayor en las especies que contienen MetO. En esta situación, el espectro de masa de la proteína wt a los 20 minutos de infusión (0,5 mM de ONOO^- aprox.), mostró especies mono y dinitradas en tirosina en una proporción baja. Sin embargo, a los 40 minutos (1 mM de ONOO^-) estas especies desaparecieron, lo que podría deberse a la formación de MetO. Por otro lado, para el mutante Y39, a los 20 minutos de infusión se observaron distintas especies de aS, algunas solamente con MetO y otras con MetO y tirosina 39 nitrada. A los 40 minutos, ocurrió un desplazamiento del espectro hacia una forma mayoritaria, que se corresponde con la aS nitrada y sus cuatro metioninas oxidadas. La adición de 300 μM de tirosina libre en el buffer de nitración no tuvo efecto significativo en la nitración de tirosina u oxidación de metionina en aS.

La administración por infusión, mantendría una concentración baja y en estado estacionario de las especies radicalares proveniente del ONOO^- , haciendo menos probable la formación de 3-NT. En cambio, administrar el ONOO^- en bolo puede producir una gran cantidad de especies oxidantes y nitrantes, por lo que se favorece la nitración.

Por otro lado, en los análisis por western-blot de las muestras, la aS wt e Y136 muestran señal para 3-NT. En el wt se observan formas nitradas monoméricas y agregados di, tri, tetra y pentaméricos, que pudieron generarse por entrecruzamientos covalentes 3,3-ditirosina. Esto es esperable, considerando que los cuatro residuos de tirosina de la aS wt pueden formar dichas uniones con otros monómeros. Además, estas especies aparecen nitradas, debido a la existencia de varias tirosinas por monómero. En cambio, para el mutante Y39 se detectó señal anti aS pero no señal de formación de 3-NT, lo cual difiere de lo observado a través del espectro de masa. Esto puede deberse a la formación de una concentración de 3-NT no detectable mediante western-blot. Aún así, se debería repetir el análisis con esta muestra utilizando un anticuerpo monoclonal anti-aS-nitrada, con tal de descartar la existencia de diferencias entre los epítopes de este mutante y el wt nitrados. El mutante Y136 si muestra señal para 3-NT. Los mutantes, además, solo generan especies diméricas, debido a que solo tienen una tirosina con la que pueden formar entrecruzamientos. Estas, en caso del Y136, no aparecen nitradas, debido a que la formación de 3,3-ditirosina tiene un efecto negativo sobre la reactividad del anillo.

En base a lo expuesto anteriormente se eligió como condición de nitración la administración de ONOO⁻ en bolo. Adicionalmente, se probó agregar una concentración elevada de NaNO₂⁻ (5 mM) en el buffer de nitración. Con esta condición, se detectó una mayor aparición de especies nitradas, aunque aún se produce gran cantidad de especies oxidadas. La incorporación de NO₂⁻ para la nitración se ha utilizado como forma de lograr que todas las especies radicalares provenientes de la homólisis del ONOO⁻ reaccionen con éste, formando el agente nitrante •NO₂ (109).

Como conclusión de estos ensayos, se realizó la nitración de 100 µM de aS mediante adición de ONOO⁻ en bolo a una concentración final de 0,5 mM, en buffer de nitración y NaNO₂ 5 mM. Utilizando estas condiciones se aumentó en gran medida la obtención de especies nitradas para todas las proteínas. Sin embargo, se mantiene la presencia de aS sin modificar. Por lo tanto, como resultado se obtuvo una mezcla que contiene aS sin modificar y aS con cantidades variables de residuos nitrados y oxidados.

En cuanto a la nitración de la proteína wt, podría esperarse que las cuatro tirosinas presentes sean igualmente susceptibles de ser nitradas, debido a la carencia de una estructura terciaria definida en solución. A pesar de que se ha reportado con distintos modelos de estrés nitro-oxidativo celular que la tirosina 39 se encuentra preferentemente nitrada (110), estos modelos son independientes de ONOO⁻. Por lo tanto, no se puede predecir cual o cuales tirosinas se modificaron en el presente trabajo. Una estrategia a emplear en próximos ensayos podría ser realizar la digestión proteolítica de los péptidos nitrados y analizarlos por espectrometría de masa. Esto contribuiría a profundizar en la caracterización del sistema estudiado.

Los espectros de absorción de las proteínas nitradas muestran la aparición de un pico con su máximo cercano a los 430 nm, lo cual es consistente con la absorción de 3-NT. La 3-NT presenta un pico de absorción a 430 nm en pH alcalino (≥ 8), cuando se encuentra en forma de 3-nitrofenolato. A su vez, a pH ácido éste pico ocurre a 360 nm. A pesar de que se conoce el coeficiente de extinción molecular para 3-NT a pH alcalino, en este trabajo las muestras se encuentran a pH 7,4, por lo que este valor no podría utilizarse para cuantificar la formación de 3-NT.

Por otro lado, con la nitración también se generó un gran aumento en la absorbancia a 280 nm, por lo que no puede llevarse a cabo la cuantificación de proteína por absorbancia directa a esa longitud de onda para las muestras nitradas.

5.4 Caracterización de las proteínas por dicroísmo circular

La caracterización estructural de las proteínas wt y mutantes se realizó registrando el espectro de dicroísmo circular en el UV-lejano. Esta región permite obtener información acerca de la composición en estructuras secundarias de una proteína. Cada estructura secundaria (α -hélice, hoja β , "random coil") presenta un espectro característico que puede identificarse y describirse de forma cuantitativa para una proteína.

La aS no tiene una estructura tridimensional definida en solución, y esto se confirmó analizando los espectros de DC. Además, no hay diferencias entre los mutantes generados y el wt, conservando la estructura desordenada.

En presencia del detergente SDS, la región N-terminal de aS es capaz de formar dos alfa-hélices separadas por un linker entre los aminoácidos 33 y 40. Esto es visible por DC frente al agregado de 2 mM de SDS, donde ocurre la transición hacia un espectro característico de α -hélice (dos mínimos a 210 y 222 nm). Este comportamiento ya había sido descrito para aS wt y se mantiene en los mutantes (13,111).

Podría esperarse que existan diferencias en la formación de alfa-hélices entre aS wt y aS Y136, ya que la mutación en la posición 39 (que se encuentra sustituida por fenilalanina) se ubica en la región linker que une las dos hélices. Sin embargo, a pesar que se observa una tendencia distinta para aS Y136, no podemos concluir que existan diferencias en la capacidad de formar α -hélice para este mutante, debido a que no se midió la concentración de proteína en el ensayo. Existen pocos trabajos en la literatura que han realizado mutagénesis sobre este residuo, pero en ellos no se evalúa la capacidad de formar α -hélices.

En este trabajo, no se encontraron diferencias en los espectros de dicroísmo circular entre las proteínas nitradas. Sin embargo, se debe tener en cuenta que el resultado de la nitración es una mezcla de distintas especies, principalmente mononitradas, dinitradas y oxidadas. Por lo tanto, se registra la contribución de todas las especies presentes a una concentración elevada de SDS (una relación 20:1).

En otros trabajos, se ha descrito que la nitración en la tirosina 39, genera una disminución en la capacidad de formar α -hélices, debido a que es esta región la que interacciona con vesículas cargadas negativamente (112). Por lo tanto, se espera que la nitración disminuya la capacidad de formación de la α -hélice debido a fuerzas electroestáticas de repulsión. Sin embargo, en este trabajo se utilizó una concentración alta de SDS, que podría enmascarar las diferencias en la capacidad de formar estructuras secundarias. Para evidenciar posibles diferencias entre los mutantes se podría realizar una titulación con SDS.

5.5 Formación de fibras

La capacidad de formar agregados fibrilares ricos en hojas- β se puede monitorear al registrar cambios en la fluorescencia de la sonda Tioflavina T. Esta sonda fluoresce cuando se une específicamente a estructuras de hojas- β . Una de las ventajas de la ThT es que su longitud de onda de excitación se encuentra lejos de la excitación de la tirosina, por lo que solo se registra fluorescencia proveniente de la sonda.

Este tipo de ensayos tienen baja reproducibilidad, debido a la gran dependencia de la formación de fibras con factores como pH, fuerza iónica, temperatura y la presencia de otras especies previamente agregadas. Es por esto que para lograr resultados confiables se debe realizar el ensayo por triplicado para cada condición. Esto también es importante al momento de analizar comparativamente resultados obtenidos en este estudio con los de otros autores.

Las proteínas sin nitrar forman fibras ricas en hoja- β , por lo que se registró un aumento en la intensidad de fluorescencia. La aS wt tuvo un comportamiento con las 3 fases descritas en la introducción. Las proteínas mutantes también mostraron capacidad de formación de fibras, aunque la fluorescencia final alcanzada fue menor. Esto podría indicar una menor capacidad en la formación de fibras, lo que sería esperable para aS Y136, debido a que las mutaciones que presenta forman parte del “core” de las fibras. Para corroborar esta hipótesis, en primer lugar, se podrían colectar las fracciones solubles a los distintos tiempos de agregación, y así confirmar que existe una correlación entre la intensidad de fluorescencia y la desaparición del monómero. Otra estrategia sería comparar las fibras formadas por microscopía electrónica de transmisión en la fase estacionaria. De no existir tal correlación, podría plantearse una afinidad diferente de la ThT por los mutantes. En segundo lugar, se podrían realizar ensayos con mayor tiempo de duración, y a distintas concentraciones de aS. Esto permitiría verificar que, al finalizar el ensayo, se llega a la fase estacionaria del proceso.

A pesar de estas cuestiones, se puede afirmar que la presencia de las tirosinas no es necesaria para la formación de especies fibrilares. Sin embargo, existen trabajos publicados que muestran que la mutación Y125A/Y133A/Y136A elimina la capacidad de agregación a fibras (113,114). De todas formas, es fundamental considerar que la naturaleza de los aminoácidos condiciona las interacciones que pueden formar. Por ejemplo, en el modelo utilizado en este trabajo se podrían mantener interacciones por apilamiento, las que no podrían mantenerse si se mutara un residuo de tirosina por alanina.

En cuanto al efecto de la nitración sobre la formación a fibras, en el presente estudio se observó un fuerte efecto inhibitorio, coincidiendo con lo descrito en la literatura (88,112,115,116).

Es importante tener en cuenta que en estos experimentos no se evaluó el efecto de quenching o apagamiento por parte de la 3-NT sobre la ThT, efecto que se ha reportado a concentraciones mayores a 140 μM de 3NT (88). Esta es una concentración superior a la esperada para los mutantes, ya que se nitraron 100 μM de aS mutante y se obtuvo una mezcla entre proteína nitrada y sin nitrar.

A partir de los ensayos de formación de fibras, podría concluirse que la nitración de los mutantes en la tirosina 39, o la 136 tiene consecuencias sobre la agregación. Sin embargo, con estos resultados no es posible determinar cuál es el mecanismo exacto. Esto se debe a que en el proceso de nitración se generan subproductos (dímeros y trímeros de aS), los cuales han mostrado ser reguladores negativos en el proceso de fibrilización, aunque también se han encontrado resultados contradictorios (117–119).

Por otro lado, se debe considerar la presencia de formas de aS con MetO, dado que se identificó como una modificación inhibidora de la formación de fibras, estabilizando la formación de oligómeros (96,120). A pesar de esto, al realizar un ensayo de formación de fibras con aS mono-oxidada con HClO por el laboratorio, se observó un incremento en la cinética de fibrilización en relación a la aS sin tratar (figura 4, anexo), por lo que se debe profundizar en este fenómeno.

En suma, el efecto total sobre la inhibición de la agregación por nitración en las tirosinas debe analizarse tomando en cuenta la presencia de las especies que alteran el proceso: dímeros formados por 3,3-ditirosina y residuos de metionina oxidada. Esto podría explicar la discrepancia con el resultado publicado por Burai en 2015, en el cual se muestra que la nitración en la tirosina 39 reduce la velocidad de formación de fibras, pero esta capacidad no se ve alterada (112).

Al analizar las muestras tomadas al tiempo final del ensayo de formación por electroforesis nativa, se observa una menor cantidad de especie monomérica en las fracciones no nitradas. Por el contrario, las proteínas nitradas tienen un notorio aumento en especies de diferentes tamaños, por lo que la nitración podría desviar el proceso de formación de fibras hacia la formación de oligómeros “off-pathway”. En la electroforesis SDS-PAGE, se observa nuevamente la aparición de dímeros y trímeros para aS wt nitrada, así como dímeros para el mutante aS Y39 nitrado.

El proceso de fibrilización también puede ser seguido mediante espectrometría DC, ya que esta se caracteriza por la transición de una estructura desordenada a una estructura rica en hojas- β . En los espectros registrados a distintos tiempos, se aprecia la desaparición del perfil típico de una proteína desordenada, transformándose en uno característico de hoja- β . No ocurre este cambio para las proteínas nitradas, ya que no ocurre la formación de fibras. El mutante

Y136, sin embargo, muestra un poco de agregación tanto en el ensayo de ThT como en el DC, lo que puede coincidir con la falta de dímeros 3,3-ditirosina inhibidores de la agregación, no visibles en la figura 31.

Se ha observado que durante el mecanismo de agregación a fibras, se genera un intermediario oligomérico con presencia de α -hélice (100). Sin embargo, esto no pudo verse mediante este ensayo, debido a que las muestras son una mezcla de la reacción, en donde se encuentran todos los intermediarios presentes.

5.6 Formación de oligómeros

El efecto inhibitor de la nitración, también podría deberse a que esta modificación estabilice la formación de especies de oligómeros “off-pathway”, incapaces de formar fibras. En este trabajo nos dedicamos a caracterizar estructuralmente oligómeros formados por aS y sus mutantes.

Para ello se realizó un protocolo de formación de oligómeros y luego se purificaron. Pese a que no se obtuvo una buena purificación (por la presencia de monómero y bajo rendimiento) y que el monómero de aS se degradó considerablemente, se realizó su caracterización estructural.

Los resultados de DLS muestran los radios hidrodinámicos para las proteínas monoméricas utilizadas como control. La aS wt mostró un radio hidrodinámico de $2,61 \pm 0,06$ nm, significativamente menor al reportado en otras investigaciones (121). En el caso de los mutantes, se encontró que el monómero del mutante Y39 es de menor tamaño que el wt, y que el mutante Y136 es ligeramente mayor a este. Esto puede deberse a distintas interacciones que pueden establecerse entre los dominios N-terminal y C-terminal (122). Las formas oligoméricas muestran una tendencia a ser menores en las proteínas mutantes. Quizás esto pueda deberse a aumento de interacciones hidrofóbicas, que podrían producir la compactación de la estructura. En cambio, al formarse oligómeros con residuos de tirosina nitrados, tanto en la tirosina 39 como en la 136, se observaron tendencias a ser oligómeros de mayor tamaño que sus respectivas formas no nitradas.

Estos resultados fueron apoyados por microscopía electrónica de transmisión, donde se observó un menor tamaño de oligómeros para las proteínas mutantes, así como un leve aumento al nitrarse.

Sin embargo, debido a la mala purificación y su baja concentración, estos resultados son preliminares, por lo que deben repetirse aumentando la concentración y pureza de las muestras.

6. Conclusión y perspectivas

Este trabajo pretendió aportar una aproximación al estudio de las propiedades biofísicas de la proteína aS. Para ello, se trabajó con mutagénesis de residuos aminoacídicos para evaluar su contribución al fenómeno de agregación. En particular, en este estudio se realizaron mutaciones en los residuos de tirosina, dado que cumplen un papel importante al ser sitios idóneos para adquirir modificaciones nitro-oxidativas, que pueden alterar diversas características de la proteína.

En esta investigación se logró obtener y expresar los mutantes Y39 (Y125F/Y133F/Y136F) e Y136 (Y39F/Y125F/Y133F) de la aS, así como su forma wild-type. Por otro lado, se logró optimizar el protocolo de nitración, permitiendo obtener las formas nitradas de la proteína, siendo necesario continuar en este camino para poder disminuir la formación de metioninas oxidadas. Así mismo, con la metodología implementada, las distintas proteínas obtenidas no presentaron diferencias estructurales, manteniendo su estructura desordenada y su capacidad de formar α -hélices en presencia de SDS. Por otro lado, se encontraron diferencias en la capacidad de formación de fibras, siendo menor para las mutantes y ausente en el caso de las nitradas. En este sentido, continúa siendo necesario realizar una purificación previa al ensayo para eliminar los subproductos de nitración (dímeros, trímeros, etc). Para caracterizar aún más las especies formadas por agregación de aS, y cómo estas se alteran por la nitración en tirosina, se podría visualizar por microscopía de transmisión las fibras formadas. De esta forma también se verificaría la inhibición de la fibrilización por la nitración.

Finalmente, en cuanto a la producción de oligómeros, no se logró una purificación aceptable, por lo que debe profundizarse en el perfeccionamiento de estas técnicas. A pesar de esto, se intentó caracterizar sus tamaños, encontrándose diferencias entre las formas mutantes y el wt.

Las diferencias encontradas entre las proteínas construidas pueden causar efectos celulares diferentes, según su capacidad de agregación o de interacción con otras proteínas. Por ello, para continuar este trabajo, se plantea caracterizar el efecto de las proteínas Y39 e Y136 en cultivos celulares de neuronas, evaluando la formación de moléculas citotóxicas, así como muerte neuronal.

7. Referencias bibliográficas

1. Burre J. The synaptic function of α -synuclein. *J Parkinsons Dis.* 2015;5(4):699–713.
2. George JM. The synucleins. *Genome Biol.* 2002;3(1):1–6.
3. Irizarry MC., Kim T., McNamara M., Tanzi R, George K., Clayton D., et al. Characterization of the Precursor Protein of the Non-A-beta Component of Senile Plaques (NACP) in the Human Central Nervous System. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1996;55(8):889–95.
4. Iwai A, Masliah E, Yoshimoto M, Ge N, Flanagan L, Rohan de Silva HA, et al. The precursor protein of non-A β component of Alzheimer's disease amyloid is a presynaptic protein of the central nervous system. *Neuron.* 1995;14(2):467–75.
5. Jakes R, Spillantini MG, Goedert M. Identification of two distinct synucleins from human brain. *FEBS Lett.* 1994;345(1):27–32.
6. Lavedan C, Leroy E, Dehejia A, Buchholtz S, Dutra A, Nussbaum RL, et al. Identification, localization and characterization of the human γ -synuclein gene. *Hum Genet.* 1998;103(1):106–12.
7. Nemani V., Lu W., Berge V., Nakamura K., Onoa B., Lee MK., et al. Increased Expression of alpha-synuclein reduces neurotransmitter release by inhibiting synaptic vesicle recluster after endocytosis. *Int Handb Psychol Educ.* 2010;65(1):277–318.
8. Scherzer CR, Grass JA, Liao Z, Pepivani I, Zheng B, Eklund AC, et al. GATA transcription factors directly regulate the Parkinson's disease-linked gene α -synuclein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(31):10907–12.
9. Fauvet B, Mbefo MK, Fares MB, Desobry C, Michael S, Ardah MT, et al. α -Synuclein in central nervous system and from erythrocytes, mammalian cells, and *Escherichia coli* exists predominantly as disordered monomer. *J Biol Chem.* 2012;287(19):15345–64.
10. Weinreb PH, Zhen W, Poon AW, Conway KA, Lansbury PT. NACP, A Protein Implicated in Alzheimer's Disease and Learning, Is Natively. October. 1996;35(43).
11. Wang W, Perovic I, Chittuluru J, Kaganovich A, Nguyen LTT, Liao J, et al. A soluble α -synuclein construct forms a dynamic tetramer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(43):17797–802.
12. Chandra S, Chen X, Rizo J, Jahn R, Südhof TC. A broken α -helix in folded α -synuclein. *J Biol Chem.* 2003;278(17):15313–8.
13. Eliezer D, Kutluay E, Bussell R, Browne G. Conformational properties of α -synuclein in its free and lipid-associated states. *J Mol Biol.* 2001;307(4):1061–73.
14. Giasson BI, Murray IVJ, Trojanowski JQ, Lee VMY. A Hydrophobic Stretch of 12 Amino Acid Residues in the Middle of α -Synuclein Is Essential for Filament Assembly. *J Biol Chem.* 2001;276(4):2380–6.
15. Hoyer W, Antony T, Cherny D, Heim G, Jovin TM, Subramaniam V. Dependence of α -synuclein aggregate morphology on solution conditions. *J Mol Biol.* 2002;322(2):383–93.
16. Trostchansky A, Lind S, Hodara R, Oe T, Blair IA, Ischiropoulos H, et al. Interaction with phospholipids modulates α -synuclein nitration and lipid-protein adduct formation. *Biochem J.* 2006;393(1):343–9.
17. Chavarría C, Souza JM. Oxidation and nitration of α -synuclein and their implications in neurodegenerative diseases. *Arch Biochem Biophys.* 2013;533(1–2):25–32.

18. George JM, Jin H, Woods WS, Clayton DF. Characterization of a novel protein regulated during the critical period for song learning in the zebra finch. *Neuron*. 1995;15(2):361–72.
19. Fortin DL, Troyer MD, Nakamura K, Kubo SI, Anthony MD, Edwards RH. Lipid rafts mediate the synaptic localization of α -synuclein. *J Neurosci*. 2004;24(30):6715–23.
20. Davidson WS, Jonas A, Clayton DF, George JM. Stabilization of α -Synuclein secondary structure upon binding to synthetic membranes. *J Biol Chem*. 1998;273(16):9443–9.
21. Abeliovich A, Schmitz Y, Fariñas I, Choi-Lundberg D, Ho WH, Castillo PE, et al. Mice lacking α -synuclein display functional deficits in the nigrostriatal dopamine system. *Neuron*. 2000;25(1):239–52.
22. Cabin DE, Shimazu K, Murphy D, Cole NB, Gottschalk W, McIlwain KL, et al. Synaptic vesicle depletion correlates with attenuated synaptic responses to prolonged repetitive stimulation in mice lacking α -synuclein. *J Neurosci*. 2002;22(20):8797–807.
23. Chadchankar H, Ihalaainen J, Tanila H, Yavich L. Decreased reuptake of dopamine in the dorsal striatum in the absence of alpha-synuclein. *Brain Res*. 2011;1382:37–44.
24. Gaugler MN, Genc O, Bobela W, Mohanna S, Ardah MT, El-Agnaf OM, et al. Nigrostriatal overabundance of α -synuclein leads to decreased vesicle density and deficits in dopamine release that correlate with reduced motor activity. *Acta Neuropathol*. 2012;123(5):653–69.
25. Larsen KE, Schmitz Y, Troyer MD, Mosharov E, Dietrich P, Quazi AZ, et al. α -Synuclein overexpression in PC12 and chromaffin cells impairs catecholamine release by interfering with a late step in exocytosis. *J Neurosci*. 2006;26(46):11915–22.
26. Kustrimovic N, Rasini E, Legnaro M, Bombelli R, Aleksic I, Blandini F, et al. Dopaminergic Receptors on CD4+ T Naive and Memory Lymphocytes Correlate with Motor Impairment in Patients with Parkinson's Disease. *Sci Rep*. 2016;6(September):1–17.
27. Bellucci A, Navarria L, Falarti E, Zaltieri M, Bono F, Collo G, et al. Redistribution of DAT/ α -synuclein complexes visualized by “in situ” proximity ligation assay in transgenic mice modelling early Parkinson's disease. *PLoS One*. 2011;6(12).
28. Burré J, Sharma M, Tsetsenis T, Buchman V, Etherton MR, Südhof TC. α -Synuclein promotes SNARE-complex assembly in vivo and in vitro. *Science* (80-). 2010;329(5999):1663–7.
29. Souza JM, Giasson BI, Lee VMY, Ischiropoulos H. Chaperone-like activity of synucleins. *FEBS Lett*. 2000;474(1):116–9.
30. Choi P, Golts N, Snyder H, Chong M, Petrucelli L, Hardy J, et al. Co-association of parkin and α -synuclein. *Neuroreport*. 2001;12(13):2839–43.
31. Shimura H, Schlossmacher MG, Hattori N, Frosch MP, Trockenbacher A, Schneider R, et al. Ubiquitination of a new form of α -synuclein by parkin from human brain: Implications for Parkinson's disease. *Science* (80-). 2001;293(5528):263–9.
32. Meulener MC, Graves CL, Sampathu DM, Armstrong-Gold CE, Bonini NM, Giasson BI. DJ-1 is present in a large molecular complex in human brain tissue and interacts with α -synuclein. *J Neurochem*. 2005;93(6):1524–32.
33. Lashuel H, Overk C, Oueslati A, Masliah E. The many faces of alpha-synuclein: from structure toxicity to therapeutic target. 2013;14(1):38–48.
34. Ueda K, Fukushima H, Masliah E, Xia YU, Iwai A, Yoshimoto M, et al. Molecular cloning of cDNA encoding an unrecognized component of amyloid in Alzheimer disease

- (neurodegeneration/chaperone/amyloid P/A4 protein/neuritic plaque). *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993;90(December):11282–6.
35. Glenner GG, Wong CW. Alzheimer's disease: Initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun*. 1984;120(3):885–90.
 36. Masters CL, Simms G, Weinman NA, Multhaup G, McDonald BL, Beyreuther K. Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985;82(12):4245–9.
 37. Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A, et al. Mutation in the α -synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science (80-)*. 1997;276(5321):2045–7.
 38. Kruger R, Kühn W, Müller T, Woitalla D, Graeber M, Kösel S, et al. Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Nat Genet*. 1998;18(3):106–8.
 39. Zarranz JJ, Alegre J, Go JC, Lezcano E, Ros R, Ampuero I, et al. The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson And Lew Body Dementia. *Ann Neurol*. 2004;55:164–73.
 40. Appel-Cresswell S, Vilarino-Guell C, Encarnacion M, Sherman H, Yu I, Shah B, et al. Alpha-synuclein p.H50Q, a novel pathogenic mutation for Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2013;28(6):811–3.
 41. Pasanen P, Myllykangas L, Siitonen M, Raunio A, Kaakkola S, Lyytinen J, et al. A novel α -synuclein mutation A53E associated with atypical multiple system atrophy and Parkinson's disease-type pathology. *Neurobiol Aging*. 2014;35(9):2180.e1-2180.e5.
 42. Kachergus J, Roumier C, Mouroux V, Douay X, Lincoln S, Levecque C. alpha-synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease. *Lancet*. 2004;364:1167–9.
 43. Singleton AB, Farrer M, Johnson J, Singleton A, Hague S, Kachergus J, et al. α -Synuclein Locus Triplication Causes Parkinson's Disease. *Science (80-)*. 2003;302(5646):841.
 44. Spillantini MG, Schmidt ML, Lee V, Trojanowski J, Goedert M. alpha-Synuclein in Lewy bodies. *Nature*. 1997;83:839–40.
 45. Gibb WRG, Scott T, Lees AJ. Neuronal inclusions of Parkinson's disease. *Mov Disord*. 1991;6(1):2–11.
 46. Goldman JE, Yen SH, Chiu FC, Peress NS. Lewy bodies of Parkinson's disease contain neurofilament antigens. *Science (80-)*. 1983;221(4615):1082–4.
 47. Kuzuhara S, Mori H, Izumiyama N, Yoshimura M, Ihara Y. Lewy bodies are ubiquitinated. *Acta Neuropathol*. 1988;75(4):345–53.
 48. Armstrong MJ, Okun MS. Diagnosis and Treatment of Parkinson Disease: A Review. *JAMA - J Am Med Assoc*. 2020;323(6):548–60.
 49. Elbaz A, Carcaillon L, Kab S, Moisan F. EPIDEMIOLOGY OF PARKINSON ' S DISEASE The Rotterdam Study. *Rev Neurol (Paris)*. 2015;1580(1):1–13.
 50. Tysnes OB, Storstein A. Epidemiology of Parkinson's disease. *J Neural Transm*. 2017;124(8):901–5.
 51. Hayes MT. Parkinson's Disease and Parkinsonism. *Am J Med*. 2019;132(7):802–7.
 52. Kalia L V., Lang AE. Parkinson's disease. *Lancet*. 2015;386(9996):896–912.

53. Braak H, Del Tredici K, Rüb U, De Vos RAI, Jansen Steur ENH, Braak E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging*. 2003;24(2):197–211.
54. Tolosa Sarró E. *Medicina Interna*. XVIII. Vol. 1, Elsevier. 2016. 1395–1402 p.
55. Sies H, Jones D. *Oxidative Stress*. Elsevier. 2007;3:102–4.
56. Klug D, Rabani J, Fridovich I. A direct demonstration of the catalytic action of superoxide dismutase through the use of pulse radiolysis. *J Biol Chem*. 1972;247(15):4839–42.
57. Marletta MA. Nitric oxide synthase: Aspects concerning structure and catalysis. *Cell*. 1994;78(6):927–30.
58. Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA. Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls: The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J Biol Chem*. 1991;266(7):4244–50.
59. Ferrer-Sueta G, Campolo N, Trujillo M, Bartesaghi S, Carballal S, Romero N, et al. Biochemistry of Peroxynitrite and Protein Tyrosine Nitration. *Chem Rev*. 2018;118(3):1338–408.
60. Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: Implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87(4):1620–4.
61. Goldstein S, Lind J, Merényi G. Chemistry of peroxynitrites as compared to peroxynitrates. *Chem Rev*. 2005;105(6):2457–70.
62. Koppenol WH, Bounds PL, Nauser T, Kissner R, Rügger H. Peroxynitrous acid: Controversy and consensus surrounding an enigmatic oxidant. *Dalt Trans*. 2012;41(45):13779–87.
63. Bartesaghi S, Valez V, Trujillo M, Peluffo G, Romero N, Zhang H, et al. Mechanistic studies of peroxynitrite-mediated tyrosine nitration in membranes using the hydrophobic probe N-t-BOC-L-tyrosine tert-butyl ester. *Biochemistry*. 2006;45(22):6813–25.
64. Oxidations P, Denicola A, Freeman BA, Trujillo M, Radi R. Peroxynitrite Reaction with Carbon Dioxide / Bicarbonate : Kinetics and Influence on. *Arch Biochem Biophys*. 1996;333(1):49–58.
65. Radi R, Peluffo G, Alvarez MN, Naviliat M, Cayota A. Unraveling peroxynitrite formation in biological systems. *Free Radic Biol Med*. 2001;30(5):463–88.
66. Cassina P., Cassina A., Pehar M., Castellanos R., Gandelman M., De León A., et al. Mitochondrial dysfunction in SOD1G93A-bearing astrocytes promotes motor neuron degeneration: Prevention by mitochondrial-targeted antioxidants. *J Neurosci*. 2008;28(16):4115–22.
67. Chinta SJ, Andersen JK. Redox Imbalance in Parkinson's Disease. *Biochim Biophys Acta*. 2008;1780(11):1362–7.
68. Floyd RA, Hensley K. Oxidative stress in brain aging: Implications for therapeutics of neurodegenerative diseases. *Neurobiol Aging*. 2002;23(5):795–807.
69. Murakami K, Shimizu T. Cytoplasmic superoxide radical: A possible contributing factor to intracellular A β oligomerization in Alzheimer disease. *Commun Integr Biol*. 2012;5(3):255–8.
70. Ramalingam M, Kim SJ. Reactive oxygen/nitrogen species and their functional correlations in neurodegenerative diseases. *J Neural Transm*. 2012;119(8):891–910.
71. Souza JM, Peluffo G, Radi R. Protein tyrosine nitration-Functional alteration or just a biomarker? *Free Radic Biol Med*. 2008;45(4):357–66.
72. Pfeiffer S, Schmidt K, Mayer B. Dityrosine formation outcompetes tyrosine nitration at low

- steady-state concentrations of peroxynitrite: Implications for tyrosine modification by nitric oxide/superoxide in vivo. *J Biol Chem.* 2000;275(9):6346–52.
73. Souza JM, Giasson BI, Chen Q, Lee VMY, Ischiropoulos H. Dityrosine cross-linking promotes formation of stable α -synuclein polymers: Implication of nitrative and oxidative stress in the pathogenesis of neurodegenerative synucleinopathies. *J Biol Chem.* 2000;275(24):18344–9.
 74. Reynolds MR, Berry RW, Binder LI. Site-specific nitration and oxidative dityrosine bridging of the τ protein by peroxynitrite: Implications for Alzheimer's disease. *Biochemistry.* 2005;44(5):1690–700.
 75. Giasson BI. Oxidative Damage Linked to Neurodegeneration. 2000;290.
 76. Souza JM, Daikhin E, Yudkoff M, Raman CS, Ischiropoulos H. Factors determining the selectivity of protein tyrosine nitration. *Arch Biochem Biophys.* 1999;371(2):169–78.
 77. Sacksteder CA, Qian WJ, Knyushko T V., Wang H, Chin MH, Lacan G, et al. Endogenously nitrated proteins in mouse brain: Links to neurodegenerative disease. *Biochemistry.* 2006;45(26):8009–22.
 78. Ng JY, Boelen L, Wong JWH. Bioinformatics analysis reveals biophysical and evolutionary insights into the 3-nitrotyrosine post-translational modification in the human proteome. *Open Biol.* 2013;3(FEB).
 79. Cheng S, Lian B, Liang J, Shi T, Xie L, Zhao YL. Site selectivity for protein tyrosine nitration: Insights from features of structure and topological network. *Mol Biosyst.* 2013;9(11):2860–8.
 80. Moreno DM, Martí MA, De Biase PM, Estrin DA, Demicheli V, Radi R, et al. Exploring the molecular basis of human manganese superoxide dismutase inactivation mediated by tyrosine 34 nitration. *Arch Biochem Biophys.* 2011;507(2):304–9.
 81. Yamakura F, Taka H, Fujimura T, Murayama K. Inactivation of human manganese-superoxide dismutase by peroxynitrite is caused by exclusive nitration of tyrosine 34 to 3-nitrotyrosine. *J Biol Chem.* 1998;273(23):14085–9.
 82. Cassina AM, Hodara R, Souza JM, Thomson L, Castro L, Ischiropoulos H, et al. Cytochrome c nitration by peroxynitrite. *J Biol Chem.* 2000;275(28):21409–15.
 83. Monteiro HP, Arai RJ, Travassos LR. Protein tyrosine phosphorylation and protein tyrosine nitration in redox signaling. *Antioxidants Redox Signal.* 2008;10(5):843–89.
 84. Radi R. Protein Tyrosine Nitration: Biochemical Mechanisms and Structural Basis of its Functional Effects. 2014;46(2):550–9.
 85. Curry-McCoy TV., Osna NA., Donohue Jr TM. Modulation of Lysozyme Function and Degradation after Nitration with Peroxynitrite. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1790(8):778–86.
 86. Wang YY, Lin SY, Chuang YH, Mao CH, Tung KC, Sheu WHH. Protein nitration is associated with increased proteolysis in skeletal muscle of bile duct ligation-induced cirrhotic rats. *Metabolism.* 2010;59(4):468–72.
 87. Lee MH, Hyun DH, Jenner P, Halliwell B. Effect of proteasome inhibition on cellular oxidative damage, antioxidant defences and nitric oxide production. *J Neurochem.* 2001;78:32–41.
 88. Hodara R, Norris EH, Giasson BI, Mishizen-Eberz AJ, Lynch DR, Lee VMY, et al. Functional consequences of α -synuclein tyrosine nitration: Diminished binding to lipid vesicles and increased fibril formation. *J Biol Chem.* 2004;279(46):47746–53.

89. Gauba V, Grunewald J, Gorney V, Deaton LM, Kang M, Bursulaya B, et al. Loss of CD4 T-cell-dependent tolerance to proteins with modified amino acids. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(31):12821–6.
90. Herzog J, Maekawa Y, Cirrito TP, Illian BS, Unanue ER. Activated antigen-presenting cells select and present chemically modified peptides recognized by unique CD4 T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(22):7928–33.
91. Reish HEA, Standaert DG. Role of α -synuclein in inducing innate and adaptive immunity in Parkinson disease. *J Parkinsons Dis*. 2015;5(1):1–19.
92. Ferreira SA, Romero-Ramos M. Microglia response during Parkinson's disease: Alpha-synuclein intervention. *Front Cell Neurosci*. 2018;12(August):1–17.
93. Kannarkat GT., Boss JM., Tansey MG. The role of innate and Adaptive Immunity in Parkinson's Disease. *J Parkinsons Dis*. 2013;3(4):493–514.
94. Irie Y, Saeki M, Kamisaki Y, Martin E, Murad F. Histone H1.2 is a substrate for denitrase, an activity that reduces nitrotyrosine immunoreactivity in proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(10):5634–9.
95. Kim HY, Gladyshev VN. Methionine sulfoxide reductases: Selenoprotein forms and roles in antioxidant protein repair in mammals. *Biochem J*. 2007;407(3):321–9.
96. Uversky VN, Yamin G, Souillac PO, Goers J, Glaser CB, Fink AL. Methionine oxidation inhibits fibrillation of human α -synuclein in vitro. *FEBS Lett*. 2002;517(1–3):239–44.
97. Choi J, Sullards MC, Olzmann JA, Rees HD, Weintraub ST, Bostwick DE, et al. Oxidative damage of DJ-1 is linked to sporadic Parkinson and Alzheimer diseases. *J Biol Chem*. 2006;281(16):10816–24.
98. Wood SJ, Wypych J, Steavenson S, Louis JC, Citron M, Biere AL. α -Synuclein fibrillogenesis is nucleation-dependent: Implications for the pathogenesis of Parkinson's disease. *J Biol Chem*. 1999;274(28):19509–12.
99. Mehra S, Sahay S, Maji SK. α -Synuclein misfolding and aggregation: Implications in Parkinson's disease pathogenesis. *Biochim Biophys Acta - Proteins Proteomics*. 2019;1867(10):890–908.
100. Ghosh D, Singh PK, Sahay S, Jha NN, Jacob RS, Sen S, et al. Structure based aggregation studies reveal the presence of helix-rich intermediate during α -Synuclein aggregation. *Sci Rep*. 2015;5:1–15.
101. Winner B, Jappelli R, Maji SK, Desplats PA, Boyer L, Aigner S, et al. In vivo demonstration that α -synuclein oligomers are toxic. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(10):4194–9.
102. Danzer KM, Haasen D, Karow AR, Moussaud S, Habeck M, Giese A, et al. Different species of α -synuclein oligomers induce calcium influx and seeding. *J Neurosci*. 2007;27(34):9220–32.
103. Kim HY, Cho MK, Kumar A, Maier E, Siebenhaar C, Becker S, et al. Structural properties of pore-forming oligomers of α -synuclein. *J Am Chem Soc*. 2009;131(47):17482–9.
104. Volpicelli-daley L a, Luk KC, Patel TP, Tanik S a, Dawn M, Stieber A, et al. Exogenous alpha-Synuclein Fibrils Induce Lewy Body Pathology Leading to Synaptic Dysfunction and Neuron Death. *Neuron*. 2011;72(1):57–71.
105. Brundin P, Melki R, Kopito R. Prion-like transmission of protein aggregates in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010;11(4):301–7.

106. Jucker M, Walker LC. Self-propagation of pathogenic protein aggregates in neurodegenerative diseases. *Nature*. 2013;501(7465):45–51.
107. Desplats P, Lee H-J, Bae E-J, Patrick C, Rockenstein E, Crews L, et al. Inclusion formation and neuronal cell death through neuron-to-neuron transmission of alpha-synuclein. *Proc Natl Acad Sci*. 2009;106(41):13010–5.
108. Lindberg DJ, Wenger A, Sundin E, Wesén E, Westerlund F, Esbjörner EK. Binding of Thioflavin-T to Amyloid Fibrils Leads to Fluorescence Self-Quenching and Fibril Compaction. *Biochemistry*. 2017;56(16):2170–4.
109. Bartesaghi S, Trujillo M, Denicola A, Folkes L, Wardman P, Radi R. Reactions of desferrioxamine with peroxynitrite-derived carbonate and nitrogen dioxide radicals. *Free Radic Biol Med*. 2004;36(4):471–83.
110. Danielson SR, Held JM, Schilling B, Oo M, Gibson BW, Andersen JK. Preferentially increased nitration of α -synuclein at tyrosine-39 in a cellular oxidative model of Parkinson's disease. *Anal Chem*. 2009;81(18):7823–8.
111. Jao CC, Hegde BG, Chenb J, Haworth IS, Langen R. Structure of membrane-bound α -synuclein from site-directed spin labeling and computational refinement. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(50):19666–71.
112. Burai R, Ait-Bouziad N, Chiki A, Lashuel HA. Elucidating the role of site-specific nitration of α -synuclein in the pathogenesis of Parkinson's disease via protein semisynthesis and mutagenesis. *J Am Chem Soc*. 2015;137(15):5041–52.
113. Pirc K, Škarabot M, Pogačnik L, Žerovnik E, Ulrih NP. The effect of tyrosine residues on α -synuclein fibrillation. *Acta Chim Slov*. 2015;62(1):181–9.
114. Ulrih NP, Barry CH, Fink AL. Impact of Tyr to Ala mutations on α -synuclein fibrillation and structural properties. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis*. 2008;1782(10):581–5.
115. Uversky VN, Yamin G, Munishkina LA, Karymov MA, Millett IS, Doniach S, et al. Effects of nitration on the structure and aggregation of α -synuclein. *Mol Brain Res*. 2005;134(1):84–102.
116. Yamin G, Uversky VN, Fink AL. Nitration inhibits fibrillation of human α -synuclein in vitro by formation of soluble oligomers. *FEBS Lett*. 2003;542(1–3):147–52.
117. Al-Hilaly YK, Biasetti L, Blakeman B, Pollack SJ, Zibae S, Abdul-Sada A, et al. The involvement of dityrosine crosslinking in α -synuclein assembly and deposition in Lewy Bodies in Parkinson's disease. *Sci Rep*. 2016;6(1):1–13.
118. Kyriukha YA, Afitska K, Kurochka AS, Sachan S, Galkin M, Yushchenko DA, et al. α -Synuclein Dimers as Potent Inhibitors of Fibrillization. *J Med Chem*. 2019;
119. Wördehoff MM, Shaykhalishahi H, Groß L, Gremer L, Stoldt M, Buell AK, et al. Opposed Effects of Dityrosine Formation in Soluble and Aggregated α -Synuclein on Fibril Growth. *J Mol Biol*. 2017;429(20):3018–30.
120. Hokenson MJ, Uversky VN, Goers J, Yamin G, Munishkina LA, Fink AL. Role of Individual Methionines in the Fibrillation of Methionine-Oxidized α -Synuclein. *Biochemistry*. 2004;43(15):4621–33.
121. Chavarría C, Rodríguez-Bottero S, Quijano C, Cassina P, Souza JM. Impact of monomeric, oligomeric and fibrillar alpha-synuclein on astrocyte reactivity and toxicity to neurons. *Biochem J*. 2018;475(19):3153–69.

122. Sevcsik E, Trexler AJ, Dunn JM, Rhoades E. Allostery in a disordered protein: Oxidative modifications to alpha-Synuclein act distally to regulate membrane binding. *J Am Chem Soc.* 2011;133(18):7152–8.

8. Anexos

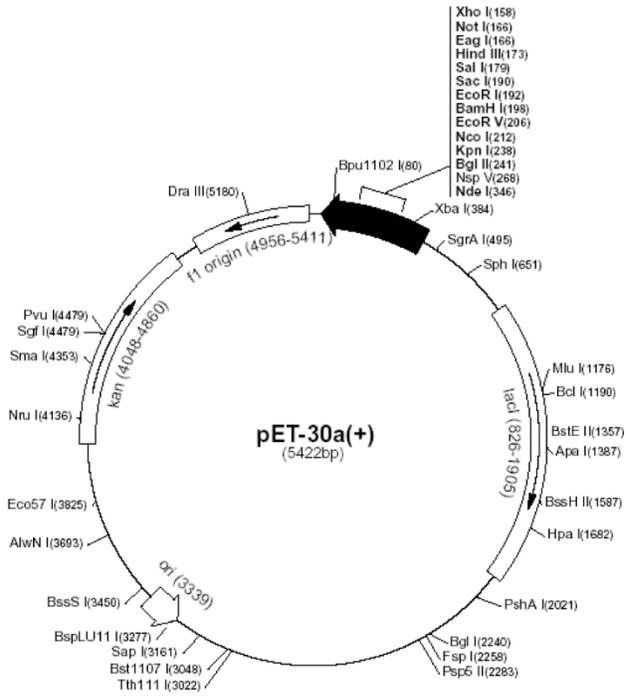


Figura 1. Mapa de restricción del vector pET-30a(+).

Tabla 1. Cebadores diseñados para mutagénesis y sus características.

	Mutación		Secuencia	Tamaño (pb)	T_m (°C)	%GC
1	Y39F	Foward	5'-GGGTGTTCTCTTTGTAGGCTCCA-3'	23	62,14	52,2
		Reverse	5'-TGGAGCCTACAAAGAGAACACCC-3'			
2	Y125F	Foward	5'- TCCTGACAATGAGGCTTTTGAAATGCCTTCTGAGG- 3'	35	69,70	45,7
		Reverse	5'- CCTCAGAAGGCATTTCAAAGCCTCATTGTCAGGA- 3'			
3	Y133F	Foward	5'-CTGAGGAAGGGTTTCAAGACTACGA-3'	25	62,01	48,0
		Reverse	5'-TCGTAGTCTTGAAACCCTTCCTCAG-3'			
4	Y136F	Foward	5'-GGTATCAAGACTTTGAACCTGAAGC-3'	25	60,11	44,0
		Reverse	5'-GCTTCAGGTTCAAAGTCTTGATACC-3'			
5	Y133F e Y136F	Foward	5'-TGAGGAAGGGTTTCAAGACTTCGAACCTGAAG-3'	32	67,81	46,9
		Reverse	5'-CTTCAGGTTCGAAGTCTTGAAACCCTTCCTCA-3'			
6	Y133F/Y136 F	Foward	5'-CTGAGGAAGGGTTTCAAGACTTCGA-3'	25	62,47	48,0
		Reverse	5'-TCGAAGTCTTGAAACCCTTCCTCAG-3'			

Tabla 2. Condiciones de PCR para mutagénesis.

Desnaturalización inicial	2 minutos	95°C	
Desnaturalización	30 segundos	95°C	
Hibridación cebadores	30 segundos	(Tm cebador – 5) °C	25 ciclos
Elongación	6 minutos	72°C	
Finalización	10 minutos	72°C	

Tabla 3. Condiciones de Colony PCR.

Desnaturalización inicial	5 minutos	94°C	
Desnaturalización	15 segundos	94°C	
Hibridación cebadores	30 segundos	53°C	30 ciclos
Elongación	60 segundos	72°C	
	5 minutos	72°C	
	10 minutos	20°C	

Soluciones:

1-TSS: Polietilenglicol 10%

Dimetilsulfóxido 5%

MgCl₂ 25mM

MgSO₄ 25 mM

Disolver en medio LB.

2-Solución de fijación:	Ácido acético	12%
	Etanol	50%
	Formaldehído (37%)	0,5 mL/L
3-Solución de lavado:	Etanol	50%
4-Solución tiosulfato:	Na ₂ S ₂ O ₃	0,2 g/L
5-Solución nitrato de Ag:	AgNO ₃	2 g/L
	Formaldehído (37%)	0,75mL/L
6-Solución revelado:	Na ₂ CO ₃	30 g/L
	Na ₂ S ₂ O ₃	20 mL/L
	Formaldehído (37%)	0,5 mL/L

Figura 2. Alineamiento de los cebadores diseñados con la secuencia de aS wt, con los codones de tirosina resultados.

	
		65	75	85	95	105	115
	aS wt	AAAACCAAAC	AGGGTGTGGC	AGAAGCAGCA	GGAAAGACAA	AAGAGGGTGT	TCTCTATGTA
1	Y39F	-----	-----	-----	-----	----GGGTGT	TCTCT TT GTA
2	Y125F	-----	-----	-----	-----	-----	-----
3	Y133F	-----	-----	-----	-----	-----	-----
4	Y136F	-----	-----	-----	-----	-----	-----
5	Y133 e Y13	-----	-----	-----	-----	-----	-----
6	Y133F/Y136	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	
		125	135	145	155	165	175
	aS wt	GGCTCCAAAA	CCAAGGAGGG	AGTGGTGCAT	GGTGTGGCAA	CAGTGGCTGA	GAAGACCAAA
1	Y39F	GGCTCCA...
2	Y125F	-----	-----	-----	-----	-----	-----
3	Y133F	-----	-----	-----	-----	-----	-----
4	Y136F	-----	-----	-----	-----	-----	-----
5	Y133 e Y13	-----	-----	-----	-----	-----	-----
6	Y133F/Y136	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	
		365	375	385	395	405	415
	aS wt	GACAATGAGG	CTT AT GAAAT	GCCTTCTGAG	GAAGGG TATC	AAGACT TACGA	ACCTGAAGCC
1	Y39F
2	Y125F	GACAATGAGG	CTTTT GAAAT	GCCTTCTGAG	G.....
3	Y133F	-----	-----	----CTGAG	GAAGGG TTTC	AAGACT TACGA
4	Y136F	-----	-----	-----	---GGTATC	AAGACT TTTGA	ACCTGAAGC.
5	Y133 e Y13	-----	-----	----TGAG	GAAGGG TTTC	AAGACT TTT CGA	ACCTGAAG..
6	Y133F/Y136	-----	-----	----CTGAG	GAAGGG TTTC	AAGACT TTT CGA

Figura 3. Secuencias obtenidas por mutagénesis de aS.

	
		5	15	25	35	45	55
1	aS wt	ATGGATGTAT	TCATGAAAGG	ACTTTCAAAG	GCCAAGGAGG	GAGTTGTGGC	TGCTGCTGAG
2	Y125F/Y133F	ATGGATGTAT	TCATGAAAGG	ACTTTCAAAG	GCCAAGGAGG	GAGTTGTGGC	TGCTGCTGAG
3	Y125F/Y136F	ATGGATGTAT	TCATGAAAGG	ACTTTCAAAG	GCCAAGGAGG	GAGTTGTGGC	TGCTGCTGAG
4	Y125F/Y133F/Y136F	ATGGATGTAT	TCATGAAAGG	ACTTTCAAAG	GCCAAGGAGG	GAGTTGTGGC	TGCTGCTGAG
5	Y39F/Y125F/Y133F	ATGGATGTAT	TCATGAAAGG	ACTTTCAAAG	GCCAAGGAGG	GAGTTGTGGC	TGCTGCTGAG
	
		65	75	85	95	105	115
1	aS wt	AAAACCAAAC	AGGGTGTGGC	AGAAGCAGCA	GGAAAGACAA	AAGAGGGTGT	TCTCTATGTA
2	Y125F/Y133F	AAAACCAAAC	AGGGTGTGGC	AGAAGCAGCA	GGAAAGACAA	AAGAGGGTGT	TCTCTATGTA
3	Y125F/Y136F	AAAACCAAAC	AGGGTGTGGC	AGAAGCAGCA	GGAAAGACAA	AAGAGGGTGT	TCTCTATGTA
4	Y125F/Y133F/Y136F	AAAACCAAAC	AGGGTGTGGC	AGAAGCAGCA	GGAAAGACAA	AAGAGGGTGT	TCTCTATGTA
5	Y39F/Y125F/Y133F	AAAACCAAAC	AGGGTGTGGC	AGAAGCAGCA	GGAAAGACAA	AAGAGGGTGT	TCTCT TT GTA
	
		125	135	145	155	165	175
1	aS wt	GGCTCCAAAA	CCAAGGAGGG	AGTGGTGCAT	GGTGTGGCAA	CAGTGGCTGA	GAAGACCAAA
2	Y125F/Y133F	GGCTCCAAAA	CCAAGGAGGG	AGTGGTGCAT	GGTGTGGCAA	CAGTGGCTGA	GAAGACCAAA
3	Y125F/Y136F	GGCTCCAAAA	CCAAGGAGGG	AGTGGTGCAT	GGTGTGGCAA	CAGTGGCTGA	GAAGACCAAA
4	Y125F/Y133F/Y136F	GGCTCCAAAA	CCAAGGAGGG	AGTGGTGCAT	GGTGTGGCAA	CAGTGGCTGA	GAAGACCAAA
5	Y39F/Y125F/Y133F	GGCTCCAAAA	CCAAGGAGGG	AGTGGTGCAT	GGTGTGGCAA	CAGTGGCTGA	GAAGACCAAA
	
		185	195	205	215	225	235
1	aS wt	GAGCAAGTGA	CAATGTTGG	AGGAGCAGTG	GTGACGGGTG	TGACAGCAGT	AGCCCAGAAG
2	Y125F/Y133F	GAGCAAGTGA	CAATGTTGG	AGGAGCAGTG	GTGACGGGTG	TGACAGCAGT	AGCCCAGAAG
3	Y125F/Y136F	GAGCAAGTGA	CAATGTTGG	AGGAGCAGTG	GTGACGGGTG	TGACAGCAGT	AGCCCAGAAG
4	Y125F/Y133F/Y136F	GAGCAAGTGA	CAATGTTGG	AGGAGCAGTG	GTGACGGGTG	TGACAGCAGT	AGCCCAGAAG
5	Y39F/Y125F/Y133F	GAGCAAGTGA	CAATGTTGG	AGGAGCAGTG	GTGACGGGTG	TGACAGCAGT	AGCCCAGAAG
	
		245	255	265	275	285	295
1	aS wt	ACAGTGGAGG	GAGCAGGGAG	CATTGCAGCA	GCCACTGGCT	TTGTCAAAAA	GGACCAGTTG
2	Y125F/Y133F	ACAGTGGAGG	GAGCAGGGAG	CATTGCAGCA	GCCACTGGCT	TTGTCAAAAA	GGACCAGTTG
3	Y125F/Y136F	ACAGTGGAGG	GAGCAGGGAG	CATTGCAGCA	GCCACTGGCT	TTGTCAAAAA	GGACCAGTTG
4	Y125F/Y133F/Y136F	ACAGTGGAGG	GAGCAGGGAG	CATTGCAGCA	GCCACTGGCT	TTGTCAAAAA	GGACCAGTTG
5	Y39F/Y125F/Y133F	ACAGTGGAGG	GAGCAGGGAG	CATTGCAGCA	GCCACTGGCT	TTGTCAAAAA	GGACCAGTTG
	
		305	315	325	335	345	355
1	aS wt	GGCAAGAATG	AAGAAGGAGC	CCCACAGGAA	GGAATTCTGG	AAGATATGCC	TGTGGATCCT
2	Y125F/Y133F	GGCAAGAATG	AAGAAGGAGC	CCCACAGGAA	GGAATTCTGG	AAGATATGCC	TGTGGATCCT
3	Y125F/Y136F	GGCAAGAATG	AAGAAGGAGC	CCCACAGGAA	GGAATTCTGG	AAGATATGCC	TGTGGATCCT
4	Y125F/Y133F/Y136F	GGCAAGAATG	AAGAAGGAGC	CCCACAGGAA	GGAATTCTGG	AAGATATGCC	TGTGGATCCT
5	Y39F/Y125F/Y133F	GGCAAGAATG	AAGAAGGAGC	CCCACAGGAA	GGAATTCTGG	AAGATATGCC	TGTGGATCCT
	
		365	375	385	395	405	415
1	aS wt	GACAATGAGG	CTTATGAAAT	GCCTTCTGAG	GAAGGGTATC	AAGACTACGA	ACCTGAAGCC
2	Y125F/Y133F	GACAATGAGG	CT TTT GAAAT	GCCTTCTGAG	GAAGGG TTT C	AAGACTACGA	ACCTGAAGCC
3	Y125F/Y136F	GACAATGAGG	CT TTT GAAAT	GCCTTCTGAG	GAAGGGTATC	AAGACT TTT G	ACCTGAAGCC
4	Y125F/Y133F/Y136F	GACAATGAGG	CT TTT GAAAT	GCCTTCTGAG	GAAGGG TTT C	AAGACT TTT G	ACCTGAAGCC
5	Y39F/Y125F/Y133F	GACAATGAGG	CT TTT GAAAT	GCCTTCTGAG	GAAGGG TTT C	AAGACTACGA	ACCTGAAGCC
	
		425					
1	aS wt	TAA.....					
2	Y125F/Y133F	TAA.....					
3	Y125F/Y136F	TAA.....					
4	Y125F/Y133F/Y136F	TAA.....					
5	Y39F/Y125F/Y133F	TAA.....					

Tabla 4. Pesos esperados por las modificaciones oxidativas y sus combinaciones. 3NT: 3-nitrotirosina; MetO; Metionina sulfóxido.

Cantidad de residuos modificados		aS wt (Da)	aS mutantes (Da)
3NT	MetO		
0	0	14460	14412
1	0	14505	14457
2	0	14550	-
3	0	14595	-
4	0	14640	-
0	1	14476	14428
1	1	14521	14473
2	1	14566	-
3	1	14611	-
4	1	14656	-
0	2	14492	14444
1	2	14537	14489
2	2	14582	-
3	2	14627	-
4	2	14672	-
0	3	14508	14460
1	3	14553	14505
2	3	14598	-
3	3	14643	-
4	3	14688	-
0	4	14524	14476
1	4	14569	14521
2	4	14614	-
3	4	14659	-
4	4	14704	-

Tabla 5. Tamaños de los monómeros y oligómeros obtenidos por dispersión dinámica de luz (DLS).

Especie	Distribución de volumen (nm)	Promedio (nm)
Monómero wt (300 μ M)	2,7	2,61 \pm 0,06
	2,55	
	2,58	
Monómero wt (30 μ M)	2,85	2,9 \pm 0,22
	2,66	
	3,2	
Monómero Y136 (300 μ M)	3,23	3,27 \pm 0,06
	3,35	
	3,22	
Monómero Y39 (300 μ M)	2,32	2,26 \pm 0,05 12,26 \pm 0,76
	13	
	2,26	
	12,48	
	2,19	
Oligómero wt (16 μ M)	11,2	3,25 \pm 0,04 10,8 \pm 0,44
	3,28	
	11,27	
	8,19	
	3,21	
Oligómero Y136 (10 μ M)	10,4	6,4 \pm 0,17
	6,26	
	6,63	
Oligómero Y39 (10,4 μ M)	6,3	6,73 \pm 0,74
	7,77	
	6,25	
Oligómero nitrado wt (16 μ M)	6,16	10,01 \pm 0,09
	5,3	
	9,9	
	10,1	
Oligómero nitrado Y136 (22 μ M)	10,1	7,6 \pm 0,6
	8,0	
	6,7	
Oligómero nitrado Y39 (8 μ M)	8,1	10,2
	10,2	

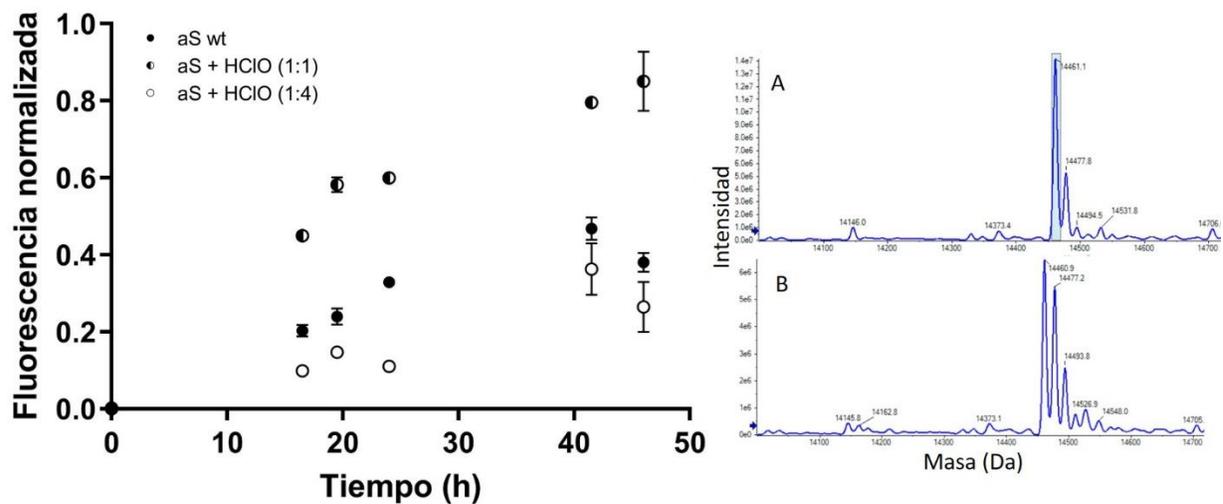


Figura 4. Agregación de aS wt con metionina oxidada. aS wt (10 μ M) fue tratada con HClO 2,5 μ M (1:4)(A) o 10 μ M (1:1) (B) y se ensayó su capacidad de agregación con ThT.