

Rol de las modificaciones oxidativas en la proteína alfa-sinucleína

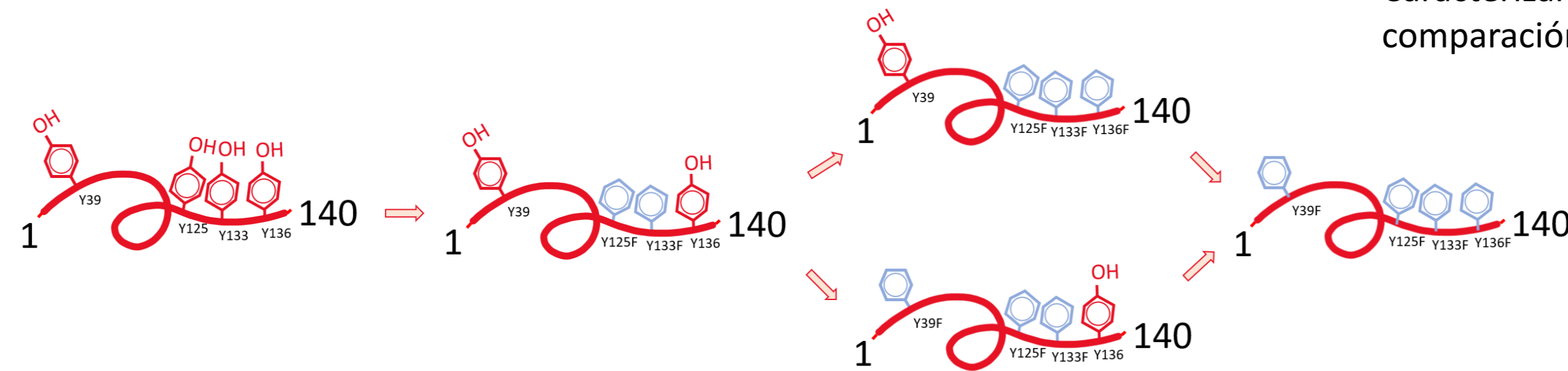
Ivagnes R.¹; Chavarría C.¹; Piñeyro DM.^{1,2}; Zeida A.¹; Mastrogiovanni M.¹; Ríos N.¹; Souza JM.¹

¹ Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina y CEINBIO, Udelar

² Laboratorio de interacciones hospedero-patógeno, Unidad de Biología Molecular, Institut Pasteur de Montevideo.

INTRODUCCIÓN

Las sinucleinopatías son un grupo de trastornos caracterizados por la presencia de agregados fibrilares de la proteína alfa-sinucleína (aS), una proteína que pertenece al grupo de proteínas intrínsecamente desordenadas. En condiciones patológicas, en presencia de peroxinitrito (ONOO⁻), sufre modificaciones oxidativas, tales como la nitración de tirosinas y oxidación de metioninas. Estas modificaciones alteran la capacidad de la aS de formar estos agregados y se han encontrado en tejidos *post-mortem* de pacientes con enfermedad de Parkinson.



OBJETIVOS

- Generar y purificar mutantes de aS 1) con un residuo de tirosina en extremo N-terminal; 2) con un residuo de tirosina en extremo C-terminal; 3) sin residuos de tirosina.
- Obtener las proteínas nitradas utilizando peroxinitrito (PN) y 1,5-metil-1,4-dinitroimidazol (DNI)
- Caracterizar agregados de fibras y oligómeros formados de las proteínas purificadas en comparación con forma *wild-type*.

Figura 1. Diseño de mutantes de aS. Metodología diseñada para obtener mutantes de aS que sustituyen tirosina por fenilalanina. Se obtuvieron dos mutantes con un único residuo de tirosina: uno en el extremo N-terminal (Y125/133/136F), y otro en el extremo C-terminal (Y39/125/133F). Además, un mutante con los 4 residuos tirosina sustituidos por fenilalanina (Y39/125/133/136F).

RESULTADOS

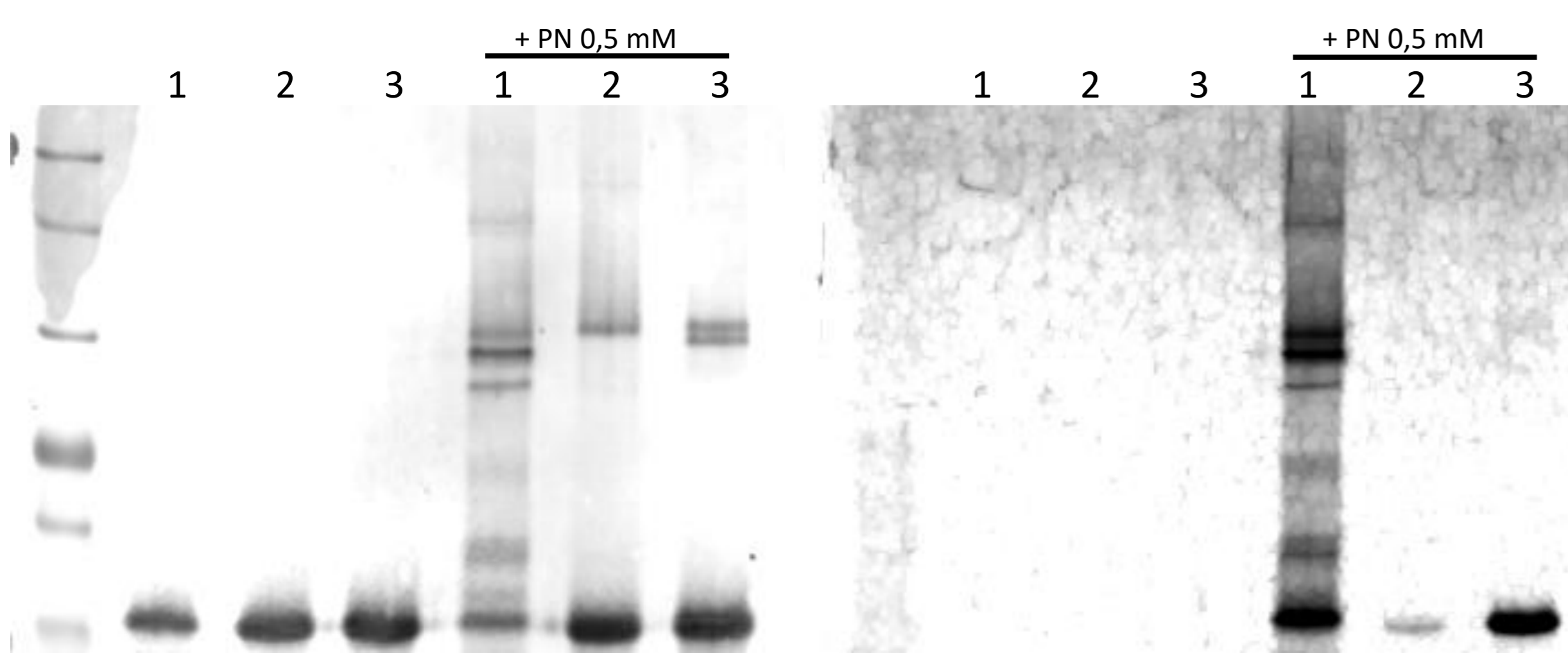


Figura 2. Nitración de aS por reacción con PN. Westernblot con anticuerpos anti-aS (izquierda) y anti-3-nitrotirosina (derecha). 1: aS *wild-type*; 2: aS Y125/133/136F; 3: aS Y39/125/133F

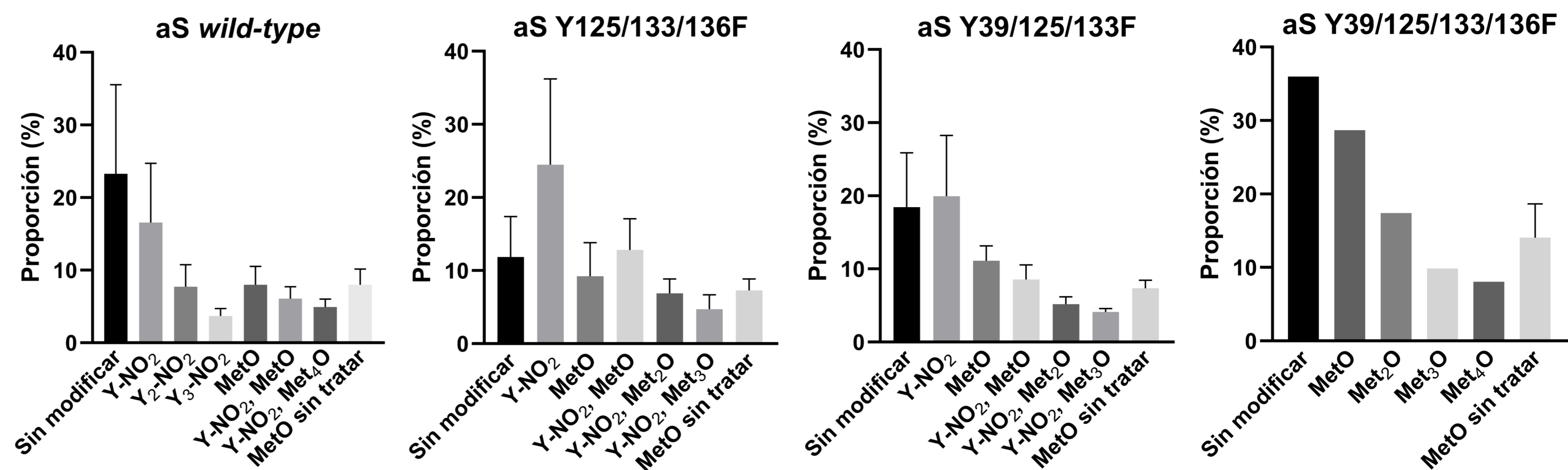


Figura 3. Perfil de nitración y oxidación producido por bolo de PN y aS. Proporción de especies generadas por reacción de PN 0,5 mM con aS 0,1 mM, administrado en bolo. La cuantificación se realizó por espectrometría de masa (ESI-MS) considerando el área bajo la curva de la deconvolución espectral. Y-NO₂: una tirosina nitrada; Y₂-NO₂: dos tirosinas nitradas; Y₃-NO₂: tres tirosinas nitradas; MetO: una metionina oxidada; Met₂O: dos metioninas oxidadas; Met₃O: tres metioninas oxidadas; Met₄O: cuatro metioninas oxidadas.

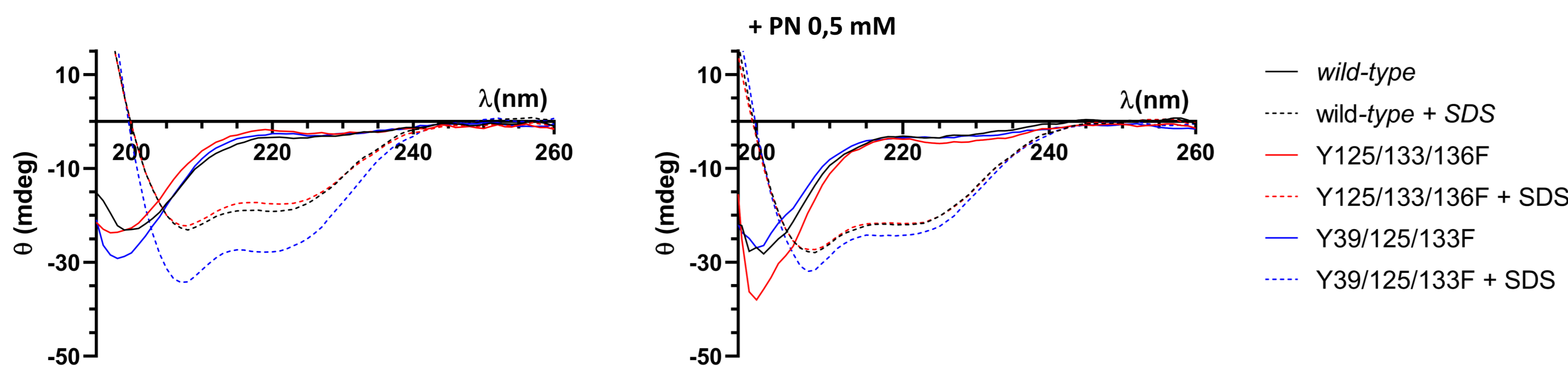


Figura 4. Caracterización funcional de aS *wild-type* y mutantes. Espectros de dicroísmo circular para las proteínas de aS obtenidas. La aS es una proteína capaz de adoptar estructuras en alfa-hélice al interactuar con membranas lipídicas como las generadas por dodecil sulfato de sodio (SDS). Tanto la forma *wild-type* como los mutantes con un único residuo de tirosina son capaces de formar estructuras en alfa-hélice al interactuar con SDS 2mM. Esta capacidad no se ve alterada por la nitración de las proteínas.

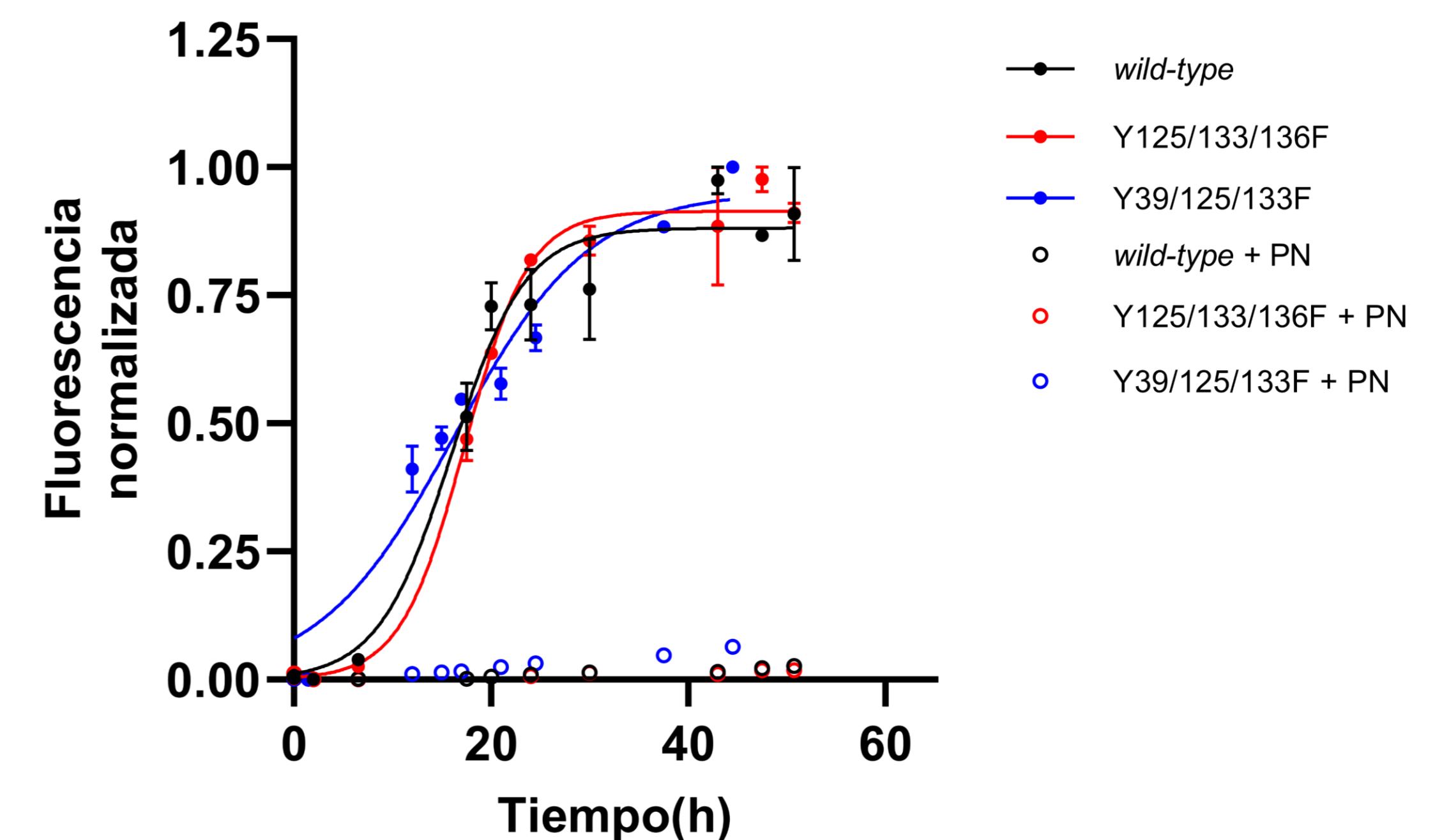


Figura 5. Cinética de formación de fibras de aS. 0,1 mM de aS se incubó en agitación a 37°C y se extrajeron muestras para analizar la formación de fibras en el tiempo. Se utiliza la fluorescencia de la sonda Tioflavina-T (Th-T), la cual es fluorescente únicamente cuando interacciona con estructuras en hoja beta, presentes en las estructuras fibrilares de aS. El tratamiento con 0,5 mM de PN inhibe la formación de fibras. $\lambda_{em} = 450$ nm $\lambda_{ex} = 482$ nm. No existen diferencias entre la cinética de agregación entre los mutantes y la forma *wild-type* (p-valor > 0,05).

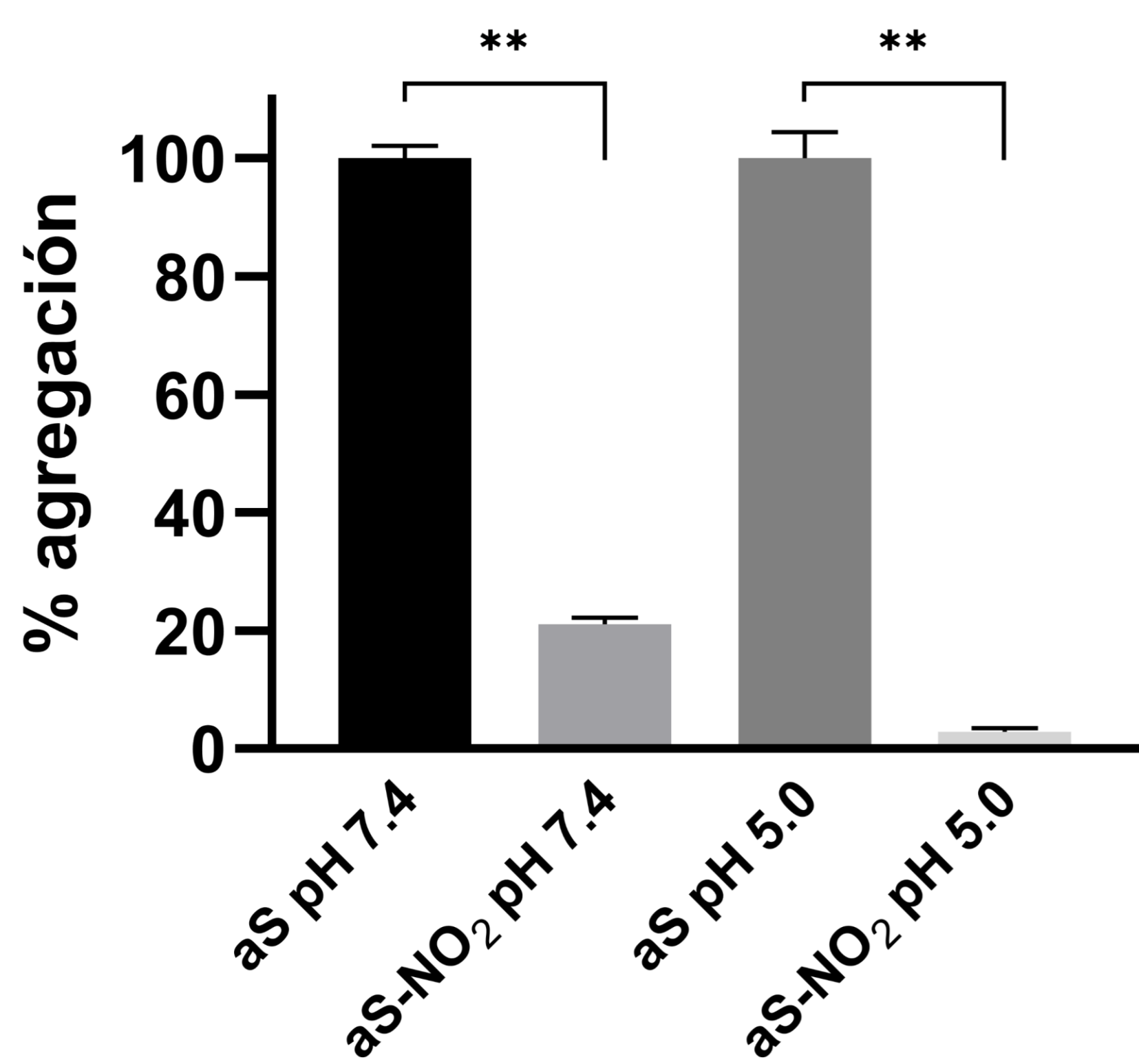


Figura 6. Inhibición de agregación de aS por 3-nitrotirosina no se debe a un efecto por la carga negativa. Agregación de aS (100 μ M) a fibras evaluado por fluorescencia de sonda Th-T a pH 7,4 y 5,0. A pH 5,0 se evita la desprotonación de la 3-nitrotirosina, evitando la presencia de carga negativa. t-test unpaired two-tailed. ** p-valor < 0,001.

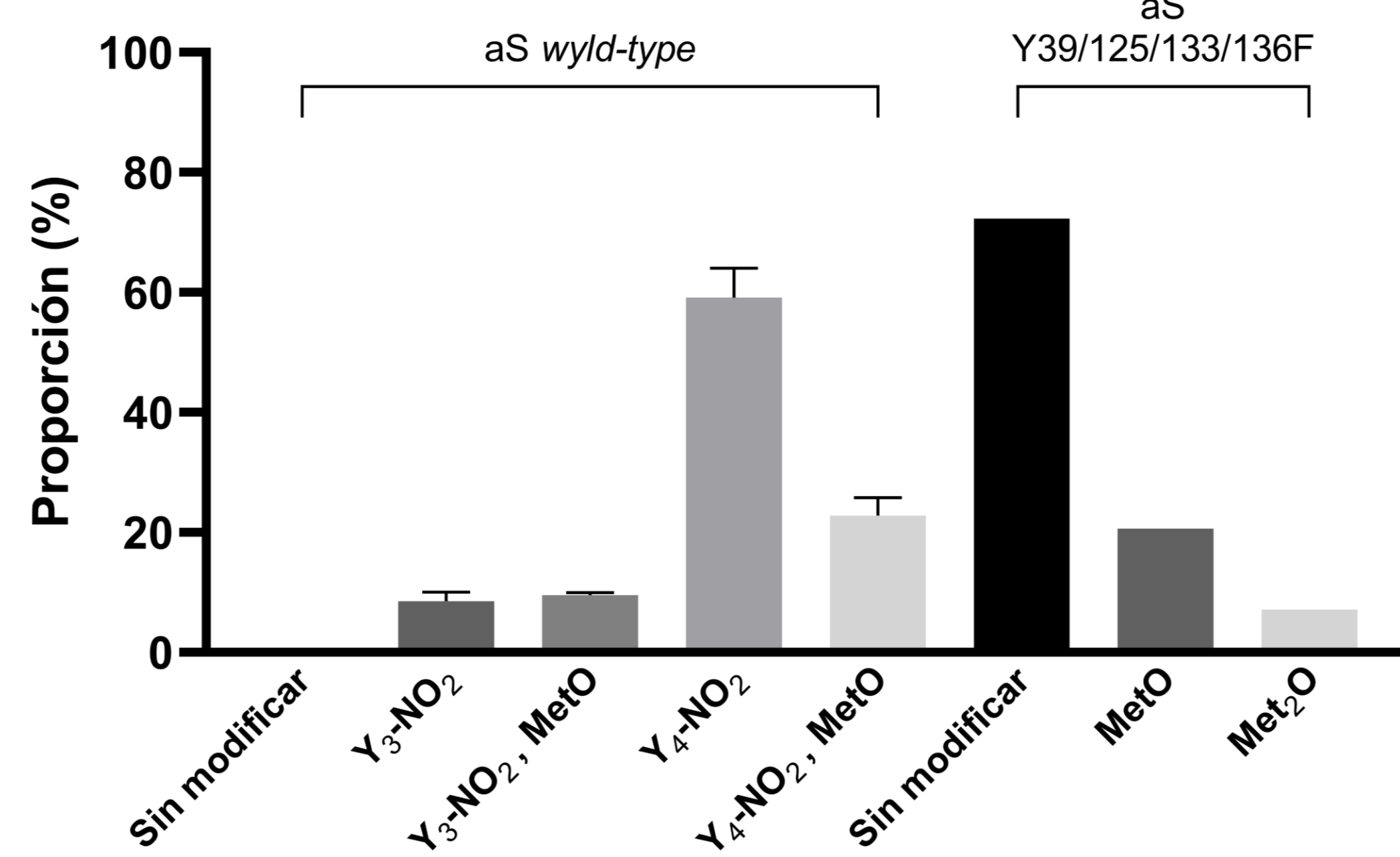


Figura 7. Patrón de nitración y modificaciones de aS por DNI. Especies generadas por tratamiento de aS *wild-type* y mutante sin tirosinas (0,05 mM) con 1,5-metil-1,4-dinitroimidazol (DNI) (1mM) e irradiadas con UV-A por 30 minutos. Identificación de las especies oxidadas y cuantificación relativa se realizó por ESI-MS.

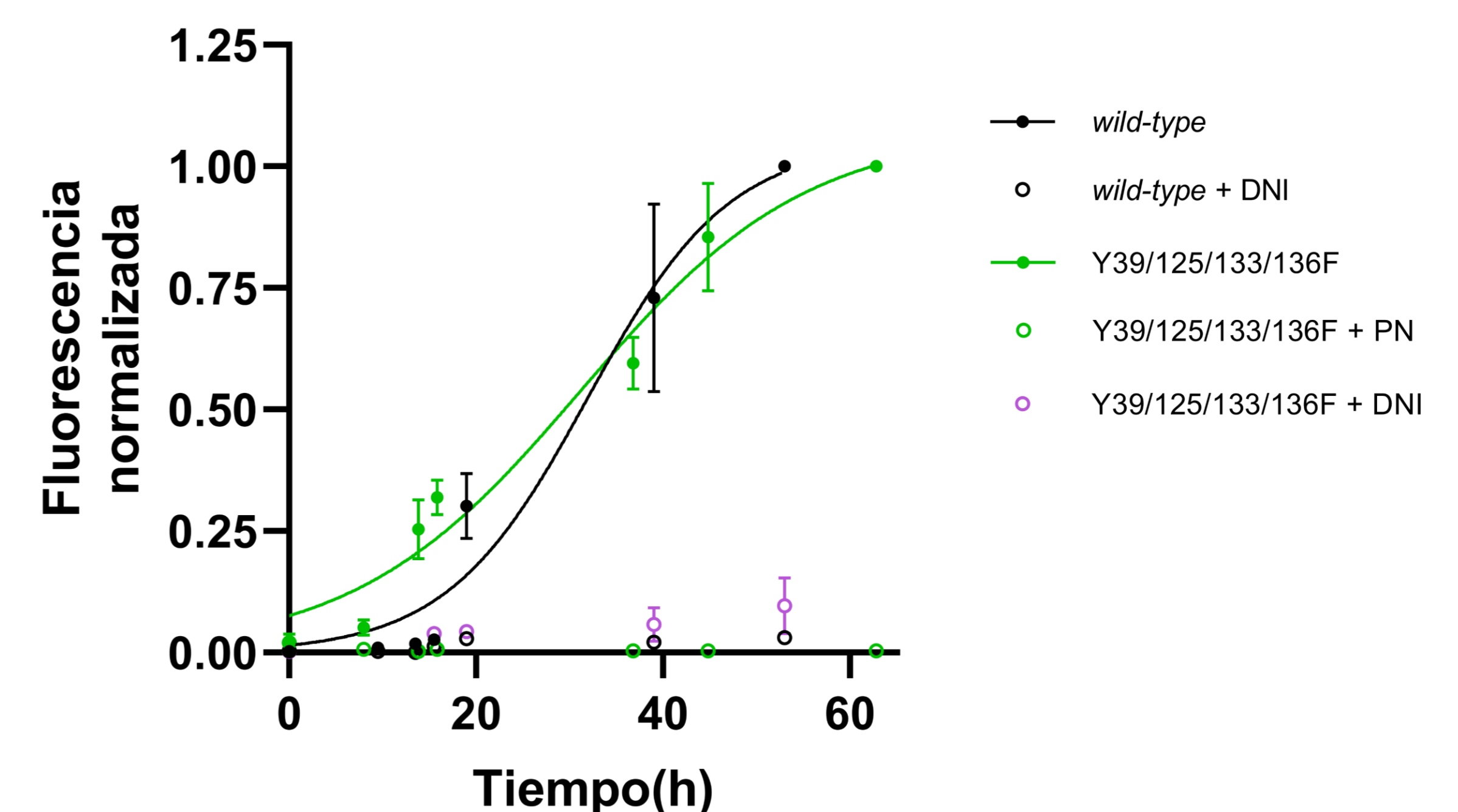


Figura 8. Cinética de agregación de aS utilizando DNI como agente nitrante. Cinética de agregación para aS nitrada con DNI. Se incluyó el mutante Y39/125/133/136F que no presenta tirosinas ya que no es nitrado por DNI. El tratamiento con DNI inhibe la agregación a fibras para ambas proteínas. No existen diferencias en la cinética de aS mutante y *wild-type* sin tratar (p-valor > 0,05)

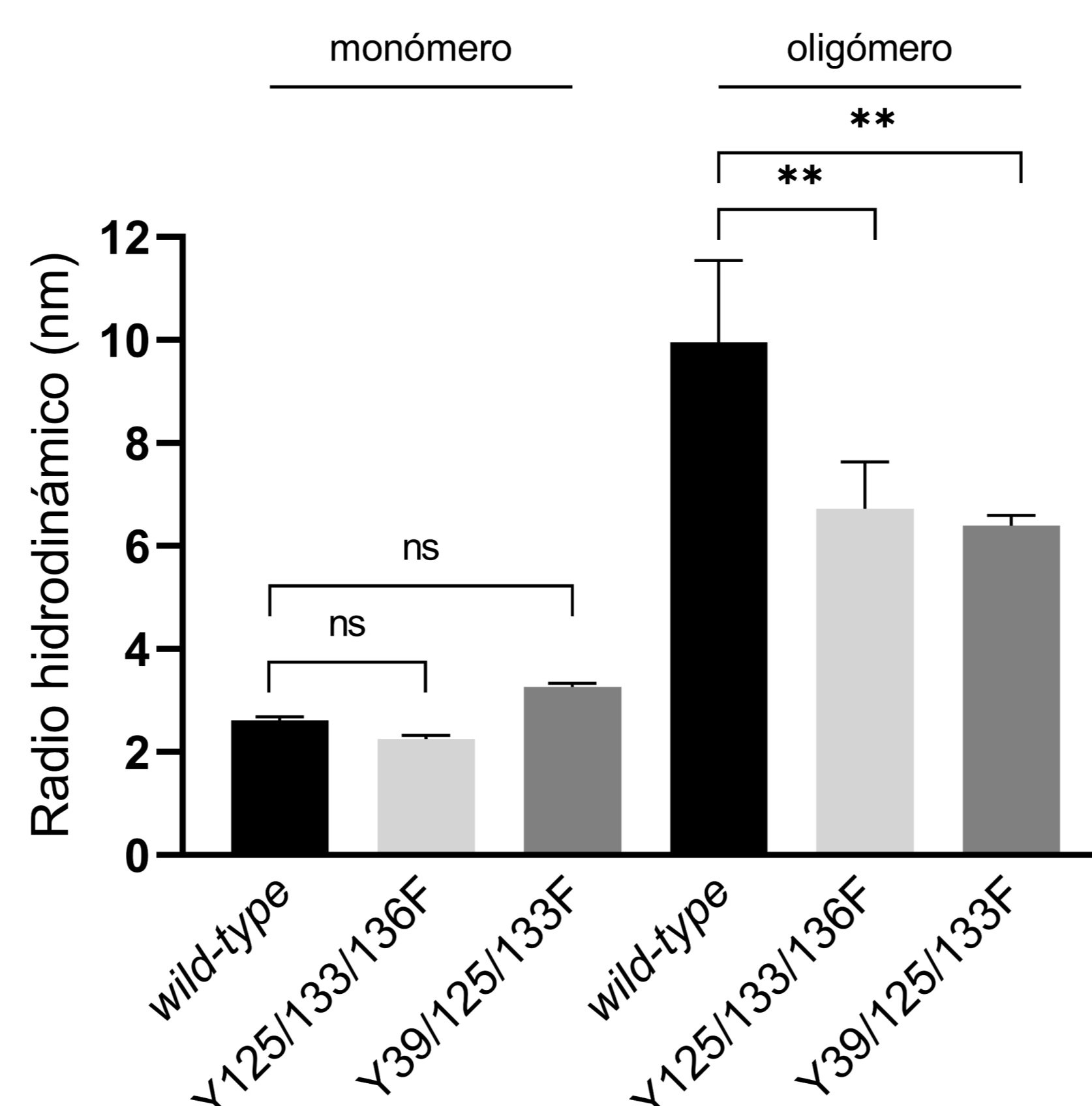


Figura 9. Radio hidrodinámico de monómero y oligómeros formados por las distintas formas de aS *wild-type* y mutantes. Se evaluó el radio hidrodinámico por dispersión dinámica de luz (DLS) Test ANOVA. ** p-valor < 0,001.

CONCLUSIONES

- Los mutantes de aS diseñados se comportan de forma similar al *Wild-type*.
- Los residuos de tirosina estudiados no son necesarios para la agregación a fibras, pero los oligómeros adquieren un radio hidrodinámico menor con las formas mutantes.
- La nitración de residuos de tirosina por administración de PN genera diversas especies oxidadas, así como por unión covalente por enlaces o,o-ditirosina.
- El efecto inhibitorio de la agregación no se revierte con la protonación de los residuos de tirosina nitrados.
- La nitración con DNI genera como modificación principal la nitración de tirosina, y en menor medida la formación de metionina sulfóxido.
- La nitración con DNI de aS *wild-type* continúa produciendo la inhibición de agregación a fibras.
- El tratamiento con DNI de un mutante de aS que no presenta residuos de tirosina inhibe su agregación a fibras, por lo que la oxidación de metioninas podría ser relevante, aunque no excluye el efecto de la nitración.

Financiación: