



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY



**CEINBIO**  
Centro de Investigaciones Biomédicas  
Universidad de la Repùblica - Montevideo | UY

# Alfa Sinucleína: Modificaciones oxidativas y la interacción celular de sus oligómeros y fibras

Lic. Rodrigo Ivagnes Green

Programa de Desarrollo en Ciencias Básicas

Área Biología

Opción Biología Celular y Molecular / Bioquímica

Facultad de Medicina, Universidad de la Repùblica y Centro de Investigaciones  
Biomédicas (CEINBIO)

Montevideo, Uruguay, 2025



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY



CEINBIO  
Centro de Investigaciones Biomédicas  
Universidad de la Repùblica - Montevideo | UY

# Alfa Sinucleína: Modificaciones oxidativas y la interacción celular de sus oligómeros y fibras

Lic. Rodrigo Ivagnes Green

Tesis de Maestría presentada al Programa de Desarrollo en Ciencias Básicas (PEDECIBA) opción Biología Celular y Molecular / Bioquímica como requisito para optar por el título de Magister en Ciencias Biológicas.

Director: Dr. José María Souza

Co-directora: Dra. Cecilia Chavarría

Tribunal: Giselle Prunell (presidenta)

Ernesto Miquel

Matías Möller

Montevideo, Uruguay 2025



# ÍNDICE

---

1	Resumen en español .....	iii
2	Resumen en inglés.....	v
3	Abreviaturas .....	vii
4	Índice de figuras .....	viii
5	Índice de tablas .....	x
6	Introducción.....	1
6.1	Alfa sinucleína .....	1
6.1.1	Estructura y secuencia .....	1
6.1.2	Función de la aS .....	3
6.1.3	aS y sinucleinopatías .....	5
6.1.4	Formas extracelulares de aS .....	8
6.2	Modificaciones oxidativas de aS: nitración y oxidación .....	10
6.2.1	Nitración de tirosina .....	11
6.2.2	Oxidación de metionina.....	15
6.3	Respuesta microglial a las distintas conformaciones de aS .....	16
6.3.1	Gen de activación linfocitario 3 (LAG3) .....	18
6.3.2	Receptor tipo Toll (TLR) .....	19
6.3.3	FC $\gamma$ RIIB .....	21
6.4	Efectos celulares mediados por especies agregadas de Alfa sinucleína .....	22
7	Antecedentes .....	25
8	Hipótesis de trabajo.....	28
9	Objetivos.....	29
10	Materiales y métodos .....	30
11	Resultados y discusión.....	46
11.1	Efecto de la nitración en residuos de tirosina y oxidación de metionina en la agregación de aS.....	46
11.1.1	Obtención de mutante de aS 4YF .....	46
11.1.2	Perfil de modificaciones oxidativas por ONOO $^-$ y DNI .....	53
11.1.3	Formación de 3,3'-ditirosina .....	62
11.1.4	Impacto de 3-NT y MetO en la capacidad de formación de fibras y oligómeros .....	66
11.2	Marcado de especies agregadas de aS con Alexa488 .....	72
11.2.1	Formación de aS <sub>m</sub> conjugado a Alexa488 .....	72
11.2.2	Formación de aS <sub>f</sub> conjugada a Alexa488 .....	75

11.2.3	Formación de aS <sub>o</sub> conjugados a Alexa488.....	77
11.2.4	Propiedades espectrales de las especies de aS marcadas con Alexa488	78
11.3	Interacción de las especies de aS marcadas con cultivos celulares .....	79
11.3.1	Internalización de las especies de aS .....	79
11.3.2	Alteración funcional de cultivos celulares tratados con aS.....	93
12	Conclusiones y perspectivas .....	99
13	Agradecimientos .....	103
14	Referencias.....	104

# 1 RESUMEN EN ESPAÑOL

---

La proteína alfa-sinucleína (aS) es una proteína con una gran flexibilidad estructural, con la capacidad de formar agregados proteicos insolubles (fibras y oligómeros), que se depositan en el interior neuronal. Estas inclusiones intracelulares, denominadas Cuerpos de Lewy, son la característica diagnóstica de enfermedades denominadas sinucleinopatías, dentro de las cuales se encuentra la Enfermedad de Parkinson, una enfermedad muy prevalente a nivel mundial. Dentro de los factores que regulan la capacidad de la aS de formar estos agregados, se encuentra la nitración en residuos de tirosina, una modificación que se encuentra en tejidos *post-mortem* de pacientes diagnosticados con EP. Sin embargo, aún no se conoce en profundidad la contribución de cada residuo de tirosina a este fenómeno, lo cual es relevante en condiciones donde la homeostasis celular se encuentra alterada. Otro factor clave de estas enfermedades, es que se han detectado formas extracelulares de la aS que son internalizadas por células vecinas propagando la neurodegeneración dentro del SNC.

Este trabajo propone indagar los aspectos estructurales y funcionales en los que intervienen los residuos de tirosina localizados en los extremos N- y C-terminales de la proteína aS, y en las consecuencias que genera la nitración de dichos residuos. Por otro lado, este proyecto pretende estudiar las formas de interacción de las principales conformaciones de la aS (monómeros, oligómeros y fibras) con cultivos celulares.

Metodológicamente, se emplearon mutantes Tyr→Phe de aS y varias estrategias de oxidación de tirosina y metionina, con la finalidad de analizar las propiedades de agregación y el patrón de modificaciones oxidativas producidas. Se observó que tanto la nitración como la oxidación de metionina son modificaciones que inhiben la formación de fibras, pero no de oligómeros.

Por otro lado, se logró obtener las distintas especies agregadas de aS conjugadas con una molécula fluorescente de Alexa488. Esto permitió hacer estudios por microscopía confocal en cultivos celulares expuestos a estas especies, y además el estudio de alteraciones funcionales producidas en las células. Se logró observar que las fibras y oligómeros logran internalizarse en cultivos de célula microglial BV-2, pero no así la forma monomérica. Este estudio plantea un abordaje útil para el estudio de la propagación

de aS célula-célula, así como para el estudio de los diferentes efectos de las conformaciones de aS.

**Palabras clave**

ALFA-SINUCLEÍNA, 3-NITROTIROSINA, FIBRAS, OLIGÓMEROs,  
INTERNALIZACIÓN, ENFERMEDAD DE PARKINSON, MICROGLÍA.

## **2 RESUMEN EN INGLÉS**

---

Alpha-Synuclein (aS) is a protein with high structural flexibility, with the capacity of self-assemble into insoluble proteaceous aggregates (fibrils and oligomer) that are found inside neurons. These intracellular inclusions, called Lewy Bodies, are a diagnostic hallmark of a group of neurodegenerative diseases called synucleinopathies, being Parkinson's Disease one of the most prevalent worldwide. Among the factors that regulate aS aggregation is the nitration of tyrosine residues, a post-translational modification that has been reported in *post-mortem* tissues from PD patients. However, the specific contribution of each tyrosine residue to this phenomenon remains unclear, particularly under conditions where cellular homeostasis is altered. Moreover, extracellular forms of aS have been identified, potentially exerting prion-like effects and propagating neurodegeneration within the central nervous system.

This work aims to investigate the structural and functional roles of tyrosine residues located at the N- and C-terminal regions of aS, as well as the consequences of their nitration. Additionally, the project seeks to study the interaction patterns of the main aS conformations: monomers, oligomers, and fibril with cells in culture.

Methodologically, aS Tyr→Phe mutants were employed, alongside various strategies for selective oxidation of tyrosine and methionine, to analyze aggregation properties and the resulting oxidative modification patterns. It was observed that both tyrosine nitration and methionine oxidation inhibit fibril formation, though not oligomerization.

Furthermore, monomeric aS was successfully conjugated to a fluorescent probe, enabling the labeling of both fibrils and oligomers. This allowed for confocal microscopy studies in cell cultures exposed to the different aS species and the analysis of functional alterations induced in the cells. The results showed that both fibrils and oligomers are internalized by BV-2 microglial cell cultures, although this was not observed for the monomeric form. This study provides a valuable approach for investigating the cell-to-cell propagation of aS and the differential cellular effects exerted by its distinct conformations.

**Key Words**

ALPHA-SYNUCLEIN, 3-NITROTYROSINE, FIBERS, OLIGOMERS, CELL INTERNALIZATION, PARKINSON'S DISEASE, MICROGLIA.

### 3 ABREVIATURAS

---

**ABAP:** 2,2'-azobis (2-amidinopropano); **aS:**  $\alpha$ -sinucleína; **aS<sup>488</sup>:** aS conjugada con Alexa488; **aSr:** fibras de aS; **aS<sub>m</sub>:** monómero de aS; **aS<sub>o</sub>:** oligómeros de aS; **BCA:** ácido bicinconínico; **BrET:** bromuro de etidio; **BSA:** albúmina sérica bovina; **CD:** dicroísmo circular; **CO<sub>2</sub>:** dióxido de carbono; **\*CO<sub>3</sub><sup>-</sup>:** radical carbonato; **CTCF:** fluorescencia celular total corregida; **DAMP:** patrón molecular asociado a daño; **DAPI:** 4',6-diamidino-2-fenilindol; **DIC:** microscopía de contraste de interferencia diferencial; **DiTyr:** 3,3'-ditirosina; **DMEM:** Dulbecco's Modified Eagle Medium; **DMSO:** dimetilsulfóxido; **DNI:** 5-metil-1,4-dinitro-1H-imidazol; **DO:** densidad óptica; **EA:** enfermedad de Alzheimer; **ELA:** esclerosis lateral amiotrófica; **EP:** enfermedad de Parkinson; **MS:** espectrometría de masa; **H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** peróxido de hidrógeno; **HPLC:** cromatografía líquida de alto rendimiento; **HRP:** peroxidasa de rábano; **IL:** interleuquina; **iNOS:** óxido nítrico sintasa inducible; **kan:** kanamicina; **LB:** Lauria Bertani; **LCR:** líquido cefalorraquídeo; **\*LOO:** radical lipoperoxilo; **LPS:** lipopolisacárido; **MET:** microscopía electrónica de transmisión; **MetO:** metionina sulfóxido; **MHC:** complejo mayor de histocompatibilidad; **MnO<sub>2</sub>:** dióxido de manganeso; **MPTP:** 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina; **MSA:** atrofia multisistémica; **Msr:** metionina sulfóxido reductasa; **MTT:** bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio; **N-NO<sub>2</sub>:** enlace nitramina; **NAC:** Non-amyloid component; **NaNO<sub>2</sub>:** nitrito de sodio; **NaOH:** hidróxido de sodio **NK:** natural killer; **-NO<sub>2</sub>:** grupo nitro; **\*NO<sub>2</sub>:** radical dióxido de nitrógeno; **NOS:** óxido nítrico sintasa; **NOX:** NADPH oxidasa; **NT:** neurotransmisor; **OCI<sup>-</sup>:** anión hipoclorito; **\*OH:** radical hidroxilo; **ON:** over-night; **ONOO<sup>-</sup>:** peroxinitrito; **PAMP:** patrón molecular asociado a patógeno; **PBS:** buffer fosfato salino; **PBS-t:** PBS tween 0,1%; **PCR:** reacción en cadena de la polimerasa; **PFF:** fibras preformadas; **PMA:** acetato de tetradecanoilforbol; **RC:** rojo Congo; **RIPA:** buffer de radioinmunoprecipitación; **RMN:** resonancia magnética nuclear; **RNS:** especie reactiva del nitrógeno; **ROS:** especie rectiva del oxígeno; **SDS:** dodecilsulfato de sodio; **SFB:** suero fetal bovino; **SNC:** sistema nervioso central; **SNP:** sistema nervioso periférico; **SNpc:** *substantia nigra pars compacta*; **TAE:** buffer tris-acetato-EDTA; **TGF $\beta$ :** factor de crecimiento transformante  $\beta$ ; **Th-T:** tioflavina T; **TLR:** receptor tipo Toll; **TNF $\alpha$ :** factor de necrosis tumoral  $\alpha$ ; **TNM:** tetranitrometano; **TNT:** *Tunneling nanotube*; **\*Tyr:** radical tirosilo; **Tyr:** tirosina; **UV:** ultravioleta; **3-NT:** 3-nitrotirosina;  **$\beta$ S:**  $\beta$ -sinucleína;  **$\gamma$ S:**  $\gamma$ -sinucleína.

## 4 ÍNDICE DE FIGURAS

---

FIGURA 1. SECUENCIA Y ESTRUCTURA DE ALFA-SINUCLEÍNA HUMANA.....	2
FIGURA 2. FUNCIONES DE AS EN LAS TERMINALES SINÁPTICAS .....	4
FIGURA 3. ESKEMA DE FORMACIÓN DE FIBRAS Y OLIGÓMERO DE AS.....	7
FIGURA 4. MECANISMO DE NITRACIÓN DE TIROSINA.....	12
FIGURA 5. CARACTERÍSTICAS ESPECTRALES DE TIROSINA Y 3-NT.....	14
FIGURA 6. ESKEMA DE INTERACCIÓN DE AS EN DISTINTAS CONFORMACIONES CON DISTINTAS CÉLULAS DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.....	17
FIGURA 7. ESKEMA DE OBTENCIÓN DE MUTANTES DE AS Y→F.....	25
FIGURA 8. DISEÑO Y OBTENCIÓN DE PLÁSMIDOS DE AS Y(39/125/133/136)F.....	47
FIGURA 9. SECUENCIACIÓN DE PLÁSMIDOS AS Y(39/125/133/136)F.....	48
FIGURA 10. SDS-PAGE 12% DE EXPRESIÓN DE AS.....	49
FIGURA 11. CROMATOGRAFÍA PARA PURIFICACIÓN DE AS 4YF POR HPLC.....	50
FIGURA 12. EVALUACIÓN DE LA PURIFICACIÓN DE AS 4YF .....	51
FIGURA 13. DECONVOLUCIÓN DEL ESPECTRO DE MASA DE AS 4YF.....	52
FIGURA 14. ESPECTROS DE DICOÍSMO CIRCULAR DE MUTANTES DE AS .....	53
FIGURA 15. FORMACIÓN DE ENTRECRUZAMIENTOS DE AS SALVAJE Y MUTANTES CON ONOO <sup>-</sup> .....	54
FIGURA 16. PERFILES DE MODIFICACIÓN DE RESIDUOS DE TIROSINA Y METIONINA DE AS TRATADA CON ONOO <sup>-</sup> OBTENIDOS POR MS.....	55
FIGURA 17. PERFILES DE MODIFICACIÓN DE RESIDUOS DE TIROSINA Y METIONINA DE AS SALVAJE EMPLEANDO DNI Y LUZ UV. ....	58
FIGURA 18. PERFILES DE MODIFICACIÓN DE RESIDUOS DE TIROSINA Y METIONINA DEL MUTANTE 4YF CON PEROXINITRITO O DNI.....	59
FIGURA 19. CUANTIFICACIÓN DE 3-NT POR ESPECTROFOTOMETRÍA.....	60
FIGURA 20. FORMACIÓN DE DiTYR CON H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Y Cu <sup>2+</sup> .....	62
FIGURA 21. FORMACIÓN DE DiTYR CON H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Y HRP .....	63
FIGURA 22. FORMACIÓN DE DiTYR CON ABAP.....	64
FIGURA 23. FORMACIÓN DE DiTYR CON ABAP PARA AS Y39 E 136 A pH 8,5.....	65
FIGURA 24. FORMACIÓN DE FIBRAS DE AS SALVAJE Y 4YF OXIDADAS.....	66
FIGURA 25. EFECTO DEL pH EN LA FORMACIÓN DE FIBRAS DE AS NITRADA.....	68
FIGURA 26. EFECTO DOSIS DEPENDIENTE DE LA NITRACIÓN EN LA TIROSINA 39 .....	69
FIGURA 27. EFECTO EN LA AGREGACIÓN DE AS MEDIADO POR NITRACIÓN EN EXTREMO N-TERMINAL O C-TERMINAL .....	70
FIGURA 28. FORMACIÓN DE OLIGÓMERO DE AS NITRADA CON DNI.....	71
FIGURA 29. ESTRUCTURA DE ALEXA488 Y MECANISMO DE REACCIÓN DE MARCADO.....	72
FIGURA 30. CROMATOGRAMA DE PD10 DE AS <sub>M</sub> 488.....	73
FIGURA 31 CONDICIONES DE MARCADO DE AS <sub>M</sub> <sup>488</sup> .....	74
FIGURA 32. ESPECTROS DE FLUORESCENCIA DE AS <sub>M</sub> <sup>488</sup> .....	75

<b>FIGURA 33. CINÉTICA DE FORMACIÓN DE AS<sub>F</sub><sup>488</sup> POR ENSAYO CR.....</b>	76
<b>FIGURA 34. CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE AS<sub>F</sub><sup>488</sup>. ....</b>	77
<b>FIGURA 35. PURIFICACIÓN DE AS<sub>O</sub><sup>488</sup> POR FILTRACIÓN. ....</b>	78
<b>FIGURA 36. PROPIEDADES DE FLUORESCENCIA PARA LAS FORMAS DE AS MARCADA CON ALEXA488. ....</b>	79
<b>FIGURA 37. CULTIVOS PRIMARIOS DE ASTROCITOS VIVOS TRATADOS CON AS<sub>M</sub><sup>488</sup>.....</b>	80
<b>FIGURA 38. FLUORESCENCIA DE AS<sub>M</sub><sup>488</sup> EN MEDIO DE CULTIVO. ....</b>	81
<b>FIGURA 39. INTERNALIZACIÓN DE AS<sup>488</sup> EN ASTROCITOS FIJADOS.....</b>	83
<b>FIGURA 40. MICROSCOPIA CONFOCAL DE AS<sup>488</sup> CON CÉLULAS BV-2.....</b>	86
<b>FIGURA 41. INTERNALIZACIÓN DE AS<sub>F</sub><sup>488</sup> Y AS<sub>O</sub><sup>488</sup> EN CÉLULAS BV-2. ....</b>	87
<b>FIGURA 42. INTERNALIZACIÓN DE AS<sup>488</sup> POR CITOMETRÍA DE FLUJO. ....</b>	88
<b>FIGURA 43. INMUNOCITOQUÍMICA DE CÉLULAS BV-2 TRATADAS CON AS<sub>M</sub>.....</b>	89
<b>FIGURA 44. ENSAYO INTERNALIZACIÓN AS<sub>M</sub> CON BV-2. ....</b>	90
<b>FIGURA 45. ENSAYO DE COMPETENCIA PARA AS<sub>F</sub><sup>488</sup> POR CITOMETRÍA DE FLUJO. ....</b>	91
<b>FIGURA 46. MECANISMO DE INTERNALIZACIÓN AS<sub>F</sub><sup>488</sup> .....</b>	92
<b>FIGURA 47. CURSO TEMPORAL DEL ENSAYO MTT CON CÉLULAS SH-SY5Y. ....</b>	94
<b>FIGURA 48. ENSAYO VIABILIDAD DE CÉLULAS SH-SY5Y INCUBADAS CON AS<sub>M</sub> Y AS<sub>F</sub>.....</b>	95
<b>FIGURA 50. PRODUCCIÓN DE NITRITO POR CÉLULAS BV-2 INCUBADAS CON AS<sub>F</sub>....</b>	96
<b>FIGURA 49 ENSAYO VIABILIDAD DE CÉLULAS BV-2 INCUBADAS CON AS<sub>M</sub> Y AS<sub>F</sub>. ....</b>	95
<b>FIGURA 51. MARCADORES DE ACTIVACIÓN DE CÉLULAS BV-2 INCUBADAS CON AS. ....</b>	97

## 5 ÍNDICE DE TABLAS

---

<b>TABLA 1. EJEMPLOS DE SINUCLEINOPATÍAS.</b> SE DETALLAN ALTERACIONES EN DISTINTAS PROTEÍNAS DESCRIPTAS CAUSALES DE PATOLOGÍAS NEURODEGENERATIVAS .....	5
<b>TABLA 2. MECANISMOS DESCRITOS DE INGRESO Y LIBERACIÓN DE LAS DISTINTAS ESPECIES DE AS.</b> EXTRAÍDO DE (146). ....	10
<b>TABLA 3. EFECTOS DE DISTINTAS CONFORMACIONES EN ASTROCITOS PRIMARIOS.</b> TABLA ADAPTADA DE CHAVARRÍA ET AL., 2018 (246), REPRESENTANDO EFECTOS EN FUNCIÓN MITOCONDRIAL Y PRODUCCIÓN DE ESPECIES OXIDANTES RESPECTO A LA CONDICIÓN CONTROL. RCR: RELACIÓN CONTROL RESPIRATORIO. ECAR: VELOCIDAD DE ACIDIFICACIÓN EXTRACELULAR. ....	23
<b>TABLA 4. PESOS MOLECULARES DE FORMAS OXIDADAS.</b> SE CALCULARON LOS PESOS MOLECULARES ESPERADOS DE LAS PROTEÍNAS AS SALVAJE Y MUTANTES PARA LA FORMACIÓN DE 3-NT (+45 DA) Y METO (+16 DA). ....	55
<b>TABLA 5. PORCENTAJE DE ESPECIES OBTENIDAS POR TRATAMIENTO CON ONOO<sup>-</sup>.</b> PROMEDIOS DE LOS PORCENTAJES DE MODIFICACIONES OBTENIDOS SEGÚN ESPECTROS DE MASA EN FIGURA 15. ....	57
<b>TABLA 6. TIEMPO MEDIO EN HORAS DE AGREGACIÓN (T<sub>1/2</sub>) PARA AS TRATADA CON ONOO<sup>-</sup> O DNI.....</b>	66
<b>TABLA 7. PROPIEDADES DE FLUORESCENCIA PARA LAS FORMAS DE AS MARCADAS CON ALEXA488. ....</b>	78

## 6 INTRODUCCIÓN

---

### 6.1 ALFA SINUCLEÍNA

La alfa sinucleína (aS), es una proteína pequeña de 140 aminoácidos (14 kDa), altamente expresada en las terminales presinápticas neuronales, particularmente en la neocorteza, el hipocampo, el cuerpo estriado, el tálamo y el cerebelo (1–3). A pesar de su expresión predominantemente dentro del sistema nervioso central (SNC), también se expresa de forma variable en otros tipos celulares como en eritrocitos y células eritroides (4). Junto con la  $\beta$ -sinucleína y la  $\gamma$ -sinucleína ( $\beta$ S y  $\gamma$ S, respectivamente), la aS pertenece a la familia de sinucleínas, siendo todas ellas codificadas por genes diferentes (aS se codifica por el gen *SNCA*). En cuanto a la función de la  $\beta$ S, al ser co-expresada junto la aS en varias regiones del SNC, se le ha atribuído un rol como chaperona al inhibir la agregación de aS (5–9). En cambio, la  $\gamma$ S se expresa en tejido adiposo y sistema nervioso periférico (SNP) (10,11), también aumentando su expresión en tumores mamarios (12–15), y su función no es conocida.

#### 6.1.1 Estructura y secuencia

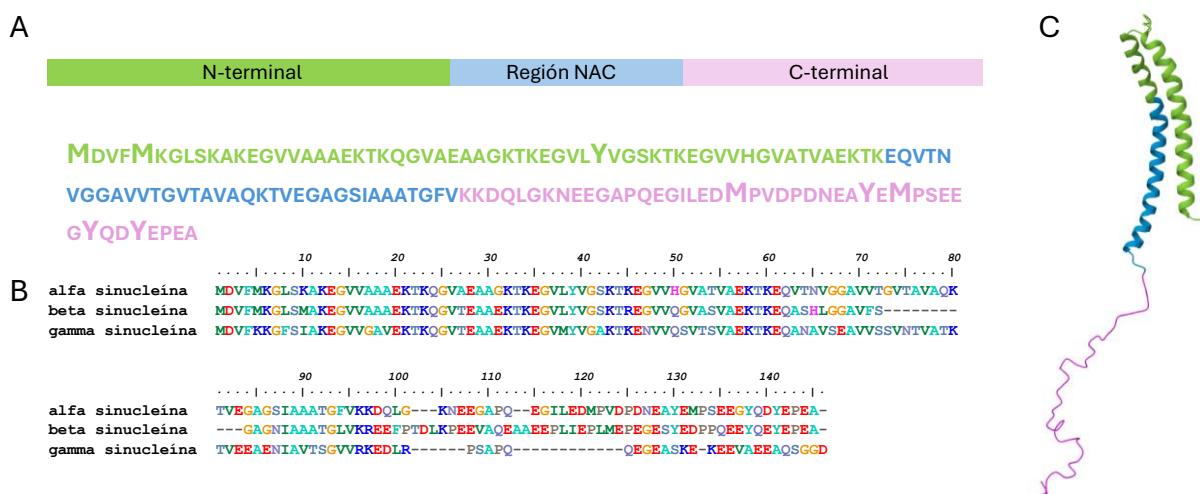
La aS, al igual que  $\beta$ S y  $\gamma$ S, es una proteína soluble con capacidad de interaccionar con membranas lipídicas. Es una proteína intrínsecamente desordenada que se encuentra en el citoplasma celular en forma monomérica ( $aS_m$ ) (16–18). Se ha propuesto que la aS puede encontrarse como un tetrámero, aunque la evidencia es contradictoria. Estudios a favor de la estructura tetramérica se basan en metodologías que generan entrecruzamientos proteicos en cultivos celulares, a partir de donde se logra purificar la aS en un estado tetramérico (19,20). Sin embargo, estudios de resonancia magnética nuclear (RMN) *in cellula* apoyan la forma monomérica (16,21,22). La discusión acerca de su estado de oligomerización no está resuelta, y la visión actual considera que existe un equilibrio dinámico entre el monómero y el tetrámero, donde la alta concentración proteica dentro del citosol celular (*molecular crowding*) es importante para estabilizar la forma tetramérica.

Es posible dividir estratégicamente la secuencia primaria de la aS en 3 regiones con propiedades bioquímicas distintas: la región N-terminal (aminoácidos 1-60), la región central (aminoácidos 61-95), y la región C-terminal (aminoácidos 96-140). Un esquema de la secuencia primaria se detalla en la figura 1. La región N-terminal contiene 7 repeticiones variables de la secuencia KTKEGV implicadas en la interacción con lípidos

de membrana. Al interaccionar con vesículas lipídicas esta región puede plegarse en dos alfa-hélices separadas por un fragmento de 10 aminoácidos sobre los aminoácidos 38 a 44 (23,24), como se muestra en la figura 1.

A la región central se la conoce, por sus siglas en inglés, con el nombre de *NAC* (Non amyloid- $\beta$  component). Es una región hidrofóbica capaz de inducir el plegamiento de otras moléculas de aS a una estructura de hoja- $\beta$  plegada, formando agregados fibrilares intracelulares (25), lo que es una característica de la aS humana (la aS de ratón no posee esta propiedad al tener grandes diferencias en la secuencia de esta región). Históricamente, un fragmento peptídico que contenía esta región fue purificado por vez primera desde placas amiloides de pacientes con enfermedad de Alzheimer (EA), y de allí su denominación (26). En dicho trabajo, se describió la homología de este péptido NAC y su precursor, NACP, con la proteína aS, descubierta unos años antes en el lóbulo eléctrico de la raya eléctrica del pacífico (*Torpedo californica*) (1).

La región C-terminal es rica en prolina y aminoácidos ácidos, lo que le otorga a la proteína un punto isoeléctrico de 4,7 (27). Esta región permanece desordenada (28,29) y es responsable de interaccionar con varias proteínas (30,31), así como con cationes como  $\text{Ca}^{2+}$  (32). Esta región contiene numerosos residuos capaces de ser modificados por modificaciones postraduccionales (33–38).



**Figura 1. Secuencia y estructura de alfa-sinucleína humana.** A. Esquema representativo de la secuencia de aS identificando las diferentes regiones según su secuencia primaria. Se destacan en mayor tamaño residuos de tirosina y metionina. B. Alineamiento de la familia de sinucleínas humanas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ . C. Estructura extraída de *Protein Data Bank* (1XQ8) de aS humana obtenida por RMN en solución unida a micelas de SDS, con el mismo código de colores que en A.

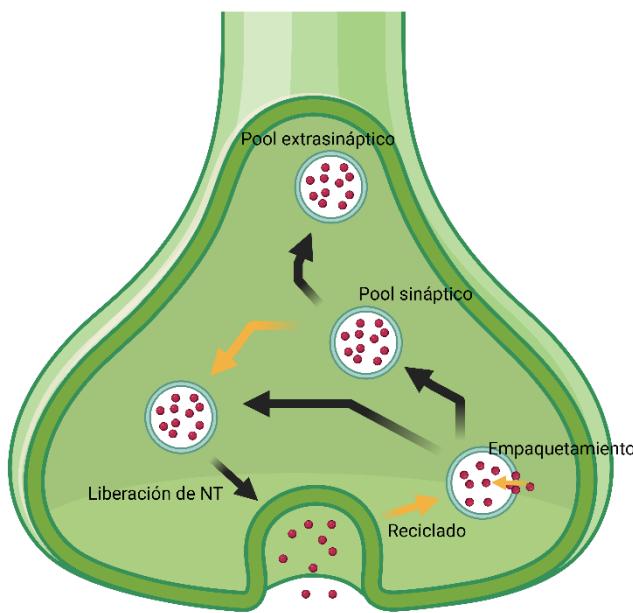
### **6.1.2 Función de la aS**

Debido a su localización presináptica y la capacidad de interaccionar con vesículas lipídicas, se ha propuesto que la aS participa en los procesos de transmisión sináptica. Sin embargo, no sería una proteína indispensable para este fenómeno, dado que la aS no se encuentra en organismos invertebrados, siendo de expresión exclusiva en vertebrados (3). Respecto a la modulación de su expresión génica, el gen *SNCA* es regulado durante el aprendizaje aumentando su expresión, lo que sugiere que participa en la plasticidad sináptica, habiendo sido observado este fenómeno durante el aprendizaje del canto de las aves (39). Adicionalmente, en cuanto a su distribución intracelular, esta cambia durante el desarrollo embrionario, comenzando a expresarse como una proteína localizada en el soma neuronal (40,41) y es una de las últimas proteínas en llegar a los botones sinápticos (42,43,44).

En la actualidad, la función de la aS no se encuentra completamente esclarecida. Varias evidencias muestran que está asociada con la plasticidad sináptica (45) y el aprendizaje (39), con la liberación de neurotransmisores (NT) (30,46) y con el mantenimiento de pool vesicular (47). Sin embargo, existen evidencias poco concluyentes acerca del rol exacto que cumple la aS, ya que en modelos de sobre expresión de aS se ha visto que disminuye la transmisión sináptica dopaminérgica, pero con resultados contradictorios sobre su efecto en las poblaciones de vesículas sinápticas (48) y liberación de neurotransmisores, habiendo evidencia de que aumenta (49–54), disminuye (46,48,55–59) o no afecta su liberación (30,45,60). Estudios *in vitro* mostraron que la aS inhibe el proceso de *docking* vesicular debido a alteraciones en el mantenimiento del pool de vesículas sinápticas y no a nivel de la maquinaria de fusión (57,61). Se ha visto, además, que la aS actúa como proteína chaperona del complejo SNARE implicado en la fusión de vesículas sinápticas uniéndose a la sinaptobrevina-2 (30). La figura 2, adaptada de (62) resume las principales funciones descritas de aS en referencia al tráfico de vesículas sinápticas.

Aún no se conocen los mecanismos que regulan el equilibrio entre la aS libre y unida a membrana, aunque la visión actual plantea que este equilibrio tiene un impacto en la función fisiológica de la aS (63). Esto se debería a que varias mutaciones puntuales de aS asociadas a fenotipos patológicos se localizan en el extremo N-terminal, la región responsable de la formación de las hélices frente a la interacción con membranas. Además, se ha sugerido que la unión de aS a membranas biológicas tiene un efecto

protector contra la formación de agregados supramoleculares, dado que la forma soluble es más susceptible de generar estos agregados (64–67). Sin embargo, en contraposición, otros estudios han mostrado que esta interacción puede favorecer la agregación (68–70). Actualmente, debido a la evidencia en estudios tanto *in vitro* como *in vivo*, se considera que la formación de  $\alpha$ -hélices es altamente protectora frente a la agregación de aS, aunque no presenta ventajas una vez iniciado un proceso de agregación (71).



**Figura 2. Funciones de aS en las terminales sinápticas.** Esquema de las funciones fisiológicas de aS en el botón sináptico durante el tráfico de vesículas con NT. Los procesos en los que interviene la aS se esquematizan con flecha amarilla, mientras que la dirección del tráfico vesicular en flechas negras. En rojo se representa la dopamina empaquetada en las vesículas de neurotransmisión. Esquema adaptado de Lashuel *et al.*, 2012 (59).

Por último, es posible mencionar otras funciones descritas para la aS como su intervención en el metabolismo lipídico de las membranas, ya que puede inhibir las enzimas fosfolipasas D1 y D2 (72,73) (aunque la evidencia *in vivo* es discutida (74)). Además, se demostró que interviene en la síntesis de dopamina, inhibiendo la enzima tirosina hidroxilasa mediante interacción con la proteína fosfatasa 2A (75), y también, se ha visto que altera la recaptación de dopamina en la vía nigroestriada regulando negativamente los transportadores DAT (76) y VMAT2 (77).

En resumen, la función fisiológica de la aS permanece en debate debido a la gran variedad conformacional que puede adoptar, así como por mecanismos compensadores frente a la falta de expresión de ésta, como pueden ser la presencia de otros miembros de la familia de las sinucleínas u otras proteínas chaperonas del complejo SNARE. A pesar

de ello, su función a nivel de las sinapsis neuronales es clave para el correcto desempeño de la maquinaria vesicular y su interacción con diversos componentes del SNC determina que la aS esté involucrada en procesos patológicos.

#### 6.1.3 aS y sinucleinopatías

Existe un conjunto de enfermedades neurodegenerativas conocidas como sinucleinopatías, principalmente asociadas al envejecimiento. Dentro de este grupo de enfermedades se encuentran la Enfermedad de Parkinson (EP), la Demencia con Cuerpos de Lewy, la Atrofia multisistémica (MSA), entre otras. En la tabla 1 se detallan varias de las sinucleinopatías descritas. En varias de estas sinucleinopatías, la característica celular distintiva es la presencia de agregados intracelulares con la aS como componente mayoritario, conocidos como Cuerpos de Lewy. Dentro de estos cuerpos de Lewy, la aS se encuentra principalmente fosforilada, siendo la fosforilación en la serina 129, el marcador más utilizado de aS patogénica (78–80).

**Tabla 1. Ejemplos de sinucleinopatías.** Se detallan alteraciones en distintas proteínas descritas causales de patologías neurodegenerativas

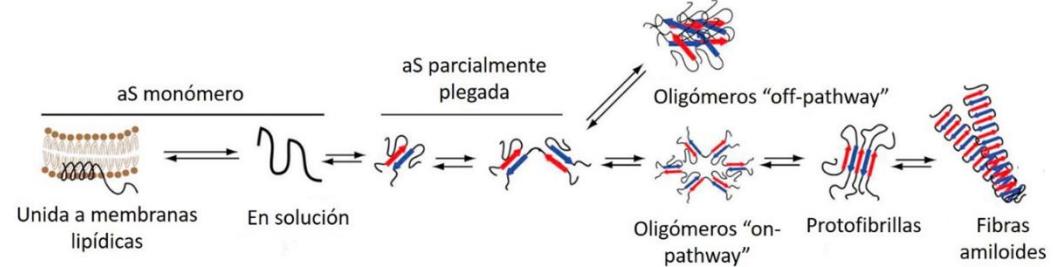
Sinucleinopatía	Proteína	Mutación	Referencia
Enfermedad de Parkinson	Alfa sinucleína	A53T	Polymeropoulos <i>et al</i> , 1997 (81)
		A30P	Kruger <i>et al</i> , 1998 (82)
		E46K	Zarranz <i>et al</i> , 2004 (83)
		H50Q	Appel-Cresswell <i>et al</i> , 2013 (84)
		G51D	Kiley <i>et al</i> , 2013 (85)
		A53E	Pasanen <i>et al</i> , 2014 (86)
		Duplicación gen SNCA	Chartier-Harlin <i>et al</i> , 2004 (87)
LRRK2		Triplicación gen SNCA	Singleton <i>et al</i> , 2003 (88)
		R1396G	Paisán-Ruiz <i>et al</i> , 2004 (89)
		N1437H	Aasly <i>et al</i> , 2010 (90)
		G2019S	Ozelius <i>et al</i> , 2006 (91)
Parkina		Deleción exón 4	Kitada <i>et al</i> , 1998 (92)
		DJ1	Bonifati <i>et al</i> , 2003 (93)
		Pink1	Valente <i>et al</i> , 2003 (94)
Demencia con cuerpos de Lewy	Alfa sinucleína		McKeith <i>et al</i> , 2003 (95)
Variante de ELA con cuerpos de Lewy	Alfa sinucleína		Suh & Checler, 2002 (96)
Atrofia sistémica múltiple	Alfa sinucleína		Burn & Jaros, 2001 (97)

La EP es la causa más frecuente de parkinsonismo y la segunda enfermedad neurodegenerativa más prevalente a nivel mundial, después de la EA, con 1 a 2 casos cada 1000 habitantes (98–101). Se caracteriza por la aparición de signos motores clásicos: bradicinesia, temblor en reposo, rigidez e inestabilidad postural. Adicionalmente,

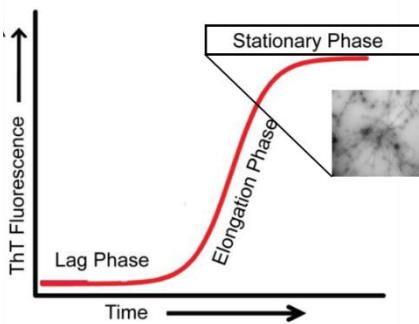
pueden aparecer otros signos no motores como demencia, depresión, disfunción autonómica, constipación, pérdida de olfato y trastornos del sueño REM (*rapid eye movement*), los cuales pueden comenzar varios años antes que los signos motores. La mayoría de los signos motores de la EP se deben a la muerte selectiva de neuronas dopaminérgicas de la *substantia nigra pars compacta* (SNpc), neuronas que intervienen en la regulación del movimiento voluntario inervando el cuerpo estriado. Actualmente no es posible detener la muerte neuronal de los pacientes con EP y por ello, los tratamientos actuales se dirigen a disminuir los síntomas y retrasar su aparición. En cuanto a la etiología de la EP, alrededor del 5 al 10% de los casos se consideran “familiares”, esto es, que existe una causa genética identificable (y dentro de estos casos, una minoría son de causa monogénica). Es importante enfatizar que las mutaciones en SNCA causantes de EP son muy raras. Mientras tanto, la mayoría de los casos de EP son considerados como “idiopáticos”, sin una causa genética (102). El diagnóstico de la EP continúa siendo un desafío médico, dado que la identificación de las lesiones intracerebrales se realiza *post mortem*, por lo cual el criterio diagnóstico es la aparición de los signos motores clásicos y la respuesta positiva al tratamiento con L-DOPA. Esto presenta dificultades dada la gran heterogeneidad en la presentación clínica de la enfermedad, así como otras enfermedades de síndrome parkinsoniano (103).

¿Cómo participa la aS en el establecimiento de las sinucleinopatías? La aS, pese a ser una proteína intrínsecamente desordenada en su forma monomérica, posee una gran variabilidad conformacional, pudiendo adoptar estructuras supramoleculares estables, principalmente fibras (aS<sub>f</sub>) y oligómeros (aS<sub>o</sub>), detallado en la figura 3 (extraída de (104).

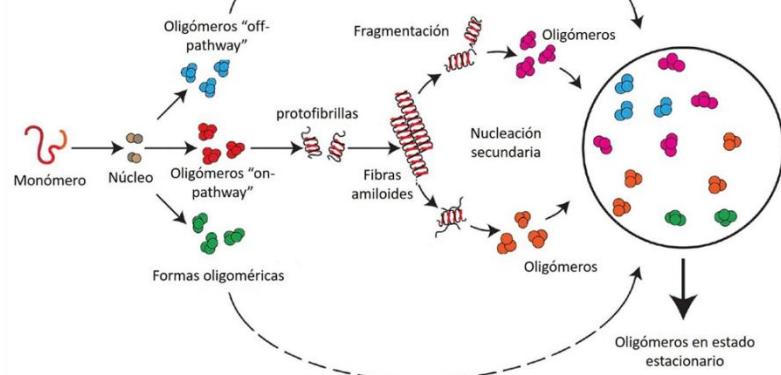
A



B



C



**Figura 3. Esquema de formación de fibras y oligómeros de aS.** A. Esquema modificado de Mehra *et al.*, 2019 (100) del proceso de nucleación de aS<sub>m</sub> hacia oligómeros *on-pathway* que se ensamblan en prototíbrillas y luego en fibras que se depositan en el espacio intracelular. B. Cinética de formación de fibras donde se distinguen las distintas fases del proceso (una fase de latencia o *lag*, una fase de elongación y una fase estacionaria). En el inserto se muestra una micrografía MET de fibras maduras formadas de aS. C. Esquema modificado de Mehra *et al.*, 2019 (104) indicando el origen de oligómeros *off-pathway*. Estos provienen de la fragmentación de fibras formadas, así como de plegamientos alternativos en el proceso de nucleación.

La agregación a estructuras fibrilares implica la transición hacia una forma insoluble, principalmente compuesta por hoja-β. El mecanismo de agregación desde el monómero de aS a fibras se ha estudiado en profundidad en modelos *in vitro* y existen algunos trabajos de revisión al respecto (105,106). En resumen, el proceso ocurre cuando el monómero se reordena formando un núcleo sobre el que se continúan agregando más monómeros (107). En la fase de elongación ocurre la formación de otras especies intermedias como oligómeros y prototíbrillas. Muchos de los resultados acerca de las especies que intervienen en la agregación son paradójicos debido a la heterogeneidad de las distintas formas de aS involucradas y de las condiciones experimentales. El proceso de formación de estas fibras puede estudiarse por medio de moléculas con afinidad hacia estructuras en hoja-β como son la tioflavina-T (Th-T) y la sal roja Congo (RC). Al interaccionar con fibras ricas en hoja-β estas moléculas cambian sus propiedades espectroscópicas pudiéndose medir en el tiempo su formación (Figura 3B).

El proceso que lleva a la formación de fibras requiere la formación previa de especies de oligómeros denominados “*on-pathway*”. Estos se forman mediante la aparición de intermediarios ricos en  $\alpha$ -hélice (108) durante la fase de elongación, previo a su reordenamiento en hoja- $\beta$ . Sin embargo, la naturaleza de los intermediarios depende en gran medida de las condiciones de agregación, siendo influenciado por la presencia de lípidos (109). Estos eventos corresponden a una nucleación primaria, donde las estructuras formadas son conocidas como “semillas de nucleación”. Al final de este proceso, las fibras formadas pueden romperse generando pequeños fragmentos que actúan como nuevas semillas (nucleación secundaria) y otros oligómeros denominados oligómeros “*off-pathway*”, estructuralmente diferentes a los primeros, e incapaces de proceder hacia la formación de fibras (105).

Dado que los cuerpos de Lewy contienen principalmente aS en forma fibrilar, se propuso inicialmente que la agregación de aS a estas estructuras estaría implicada directamente con la patogénesis de la EP y la neurotoxicidad. Sin embargo, esta hipótesis se vio desafiada debido a la existencia de variantes de EP de aparición temprana y otras variantes de EP que cursan sin cuerpos de Lewy, causadas por mutaciones en aS que enlentecen la formación de fibras (110). Por otro lado, las neuronas que se observan *post mortem* con Cuerpos de Lewy, corresponden a neuronas que han sobrevivido, mientras que el resto de las neuronas se ha degenerado. Este sesgo ha sugerido, en contraposición a la visión neurotóxica de las fibras, que la formación de cuerpos de Lewy es un mecanismo neuroprotector, que, de forma inicial intenta eliminar formas tóxicas de aS (111–113).

#### **6.1.4 Formas extracelulares de aS**

La aS se ha encontrado de forma extracelular en distintos fluidos como el líquido cefalorraquídeo (LCR) y el plasma, con una concentración media en este último de 5,6  $\mu\text{g/L}$ , con gran variabilidad entre individuos, sin correlación con el sexo, y resultados variables según edad (114,115). Sin embargo, no existe una clara correlación entre la concentración de aS en estos compartimientos y la progresión de la patología, siendo aún cuestionado el uso de aS en LCR o plasma como biomarcador temprano o predictor de la EP (116–119). En relación a esto, se están desarrollando actualmente estrategias de detección de aS extracelular en el LCR, basadas en un ensayo de formación de fibras al agregar “semillas de nucleación” a muestras de LCR o plasma (120).

La progresión histológica de la EP presenta un comportamiento denominado tipo priónico (*prion-like*) (121,122). Las primeras evidencias de este fenómeno provienen de estudios publicados por Heiko Braak, en donde se describe que la aparición de Cuerpos de Lewy en el encéfalo sigue una progresión anatomico-patológica definida. Según este modelo, los depósitos de aS comienzan en núcleos neuronales externos al SNC y se extiende al mesencéfalo y por último llega a áreas corticales, mediante una transmisión de la aS anómala célula-célula. Este modelo es capaz de explicar los signos no motores de la EP, que por lo general comienzan varios años previo al inicio de los signos motores clásicos. Sin embargo, es importante remarcar que entre el 17 y 47% de pacientes con EP, no se observa la correlación descrita por Braak entre la manifestación clínica de la enfermedad y la patología de Lewy (123,124).

Adicionalmente, otra evidencia que apunta a la propagación tipo priónica de la aS es la aparición de aS patológica en neuronas de individuos sanos trasplantadas a pacientes con EP (125–129). En el mismo sentido, la formación de agregados de aS producidos *in vitro* desde la proteína recombinante, también son capaces de producir lesiones similares a cuerpos de Lewy y la agregación de aS endógena (130–134). En las últimas décadas, el eje intestino-cerebro también ha cobrado gran relevancia, al demostrarse que la administración de agregados de aS en el epitelio intestinal produce lesiones en el SNC (135) y la vagotomía (seccionar el nervio vago que inerva el intestino) inhibe este efecto (136). Recientemente, se descubrió que la aS puede acumularse en el parénquima renal, pudiendo llegar a transmitir las formas patológicas hacia el SNC (137). Esto ha llevado al estudio en varios modelos *in vitro* e *in vivo* acerca de los mecanismos de liberación y captación de aS por las neuronas y otras células (122,138). Por ejemplo, es ya ampliamente utilizado modelos animales donde se inyectan fibras de aS preformadas (PFF, fibras de aS fragmentadas por sonicación) en una región del encéfalo y estas son encontradas en otras regiones anatómicamente conectadas, demostrando la transmisión neurona-neurona (122,139).

La transmisión neurona-neurona de aS se ha descrito como un proceso mediado por exocitosis (140), y su incorporación por endocitosis (141). Pese a que la aS no posee una secuencia de exportación, su liberación de las neuronas ha sido reportada como un mecanismo de exocitosis no convencional (independiente del sistema retículo endoplasmático y aparato de Golgi) y dependiente del ion calcio (140,142). Por otro lado, también se ha descrito como mecanismo de liberación de aS patológica mediante

exosomas (143) y nanotubos de citoexqueleto (TNT) (144,145). Otros estudios mostraron la exocitosis convencional de aS en neuronas del sistema nervioso periférico (SNP) entérico, dependiente de la actividad neuronal (146). Las diferentes formas de aS agregadas, así como la forma monomérica puede ser liberadas por exocitosis desde las células al espacio extracelular, habiéndose encontrado en el lumen de vesículas de secreción (140). La tabla 2, extraída de (147) resume varios de los mecanismos descritos.

**Tabla 2.** Mecanismos descritos de ingreso y liberación de las distintas especies de aS. Extraído de (146).

Especie de aS	Mecanismo	Referencia
Monómero	Exocitosis y difusión pasiva	(148,149)
	Exosomas	(150)
	Autofagia	(151)
Fibra	TNT	(152)
	Exosomas	(150)
	Endocitosis	(140,149,153,154)
Oligómero	Exocitosis	(149)
	Exosomas	(150)
	Endocitosis	(140,153)
	TNT	(155)

La aS extracelular puede ser degradada por metaloproteasas de la matriz extracelular o ingresar por endocitosis y/u otros mecanismos a neuronas, astrocitos y microglía vecinas. La endocitosis de aSf es capaz de generar agregados de aS intracelulares, propagando entonces la patología. Por lo tanto, los procesos de liberación e incorporación de aS por las células del SNC constituyen importantes mecanismos para la progresión y amplificación de la enfermedad, por lo que el bloqueo de dichos procesos conlleva a mejoras significativas motoras en los modelos animales de la EP (122,139).

En la patología de la EP, la aS puede afectar directamente la funcionalidad de las distintas células del SNC: neuronas, astrocitos y microglía, y estas células tienen respuestas que pueden conducir al daño neuronal y por ende a la patología.

## 6.2 MODIFICACIONES OXIDATIVAS DE AS: NITRACIÓN Y OXIDACIÓN

Dentro de las modificaciones postraduccionales identificadas que puede sufrir la aS, las modificaciones oxidativas son muy relevantes ya que tienen gran poder de

modificar la capacidad de generar agregados patológicos (156,157). Además, en los cuerpos de Lewy, la aS se ha detectado con este tipo de modificaciones, lo cual genera ciertas interrogantes cómo i) ¿cómo impactan estas modificaciones en las propiedades agregativas de la aS? ii) ¿adquieren propiedades citotóxicas las formas modificadas? iii) ¿estas modificaciones ocurren antes o después de la formación de agregados?

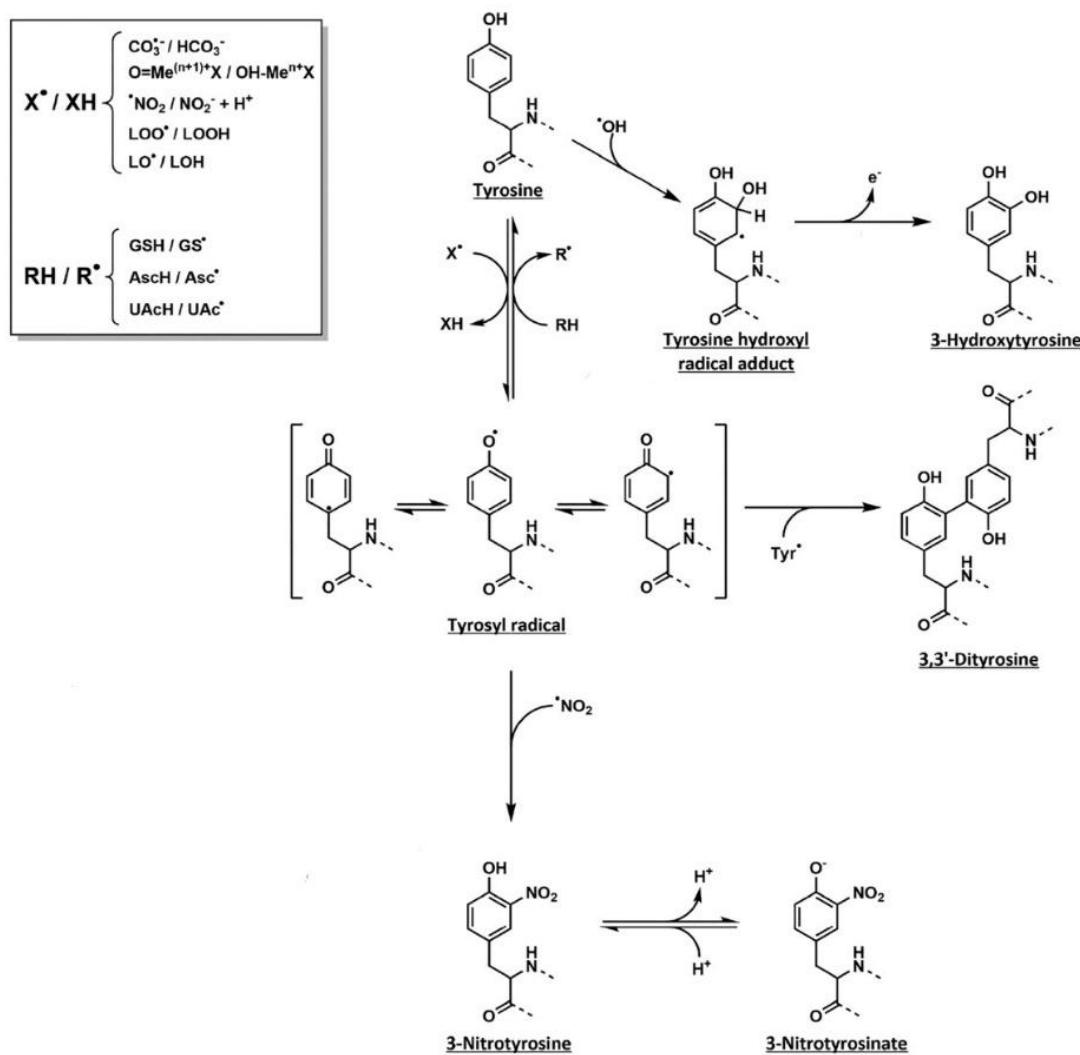
La producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) y del nitrógeno (RNS) por los sistemas enzimáticos celulares es de gran interés biomédico por su rol en determinados contextos, como por ejemplo durante la disfunción y estrés mitocondrial, estados inflamatorios y la disminución de la actividad de los sistemas antioxidantes. El estrés oxidativo es un componente que está presente en el establecimiento de varias enfermedades neurodegenerativas como las sinucleinopatías, EA o esclerosis lateral amiotrófica (ELA) (158–162). Las especies ROS y RNS se caracterizan por su capacidad de oxidar biomoléculas como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, lo que conlleva a alterar su estructura y/o función. Para las proteínas, entre los aminoácidos que pueden ser oxidados se encuentran triptófano, cisteína, histidina, metionina y tirosina (163). Este trabajo se enfocará en la nitración de tirosina y oxidación de metionina de la aS.

### **6.2.1 Nitración de tirosina**

La detección de aS nitrada en cuerpos de Lewy y modelos animales de EP se ha descrito desde hace décadas (37,164), y desde entonces se ha estudiado el impacto que tiene en las propiedades agregativas y funcionales de la aS. La nitración de tirosina es una modificación postraduccional que implica la sustitución de un hidrógeno por un grupo nitrógeno (-NO<sub>2</sub>) en la posición 3 del anillo fenólico de residuos de tirosina (Tyr), formando 3-nitrotirosina (3-NT). Esta es una reacción mediada por radicales libres que ocurre en dos pasos: i) la oxidación por un electrón del anillo fenólico con la consiguiente formación del radical tirosilo (tyr<sup>•</sup>) centrado en carbono, y ii) la reacción del radical tyr<sup>•</sup> con radical dióxido de nitrógeno (•NO<sub>2</sub>). Los oxidantes capaces de generar el radical tirosilo principalmente son el radical hidroxilo (•OH), radical carbonato (•CO<sub>3</sub><sup>-</sup>), y •NO<sub>2</sub>, así como radicales peroxilo (•LOO) (Figura 4). Por otra parte, el peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>, el anión del ácido peroxinitroso), es un agente nitrante que puede ser producido de forma endógena por reacción de radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) y •NO, producidos por enzimas NADPH oxidadas (NOX) y óxido nítrico sintasa (NOS), respectivamente. El ONOO<sup>-</sup>, mediante una química de reacciones compleja produce •NO<sub>2</sub>, y •CO<sub>3</sub><sup>-</sup> (si hay dióxido de carbono, CO<sub>2</sub>, disuelto), favoreciendo la oxidación y nitración de tirosinas. El proceso de

formación de 3-NT *in vivo* es de bajo rendimiento, ya que, la relación [3-NT]/[Tyr] es de 1 a 10 en 100000 en condiciones inflamatorias (165). Un trabajo de revisión detallado del mecanismo de nitración y nitrotirosina puede consultarse en la cita (166).

Debido a que la nitración de tirosina es una reacción radicalar, pueden formarse otros productos aparte de la 3-NT, como entrecruzamientos 3,3'-ditirosina (DiTyr) al reaccionar dos radicales tirosilo, o 3-hidroxitirosina al reaccionar un radical  $\text{Tyr}^{\bullet}$  con radical hidroxilo. La presencia de los entrecruzamientos 3,3'-ditirosina ha sido observada en condiciones de estrés nitrooxidativo, y está relacionada con la agregación de proteínas como aS y tau en EP y EA, respectivamente (37,164,167).



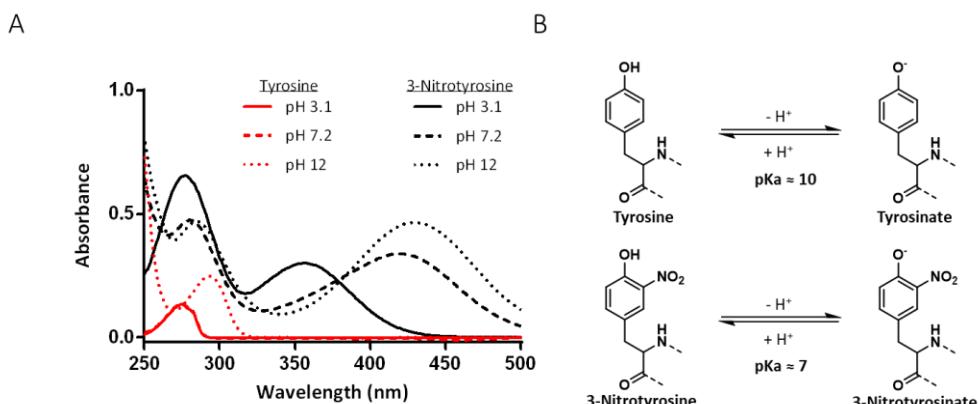
**Figura 4. Mecanismo de nitración de tirosina.** Esquema simplificado extraído de Ferrer-Sueta *et al.*, 2018 (141). Los residuos de tirosina son oxidados por un electrón formando radical  $\text{Tyr}^{\bullet}$ . Si un radical tirosilo reacciona con otro igual da lugar a entrecruzamientos 3,3'-ditirosina, pero si reacciona con radical  $\text{NO}_2^{\bullet}$  se obtiene 3-nitrotirosina, que está en equilibrio ácido base con su grupo hidroxilo desprotonado.

Por otro lado, la nitración *in vivo* de tirosina es altamente selectiva, ya que no todas las proteínas ni todas las tirosinas dentro de una misma proteína son susceptibles de nitración, dependiendo del entorno fisicoquímico en que se encuentre la tirosina. La aS presenta 4 residuos de tirosina, y como es una proteína intrínsecamente desordenada, todas ellas están expuestas al solvente y son posibles blancos de nitración. Sin embargo, un trabajo publicado por Danielson y colaboradores (168), muestra la nitración preferencial de la tirosina 39 en un modelo celular de células PC12 dopaminérgicas, no detectándose nitrados los residuos Y125, Y133 ni Y136. Sin embargo, no existe una caracterización de patrón de nitración de aS en dentro de cuerpos de Lewy.

Los efectos en la funcionalidad de una proteína al incorporar un grupo -NO<sub>2</sub> pueden ser variados y no son intuitivos de predecir. Por ejemplo, la nitración de tirosina puede producir la pérdida de función de una proteína (169,170), o en contraposición, puede producir la ganancia de función (171). Sin embargo, adjudicar un cambio de 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 incluir oxidación de otros residuos (166). Por otro lado, la formación de 3-NT implica que dicho residuo no pueda ser fosforilado y ocurra la pérdida de una cascada de fosforilación de distintas proteínas (172). Aparte de los efectos mencionados, la nitración de una proteína puede promover su degradación por el proteasoma 20S, aunque para la aS y algunas otras proteínas ocurre lo contrario (173). Además, las proteínas nitradas pueden adquirir capacidad de desencadenar una respuesta inmune al reconocer el péptido nitrado (174–178).

La nitración de proteínas es una modificación en principio irreversible, y aún no se ha encontrado una enzima que pueda reparar las proteínas nitradas. Por lo tanto, el rol de la nitrotirosina como molécula señalizadora es aún, un área de debate. La pérdida de nitrotirosina *in cellula* puede deberse fundamentalmente a dos mecanismos: i) la degradación proteasomal de proteínas nitradas, y ii) la reducción de la 3-NT a 3-aminotirosina, reacción que puede ser llevada a cabo por varios componentes celulares y reductores de bajo peso molecular (166).

Desde el punto de vista fisicoquímico, la incorporación del grupo nitro en el anillo fenólico de la tirosina disminuye su constante de acidez ( $pK_a$ ) aproximadamente 3 unidades, produciendo una mayor cantidad de fenolato a pH fisiológico. Por otro lado, las propiedades espectrales también se ven modificadas al añadirse un grupo nitro. Los residuos de tirosina son ampliamente utilizados por su absorción en la región ultravioleta (UV)-visible, a 275 nm, siendo esta propiedad dependiente del estado de protonación. Al ocurrir la nitración, aparece un máximo de absorción, también sensible al pH, a 428 nm en pH básico, y a 360 en pH ácido, mostrando un punto isosbético a 381 nm ( $\epsilon_{381} = 2200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). Adicionalmente, el  $\epsilon_{275}$  aumenta considerablemente de 1360 a 4000  $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , mientras que pierde capacidad de emitir fluorescencia (179,180). La figura 5 muestra los cambios espectrales de la 3-nitrotirosina y el equilibrio ácido-base, extraído y adaptado de (166) Adicionalmente, el grupo nitro es un grupo de gran tamaño, que, en un ambiente proteico puede ejercer importantes restricciones estéricas para su correcto plegamiento, así como para la interacción con otras proteínas o sustratos.



**Figura 5. Características espectrales de tirosina y 3-NT.** Esquema extraído de Ferrer-Sueta *et al.*, 2018 (141). A. Se muestran los espectros de absorción UV-visible de 0,1 mM. de aminoácidos libres tirosina y 3-nitrotirosina a distintos pH en solución buffer fosfato de sodio 50 mM. B. Equilibrios ácido base para tirosina y nitrotirosina.

Los posibles mecanismos que producen 3-NT *in vivo* son diversos, entre ellos es posible mencionar al peroxinitrito, como se describió anteriormente producido por las enzimas NOS y NOX. Sin embargo, existen, además, mecanismos independientes de  $\text{ONOO}^-$ , tales como dependientes de enzimas hemoperoxidasa. En este sistema, se forman oxidantes por un electrón cuando reacciona peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) con la peroxidasa, capaces de formar  $\text{Tyr}^\bullet$  y  $\bullet\text{NO}_2$ . La mieloperoxidasa y peroxidasa de eosinófilo son las enzimas principales inducidas durante un proceso inflamatorio, y han

sido caracterizadas como la principal fuente de 3-NT en estos procesos. Por otro lado, en medio ácido (como en la secreción gástrica) el ácido nitroso (proveniente de la protonación de nitrito incorporado por la dieta) se descompone fácilmente en  $\bullet\text{NO}$  y  $\bullet\text{NO}_2$ , ambos capaces de generar 3-NT (181).

Desde el punto de vista experimental, las formas de obtener 3-NT más utilizadas *in vitro*, corresponden a utilizar hemoperoxidases y  $\text{H}_2\text{O}_2$ , nitrito en medio ácido, peroxinitrito, y el agente químico tetranitrometano (TNM). Sin embargo, desde la química inorgánica, existen otro tipo de estrategias y compuestos capaces de donar  $\bullet\text{NO}_2$  y nitrar diferentes moléculas fenólicas. El uso de estos compuestos en modelos biológicos no es del todo sencillo, dado su alta reactividad y/o toxicidad. Por ejemplo, moléculas con enlaces nitramina ( $\text{N}-\text{NO}_2$ ) son capaces de generar nitración de varios compuestos aromáticos (182). Dentro de estos agentes, recientemente fue publicada la síntesis y caracterización del 5-metil-1,4-dinitro-1*H*-imidazol (DNI) (183), el cual puede descomponerse en presencia de luz UV y liberar  $\bullet\text{NO}_2$  capaz de nitrar residuos de tirosina de aS de forma más selectiva que el  $\text{ONOO}^-$  (184).

### 6.2.2 Oxidación de metionina

La metionina es un aminoácido con un grupo tioéter que puede oxidarse a metionina sulfóxido (MetO) por varios oxidantes como  $\text{ONOO}^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  o anión hipoclorito ( $\text{OCl}^-$ ). Esta modificación también puede alterar la estructura y/o función de las proteínas, pero a diferencia de la nitración, esta es una modificación reversible. La formación de MetO genera una mezcla de los enantiómeros (S)-MetO y (R)-MetO, que pueden ser sustrato de las enzimas metionina sulfóxido reductasa A (MsrA) y B (MsrB), respectivamente, utilizando el sistema dependiente de tiorredoxina (185).

Se ha descrito que la formación de MetO es capaz de estabilizar oligómeros de aS e inhibir la formación de fibras, así como de impedir la interacción con vesículas sinápticas (186). En este sentido, la deficiencia de MsrA se asocia con citotoxicidad mediada por aS, presuntamente al haber mayor cantidad de esta modificación. Adicionalmente, la estimulación del sistema MsrA tiene un impacto positivo en prevenir signos de la EP en modelos animales (187). Estas evidencias apuntan a que la formación de MetO tiene un impacto relevante en los mecanismos patológicos en los que interviene la aS.

La aS cuenta con 4 residuos de metionina en las posiciones 1, 5, 116 y 127, pudiendo todas ellas ser oxidados *in vitro* a MetO (36). Sin embargo, a pesar de que todos ellos son susceptibles de ser oxidados, las enzimas MsrA y MsrB no son capaces de reducir las metioninas localizadas en el extremo C-terminal, M116 y M127.

En presencia de oxidantes fuertes, los residuos de metionina pueden oxidarse de forma irreversible a metionina sulfona. Esta oxidación se ha encontrado en pacientes con EP o EA, en algunas proteínas relacionadas como DJ-1 (188).

### **6.3 RESPUESTA MICROGLIAL A LAS DISTINTAS CONFORMACIONES DE AS**

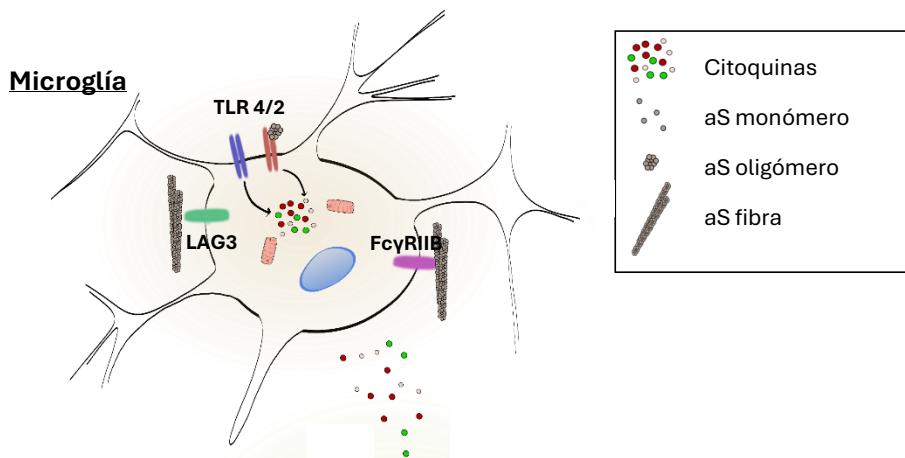
La asociación entre la enfermedad de Parkinson e inflamación proviene de evidencias genéticas y citológicas, dentro de las cuales es posible mencionar múltiples polimorfismos nucleotídicos asociados con EP en genes responsables de la respuesta inmune, y la presencia en la SNpc de microglía activa que expresan HLA-DR<sup>+</sup>, una glicoproteína del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase II (189–191). La inflamación dentro del SNC está principalmente mediada por las células de microglía, células que, además, se encuentran en gran número dentro de la SNpc y el núcleo estriado. La activación de estas células produce un aumento en la secreción de moléculas señalizadoras proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral α (TNFα), interleuquina (IL)-1β, factor de crecimiento transformante β (TGFβ) e IL-6, así como la producción de ROS (192,193). Adicionalmente, la activación microglial se ha definido históricamente por su transición morfológica hacia una forma ameboide. Sin embargo, hoy se acepta que existe un espectro fenotípico continuo de microglía (194).

Varios modelos celulares y animales muestran evidencias a favor de la respuesta inmune como un componente clave en el desarrollo de la neurodegeneración, al mostrar una reducción de la muerte neuronal y en la aparición de signos motores al utilizar inhibidores de la respuesta inmune. Por ejemplo, en modelos animales la activación microglial inducida con lipopolisacárido (LPS) aumenta los marcadores de patología como aS fosforilada en la serina 129, muerte neuronal y aparición de los déficits motores característicos. En cambio, la administración previa de inhibidores de activación microglial previenen estos efectos (195,196). En otro estudio utilizando la línea derivada de microglía BV-2, así como ratones que sobre-expresan aS, la aS inhibe la autofagia microglial mediante activación de receptor TLR4, lo que llevaría a una mayor acumulación de especies neurotóxicas de aS (197).

En cuanto a los efectos de las diferentes especies agregadas de aS en la activación de microglía, se ha reportado que las especies oligoméricas producen una mayor activación de estas células tanto *in vitro* como *in vivo*, predominantemente por medio de la activación de receptores tipo toll (TLR) 2, aumentando la expresión de genes pro-inflamatorios y la producción de mediadores como IL-6 y TNF $\alpha$  (198). En el mismo sentido, el uso de ratones *knock-out* para TLR2 no muestran dicho efecto, lo que apoya la intervención de este receptor.

Por otro lado, existe evidencia de la activación de la inmunidad humoral y adaptativa al observarse linfocitos T CD4 $^{+}$  y CD8 $^{+}$  presentes en la SNpc (199), y anticuerpos contra aS en LCR (200), siendo que los linfocitos T pueden reconocer péptidos derivados de aS (201). Hasta ahora, este conjunto de evidencias muestra una conexión importante entre aS y la respuesta inmune.

Sin embargo, el rol de las células de microglía únicamente como promotoras de neurodegeneración se ve desafiado, ya que *in vivo* la microglía puede actuar de forma neuroprotectora al eliminar las formas patológicas de aS, así como neuronas con agregados proteicos intracelulares de aS. Adicionalmente, las células de microglía pueden reponer mitocondrias sanas a las neuronas mediante nanotubos de citoesqueleto (202). Por lo tanto, los efectos de la microglía son diversos y dependen de la especie de aS involucrada.



**Figura 6. Esquema de interacción de aS en distintas conformaciones con células de microglía.** Se esquematizan células de microglía, así como las distintas conformaciones de aS. Se detallan diferentes componentes de membrana que interactúan con aS extracelular. El esquema también muestra procesos de liberación de citoquinas (a y b), la pérdida de función trófica y ganancia de función neurotóxica de astrocitos (c) y deficiencia en la mielinización (d). Esquema adaptado de Chavarría *et al.*, 2023 (179).

Existen varios receptores reportados que interaccionan con diferentes especies de agregadas de aS presentes en microglía (así como en otros tipos celulares). A continuación, se describen algunos de estos receptores de membrana descritos presentes en microglía que interaccionan con aS en distintas conformaciones y permiten el ingreso al interior celular. Adicionalmente, se resumen en la figura 6, extraída de (203).

#### **6.3.1 Gen de activación linfocitario 3 (LAG3)**

LAG3 es una proteína miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas que se une a las moléculas del MHC-II y reprime la respuesta inflamatoria inhibiendo la activación de linfocitos T (204,205), por lo que es un punto de control o *check-point* inmune. Su expresión está asociada principalmente a células T, células B, células *natural killers* (NK), neuronas y células de microglía (206). Existe, además, una fracción de LAG3 soluble, producida por proteólisis de la proteína unida a membrana. Estructuralmente, LAG3 presenta 4 dominios extracelulares, D1 a D4, siendo los dominios D1 y D2 importantes para la interacción con MHC-II.

LAG3 se une a las PFF de aS de forma específica y esta unión permite su ingreso al interior de neuronas en cultivo (154,207). Adicionalmente, en cultivo de neuronas corticales y modelos animales de ratones *knock down* para LAG3, se disminuye la propagación de especies patológicas de aS y la formación de cuerpos de Lewy. Esto se realizó tanto para la forma salvaje como mutantes asociadas a inicio temprano de EP como la variante A53T. De igual modo, estos estudios se han realizado con neuronas dopaminérgicas humanas mostrando la relevancia de LAG3 en modelos humanos de la enfermedad (208). La incorporación de aS<sub>f</sub> al citoplasma neuronal mediante la interacción con LAG3 es un proceso de endocitosis dependiente de clatrina, dado la colocalización de aS con marcadores endosomales como Rab5 y Rab7 (154).

En los últimos años se han publicado varios estudios que relacionan la expresión de LAG3 con la EP y otras sinucleinopatías, lo que apoya la evidencia acerca la interacción entre aS<sub>f</sub> y LAG3. Por ejemplo, se ha encontrado una asociación espacial entre la expresión de LAG3 y la degeneración neuronal, lo que indica que la presencia de esta proteína podría ser importante, en parte, para el establecimiento de la EP una vez iniciada (209). Por otro lado, se han reportado alelos de los genes codificantes de LAG3 asociados al riesgo de EP (210,211).

La especificidad de LAG3 por las aS<sub>f</sub> se debe a una mayor exposición de cargas negativas del extremo C-terminal en las aS<sub>f</sub> respecto al monómero, principalmente por los residuos 118 a 140 (212). Este extremo interacciona con el dominio D1 de LAG3, el cual presenta una superficie cargada positivamente. En cambio, el monómero presenta interacciones intramoleculares que neutralizan la carga negativa mediante puentes salinos con el extremo N-terminal (212,213).

Existe aún discusión acerca si LAG3 se expresa en neuronas, dado un estudio publicado que afirma que esta proteína no es detectable en neuronas murinas ni humanas, y por conseciente, no está involucrada en la progresión de las sinucleinopatías (214). Sin embargo, actualmente existe mayor evidencia a favor de la expresión de LAG3 en neuronas, dado estudios de microscopía y análisis de hibridización *in situ* que, demuestran su expresión en neuronas, aunque a un nivel bajo (215). Adicionalmente, la expresión de LAG3 puede ser inducida en cerebro por estímulos inflamatorios (216). Dentro del SNC, LAG3 también se expresa en células microglía y endotelio capilar, lo que complejiza aún más la progresión de la enfermedad (206,217,218). Sin embargo, en un estudio donde mostró la contribución de LAG3 a la propagación célula-célula de la aS, no se observó expresión de LAG3 en microglía, por lo que su contribución en la patología *in vivo* aún se mantiene en estudio.

Sumando estas evidencias, LAG3 se ha convertido en un nuevo blanco terapéutico mediante el uso de anticuerpos y otros fármacos que impidan la unión de LAG3 con fibras de aS (208,219). Estas estrategias incluyeron el uso de anticuerpos que contra LAG3, así como contra el extremo C-terminal de aS, el cual se une tanto a la forma monomérica como fibrilar.

#### **6.3.2 Receptor tipo Toll (TLR)**

Los receptores tipo Toll (TLR) son una familia de receptores con funciones en el sistema inmune que se encargan de reconocer patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) y/o patrones moleculares asociados a daño (DAMPs). Estructuralmente, son proteínas transmembrana clase I, con un dominio extracelular N-terminal, y un dominio intracelular conservado que interacciona con proteínas adaptadoras (220–222).

Dentro del SNC, distintos tipos celulares expresan varios receptores TLR. Por ejemplo, microglía expresa todos los miembros de la familia TLR (excepto TLR10),

siendo los que presentan mayor expresión TLR1 a 4 (223). Adicionalmente, en microglía la expresión basal es baja pero frente a estímulos de activación su expresión aumenta rápidamente (223). En astrocitos humanos se expresan TLR1 a 5 y TLR9, siendo TLR3 el más abundante y su expresión es también inducible por estímulos inflamatorios, aunque con una cinética más lenta que las microglía (223,224). Las neuronas humanas también expresan todos los miembros de TLR (225), aunque presentan una variante de la proteína adaptadora MyD88, actuando independientemente del factor NFκβ (226). En tal sentido se ha detectado un aumento en diversas citoquinas como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), la interleuquina (IL)-1 $\beta$ , IL-2, IL-4 e IL-6 en el LCR y plasma de pacientes con EP (227–230), característicos de la activación de la vía mediada por los receptores TLR.

Distintos tipos de TLR se han asociado a EP, dentro de ellos TLR2, TLR4 y TLR9. Estos receptores tendrían relevancia en la patología ya que se ha visto su expresión aumentada en pacientes con EP en microglía, astrocitos (231), neuronas y células periféricas (231–233), así como en cultivos celulares tratados con aS<sub>f</sub> (234). Al igual que LAG3, se han reportado polimorfismos de TLR2 asociados a un mayor riesgo de EP (235).

En cuanto si la aS es capaz de actuar como agonista de TLR2, existen evidencias contradictorias acerca cual es la conformación de aS que interacciona, ya que se ha visto que: i) ambas aS<sub>m</sub> y aS<sub>f</sub> activan este receptor (236), ii) únicamente aS<sub>f</sub> activa TLR2 (237,238), iii) la forma aS<sub>o</sub> promueve la activación del heterodímero TLR1/2 (239) o el homodímero TLR2 (198). Como mecanismo de acción, se ha propuesto que la activación de TLR2 neuronal inhibe la autofagia lo que llevaría a acumulación de aS patológica, y por ende, a la muerte neuronal (240). El uso de anticuerpos contra TLR2 o pequeñas moléculas antagonistas de este receptor logra disminuir la propagación de aS y prevenir el fenotipo neuroinflamatorio (241,242), como la producción de IL-6, IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ , así como la disminuir la activación del factor NFκβ. El grupo de Wang y colaboradores, analizó la capacidad de TLR2 de permitir el ingreso de aS al interior de las células de microglía BV-2. Este trabajo encontró que la interacción de aS<sub>o</sub> en exosomas derivados de pacientes con EP con TLR2 permite su ingreso en estas células (243). Por otro lado, otro estudio encontró que la activación de TLR2 permite un ingreso más rápido de aS<sub>f</sub> en neuronas, astrocitos y microglía, así como un enlentecimiento en su degradación en estas células, promoviendo su acumulación intracelular (244).

Por otro lado, con respecto a TLR4 y su contribución con la EP, la evidencia ha sido contradictoria, mostrando efectos neuroprotectores como neurotóxicos. En primer lugar, su expresión se ha visto aumentada en distintas regiones del cerebro, particularmente en la SNpc (231,245–247). Mariucci *et al.*, así como el grupo de Perez-Pardo encontraron que la ausencia de TLR4 reducía la degeneración de neuronas dopaminérgicas (248–250), pero aumentaba la expresión de aS. Sin embargo, atribuyen que la menor degeneración neuronal se debe a una menor neuroinflamación inducida por TLR4, ausente en este modelo. En contraste, en otros estudios, ratones *knock-out* para TLR4 que sobreexpresan aS, se ve aumentada la muerte de neuronas dopaminérgicas así como alterada la fagocitosis de aS extracelular por células BV-2 (251,252). Estas inconsistencias en la literatura científica pueden explicarse debido a que, en una etapa aguda, TLR4 permite la fagocitosis de aS, liberación de citoquinas proinflamatorias necesaria para una mayor fagocitosis y *clearance* de aS, retardando la muerte neuronal, mientras que con una estimulación crónica de TLR4 resulta en un estado proinflamatorio que puede llevar al daño neuronal.

La fagocitosis de aS por microglía es dependiente de TLR4, aunque se desconoce si existe interacción directa entre ambas proteínas. Por otro lado en astrocitos la fagocitosis de aS es independiente de este receptor (253,254). Se ha reportado, además, que TLR2 y TLR4 aumentan su expresión en cultivos derivados de neuroblastoma SH-SY5Y tratadas con microglía activada. Este efecto, aumenta la señalización de las vías TLR e inhibe la autofagia, generando la formación de depósitos de aS intracelulares que promueven la patología (255).

Por último, existe escasa evidencia que incorpora a TLR9 como otro posible receptor involucrado en la patogénesis de EP (256,257), así como TLR1 (234), TLR3 (258) y TLR7 (234).

La implicancia de los receptores TLR en la patogénesis de EP, los hace interesantes candidatos para la aplicación de nuevas estrategias terapéuticas que modifiquen la progresión de la enfermedad.

#### **6.3.3 FCyRIIB**

Este receptor es expresado en el sistema inmune donde participa en la estimulación mediada citoquinas y en la fagocitosis (259–261). También es expresado en neuronas y se encontró que actúa como receptor de aS<sub>f</sub> (262), permitiendo la propagación

célula a célula de aS y formación de cuerpos de Lewy en cultivos celulares de neuroblastoma. Por otro lado, en microglía, donde también es expresado este receptor, las aS<sub>f</sub> inhiben la fagocitosis y por tanto el *clearance* de aS extracelular (263). Estos dos mecanismos podrían aumentar la propagación de la enfermedad.

Recientemente, nuestro grupo de trabajo ha publicado un trabajo de revisión acerca de los receptores de aS extracelular donde se exploran los distintos tipos de receptores descritos aquí (203).

## 6.4 EFECTOS CELULARES MEDIADOS POR ESPECIES AGREGADAS DE ALFA

### SINUCLEÍNA

La interacción e internalización de aS exógena en sus diferentes especies agregadas produce diferentes efectos funcionales en las células. De estos efectos, dos muy importantes son los producidos a nivel mitocondrial y lisosomal.

Los primeros indicios que relacionaban la EP con la función mitocondrial se observaron hace casi 50 años, cuando se describieron compuestos tóxicos para la actividad mitocondrial que producen parkinsonismo (264), lo que significó un gran avance para el desarrollo de modelos animales de la EP. Entre estos compuestos, es de destacar las moléculas 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), la cual se descubrió en la década de 1980 como subproducto en la síntesis de heroína casera (265), así como el paraquat y la rotenona, dos pesticidas ampliamente utilizados. Su efecto tóxico radica en la inhibición del complejo I de la cadena transportadora de electrones, y por lo tanto, las consecuencias a nivel bioquímico son la depleción de ATP y una mayor producción de especies oxidantes y ROS (266). En favor de la hipótesis de disfunción mitocondrial vinculada a EP, en tejidos *post mortem* la actividad del complejo I mitocondrial se encuentra disminuida en pacientes con diagnóstico de EP (267). Así mismo, el metabolismo de la dopamina y la presencia de este NT en las neuronas dopaminérgicas es de gran interés dado su capacidad de producir ROS, lo que explicaría una mayor susceptibilidad de estas neuronas al daño oxidativo y estímulos nocivos (268).

La incubación de astrocitos primarios con aS<sub>0</sub> impacta negativamente sobre varios parámetros de respiración mitocondrial, tales como el índice de acoplamiento, la capacidad respiratoria de reserva y la relación de control respiratorio, mientras que el tratamiento con aS<sub>m</sub> y aS<sub>f</sub> solo produce una disminución moderada de la capacidad respiratoria de reserva (269). Sin embargo, el tratamiento con todas las conformaciones

de aS disminuye la cantidad y longitud de mitocondrias, aumentando también la producción de especies oxidantes. En la tabla 2 se resume algunos de los efectos observados en cultivos de astrocitos con las distintas conformaciones de aS, extraída de (269).

**Tabla 3. Efectos de distintas conformaciones en astrocitos primarios.** Tabla adaptada de Chavarría *et al.*, 2018 (246), representando efectos en función mitocondrial y producción de especies oxidantes respecto a la condición control. RCR: Relación control respiratorio. ECAR: velocidad de acidificación extracelular.

Efecto	Monómero	Oligómero	Fibra
Función mitocondrial			
Disminución RCR	-	++	-
Aumento ECAR	-	+++	++
↓ Longitud mitocondrial	++	++	++
↓ Número mitocondrias	+	+	+
Formación especies oxidantes			
Oxidación de sonda DCFH <sub>2</sub>	++	+++	++
Formación de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-	+++	-

La aS se ha encontrado localizada en el interior mitocondrial y en la membrana mitocondrial donde interacciona con componentes mitocondriales como proteínas del complejo I (270–273). Recientemente, por estudios de RMN, se ha reportado que la forma monomérica de aS se encuentra en el interior de mitocondrias, donde interacciona con ATP sintasa y la proteína AK2, implicadas en el metabolismo energético (274). Sin embargo, no se observó esta interacción para las aS<sub>f</sub>, por lo que la interacción de mitocondrias con las distintas conformaciones aún no se encuentra estudiada en profundidad.

Existen diversas mutaciones genéticas asociadas a EP de inicio temprano, que se localizan en genes codificantes para proteínas involucradas en la función mitocondrial. Estos genes descritos son codificantes para las proteínas PINK-1, Parkina y DJ-1 (275). Las proteínas Pink-1 y Parkina son importantes reguladoras de mitofagia y degradación mitocondrial, así como del balance entre fusión y fisión de las mitocondrias (276–278). Cuando las mitocondrias se dañan, disminuye el potencial transmembrana y Pink-1 se acumula del lado citosólico. En esa situación, la posterior fosforilación de Pink en la membrana mitocondrial externa, ahora en su forma activa, comienza a reclutar la proteína Parkina, una E3-ubiquitina ligasa que cataliza la ubiquitinación de componentes mitocondriales. Esto desencadena la formación de autolisomas que degradan proteínas

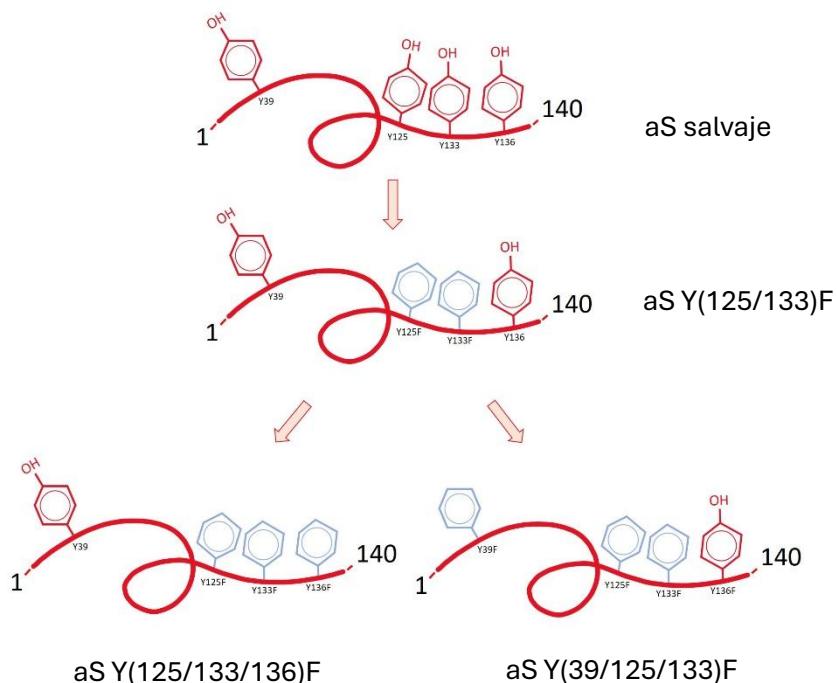
en mal funcionamiento, así como proteínas implicadas en la fisión mitocondrial como DRP1 y mitofusinas 1 y 2 (279).

Por otro lado, la función de la vía lisosomal se encuentra estrechamente vinculada a la función mitocondrial, ya que los compartimentos membranosos de ambos organelos son estructuras dinámicas que se comunican (280). Los primeros indicios de una asociación entre EP y los lisosomas, provienen de observaciones de algunos pacientes con enfermedad de Gaucher (GD), una enfermedad relacionada con deficiencias en la función lisosomal, que presentaban parkinsonismo (281). Esta enfermedad se debe a una mutación en una enzima hidroxilasa lisosomal, la  $\beta$ -glucocerebrosidasa, codificada por el gen *GBA1*. Otros estudios más recientes, reportan que esta mutación está presente en varios pacientes con EP idiopática (282). Las hipótesis sobre las cuales dicha mutación en *GBA1* están asociadas a EP se basa en una pérdida de función lisosomal, lo que disminuye los procesos de autofagia y degradación de proteínas, promoviendo la acumulación y agregación de aS intracelular (283,284).

En el vínculo que existe entre las mitocondrias y los lisosomas, también se encuentra la homeostasis del ion calcio, ya que para ambos organelos es un ion muy importante. Se ha reportado que la interacción con aS con mitocondrias en modelos sobre-expresantes de aS, disminuye la producción de ATP mitocondrial y existe una alteración en la homeostasis de calcio al interaccionar con proteínas involucradas en los contactos entre mitocondrias y el retículo endoplásmico (285).

## 7 ANTECEDENTES

El grupo de trabajo cuenta con varias décadas dedicadas al estudio de modificaciones oxidativas de proteínas, entre ellas la aS. En este sentido, se ha reportado la acumulación de aS nitrada en cuerpos de Lewy de pacientes diagnosticados con EP (37), así como en modelos animales de EP (286), la formación de dímeros DiTyr (164) y la interacción con metales como Cu<sup>2+</sup> (287). Más recientemente, se ha estudiado el efecto de la nitración de tirosina en la formación de fibras de aS. Esto se ha realizado utilizando peroxinitrito como agente nitrante (288) y mutantes de aS con solo un residuo de tirosina en su secuencia (figura 7) para evaluar el efecto de la nitración sitio específica.



**Figura 7. Esquema de obtención de mutantes de aS Y→F.** En trabajos previos del grupo se generaron mutantes de aS con un residuo de tirosina para evaluar el impacto de la nitración sitio específica. A partir de la secuencia salvaje se mutaron secuencialmente los residuos de tirosina (rojo) por residuos de fenilalanina (azul) mediante mutagénesis dirigida. Figura extraída de tesis de grado de Ivagnes, 2020.

La nitración por peroxinitrito de estos mutantes inhibe la generación de fibras, efecto también visto por otros grupos de trabajo (173,179,289). Sin embargo, luego del tratamiento con peroxinitrito, también se observó la oxidación de metionina (288). Por lo tanto, aunque la generación de mutantes en tirosina es una aproximación metodológica a la pregunta sobre el rol de cada residuo de tirosina, es necesario continuar la caracterización de modificaciones producidas por el sistema de nitración, para ello se ha

propuesto la utilización de un mutante de aS sin tirosinas en su secuencia, el cual al ser tratado con ONOO<sup>-</sup> podría servir de control de modificaciones que no corresponden a la nitración. Adicionalmente, el uso de sistemas de nitración más selectivos también puede ser una solución a esta limitante. Actualmente, se encuentra trabajando en abordajes de nitración con mayor selectividad, y pueden ser utilizados como herramientas para producir aS nitrada de forma selectiva y sitio-específica al utilizar los mutantes generados. Además, no se ha estudiado el mecanismo por el cual la nitración impactaría en la formación de fibras, y estudiar esto desde distintas posiciones de 3-NT en la secuencia puede aportar evidencias al mecanismo de agregación.

Por otro lado, otros estudios del grupo de trabajo acerca de la interacción de las distintas conformaciones de aS sobre cultivos primarios de astrocitos y neuronas han mostrado que tanto fibras como oligómeros producen efectos tóxicos sobre estos cultivos celulares. Por ejemplo, todas las especies de aS (monómero, fibra y oligómero) producen un aumento en la expresión de ARN mensajero codificante de citoquinas proinflamatorias por parte de los astrocitos como TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , siendo las formas fibrilares quienes producen un mayor aumento. Por otro lado, los oligómeros tienen un mayor impacto de la función mitocondrial (269), aumentando la velocidad de acidificación extracelular y disminuyendo la capacidad respiratoria de reserva y el índice de acoplamiento. Sin embargo, neuronas incubadas con medios condicionados de astrocitos tratados previamente con las distintas formas de aS no mostraron una reducción de su viabilidad, por lo que es necesario un contacto directo entre ambos tipos celulares para explicar la pérdida de soporte trófico (269). En base a esta línea de investigación, nuestro grupo de trabajo ha publicado un artículo de revisión acerca la internalización de las distintas especies de aS en varios tipos celulares del SNC (203).

Por todos estos elementos es importante describir en forma comparativa las vías de señalización de las distintas conformaciones de aS, dado que el fenotipo inducido por cada una de las especies de aS es diferente. Por tanto, estudiar los mecanismos que intervienen en la acción de las distintas conformaciones de la aS extracelular tiene un importante potencial biomédico por la posibilidad de inhibir la activación de la glía. Sin embargo, para estudiar las formas de interacción y/o las vías de señalización de monómeros, oligómeros y fibras en cultivos celulares es necesario poder medir esta interacción. Para ello, existen diversos abordajes, siendo uno de ellos el uso de aS

marcada con una molécula fluorescente, lo que permite estudiar por microscopía o citometría de flujo la fluorescencia debida a la internalización de aS (290,291).

## **8 HIPÓTESIS DE TRABAJO**

---

La evidencia actual acerca las modificaciones oxidativas de aS, así como sobre los efectos de las diferentes formas agregadas en diferentes tipos celulares aún continúa en crecimiento. Esta evidencia indica que la nitración de tirosina en aS es una modificación importante a nivel patológico, siendo capaz de alterar las propiedades agregativas de aS. Adicionalmente, las distintas formas agregadas tienen diferentes efectos en cultivos celulares y se han descrito receptores con alta especificidad para algunas de ellas. En este sentido, nuestra hipótesis de trabajo plantea que la nitración de aS es una modificación que ocasiona la pérdida de la capacidad de formar fibras, favoreciendo la formación de oligómeros, y que estas especies pueden ser incorporadas por mecanismos celulares diferentes.

## **9 OBJETIVOS**

---

### **Objetivo general**

Estudiar y caracterizar las modificaciones oxidativas de aS, evaluando el impacto en su capacidad de formar fibras y oligómeros, así como estudiar los mecanismos de interacción de sus especies agregadas en cultivos celulares.

### **Objetivos específicos**

1. Caracterizar el efecto de la nitración en residuos de tirosina en las propiedades de agregación de aS utilizando dos sistemas de nitración: peroxinitrito y 5-metil-1,4-dinitroimidazol.
2. Generar aS monomérica y sus formas agregadas marcadas con una molécula fluorescente. Caracterizar las especies generadas comparándolas contra las formas sin marcar.
3. Estudiar la interacción de las distintas especies de aS con cultivos celulares. Analizar la presencia de aS intracelular y caracterizar alteraciones funcionales causadas por incubación con las distintas formas de aS.

## 10 MATERIALES Y MÉTODOS

---

### Reactivos

Todos los reactivos fueron obtenidos en Sigma-Aldrich (Merk) a menos se indique lo contrario. El peroxinitrito fue sintetizado a partir de nitrito de sodio ( $\text{NaNO}_2$ ) y  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Mallinckrodt Chemicals) en medio ácido, seguida de inmediata alcalinización con hidróxido de sodio ( $\text{NaOH}$ ), descrito previamente. Los stocks de peroxinitrito se almacenaron en  $\text{NaOH}$  a  $-80^\circ\text{C}$  con dióxido de manganeso ( $\text{MnO}_2$ ) y se midió su concentración previamente a su uso por espectrometría UV-vis a 302 nm ( $\epsilon_{302} = 1670 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ).

El agente nitrante DNI fue sintetizado a partir de 4-metil-5-nitro-1*H*-imidazol (Aaron Chemicals LLC) en ácido acético glacial con ácido nítrico concentrado, como se describió previamente (184).

Las proteínas aS salvaje y mutantes se purificaron en el laboratorio a partir de plásmidos obtenidos previamente.

### Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para mutagénesis

Para obtener la forma mutante de aS Y(39/125/133/136)F (abreviado 4YF por tener los cuatro residuos de tirosina mutados por fenilalanina), se utilizó el vector pET-30 con resistencia al antibiótico kanamicina, en el cual se encuentra clonado el gen de aS. Se partió de la secuencia mutante con un solo residuo de tirosina, aS Y(125/133/136)F (abreviado Y39, al solo poseer el residuo tirosina en la posición 39).

La mutagénesis dirigida se realizó utilizando el kit “QuikChange II Site-Directed Mutagenesis” (Agilent Technologies), siguiendo las indicaciones del fabricante y la enzima polimerasa PfuTurbo, que presenta una alta fidelidad de replicación. Los cebadores utilizados fueron diseñados utilizando los software Primer Blast (NCBI) y Oligo AnalyzerTM Tool (Integrated DNA technologies), siguiendo las especificaciones del *kit* de mutagénesis. Los cebadores se diseñaron entre 25-45 pb, con una temperatura de *melting* ( $T_m$ )  $\geq 78^\circ\text{C}$ , con la mutación ubicada en la mitad de la secuencia. Adicionalmente, se seleccionaron aquellos que minimizaran la formación de dímeros y estructuras secundarias. Como control negativo de cada reacción se realizó una reacción en ausencia de molde ADN. Las condiciones de PCR y cebadores utilizados se esquematizan en la siguiente tabla:

Desnaturalización inicial	2 minutos	95°C
Desnaturalización	30 segundos	95°C
Hibridación de cebadores	30 segundos	T <sub>M</sub> – 5 °C
Elongación	6 minutos	72°C
Terminación	10 minutos	72°C
Cebador <i>Forward</i>	5'-GGGTGTTCTCTTGTAGGCTCCA-3'	
Cebador <i>Reverse</i>	5'-TGGAGCCTACAAAGAGAACACCC-3'	

Previo a la transformación, el producto de PCR fue tratado con 0,5 µL de la enzima endonucleasa *Dpn*-1, digiriendo el ADN molde. Luego de agregar la enzima, se incubó la reacción durante 60 minutos con agitación a 300 rpm y a 37°C.

### 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 extracciones de ADN plasmídico obtenidas fueron cuantificadas en un espectrofotómetro (Jenway 7415 NANO), y analizadas por electroforesis en gel de agarosa 1,5%.

### Transformación en células DH5-α quimiocompetentes

Para preparar células *E. coli* DH5-α quimiocompetentes se tomó una colonia crecida en placa agar/kanamicina (kan) y se realizó un precultivo en 10 mL de medio de cultivo Luria-Bertani (LB) no selectivo durante la noche (O.N.) con agitación a 37°C. Posteriormente, se transfirió 100 µL del precultivo a 10 mL de LB no selectivo y se incubó con agitación a 30°C hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm (D.O.<sub>600</sub>) de 0,4. Luego, se transfirió el cultivo a un tubo de centrífuga estéril y se incubó en hielo 10 minutos para posteriormente centrifugarlo a 1000 g durante 10 minutos a 4°C. El *pellet* obtenido se dejó escurriendo y se solubilizó en 5 mL de solución de transformación y almacenamiento (TSS, de su sigla en inglés *transformation and storage solution*: LB más polietilenglicol 10%, DMSO 5%, MgCl<sub>2</sub> 25 mM y MgSO<sub>4</sub> 25 mM) fría. A continuación, se volvió a centrifugar la solución y el *pellet* obtenido fue solubilizado en 1 mL de solución TSS por agitación suave. Las células fueron fraccionadas en alícuotas y almacenadas a -80°C.

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

*shock* térmico a 42°C durante 30 segundos y se incubó nuevamente en hielo 60 segundos. Posteriormente, se agregaron 250 µL de medio de cultivo de crecimiento super óptimo (SOC) o LB, y se incubó a 37°C con agitación durante 60 minutos. Por último, se sembró en medio LB/agar/kan 25 µg/mL. Como control negativo se transformó el control negativo de la PCR.

### **Transformación en células BL21**

Los plásmidos fueron transformados en cepas de *E. coli* BL21/DE3 para su expresión. Para ello, se realizó un precultivo de 3 mL de medio LB a 37°C hasta alcanzar una D.O.<sub>600</sub> de 0,4. Las células se centrifugaron a 10000 g durante 60 segundos y el *pellet* de bacterias fue solubilizado en 100 µL de CaCl<sub>2</sub> 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 durante 3 minutos a 37°C y 3 minutos en hielo. A continuación, se agregaron 400 µL de medio LB no selectivo y se incubó durante 1 hora a 37°C con agitación a 220 rpm. Por último, se plaqueó en LB/agar/kan 25 µg/mL. A partir de las colonias obtenidas, se realizan cultivos en 10 mL de LB los cuales se congelan para almacenarlos a -80°C con glicerol.

### **Electroforesis de ADN**

Los productos de PCR y ADN plasmídico fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa 1% o 1,5%. La electroforesis se realizó en *buffer* de corrida Tris-Acetato-EDTA, pH 8,0 (TAE) a 100V durante aproximadamente 20 minutos. Para observar las bandas de ADN se utilizó bromuro de etidio (BrEt) como agente intercalante, y un iluminador para visualizar las bandas. Se utilizaron marcadores de 100 pb o 1 kb (Invitrogen y ThermoScientific, respectivamente).

### **Expresión de aS**

La expresión de aS se realizó mediante inducción por isopropil-β-D-1-tiogalactopiranósido (IPTG). Todos los medios de cultivo utilizados contienen kanamicina 30 µg/mL. Se realizaron dos precultivos de 10 mL de LB o LB/glucosa 1% a partir de colonias aisladas obtenidos a partir de cultivos en placas LB. Estos precultivos fueron inoculados a dos matraces de 500 mL de LB o LB/glucosa 1%, e incubados a 37°C con agitación durante 3 horas. Luego, cuando la D.O.<sub>600</sub> alcanzó entre 0,6 y 0,8 se agregó IPTG sólido necesario para alcanzar una concentración de 0,5 mM de inducción. La

inducción se llevó a cabo durante 4 horas a 37°C. Transcurrido el tiempo de incubación, el contenido de los matraces se centrifugó y los *pellets* fueron almacenados a -20°C hasta la etapa de purificación. Para corroborar la inducción se trajeron alícuotas de 1 mL en cada paso, se centrifugaron y el *pellet* se solubilizó en 100 µL de H<sub>2</sub>O. Estas muestras se analizaron mediante electroforesis SDS-PAGE 12%.

### Purificación de aS

Para la purificación de las proteínas, los *pellets* bacterianos obtenidos en la sección anterior se solubilizaron en 20 mL de *buffer* de lisis (Tris 10 mM, NaCl 0,75 M, EDTA 1 mM, PMSF). La solución obtenida fue homogeneizada a 4°C utilizando un mortero de vidrio conectado a un motor giratorio, repitiendo 8 veces el proceso de homogeneizado. Este lisado se incubó durante 10 minutos a 100°C, generando que la mayoría de las proteínas precipiten, excepto aS. Se centrifugó a 10000 rpm durante 15 minutos a 4°C y el sobrenadante se filtró con papel *whatman* nº4. A continuación, se añadió sulfato de estreptomicina 10 mg/mL y se centrifugó a 13000 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 y se centrifugó a 13000 rpm durante 10 minutos. El *pellet* se solubilizó en 3 mL de solución *buffer* Tris 10 mM pH 7,5, y fue sometido a diálisis mediante membrana con un *cut off* de 12000 Da (SIGMA, #D6191) O.N. con *buffer* Tris 10 mM pH 7,5 EDTA 1 mM para eliminar el exceso de sulfato de amonio.

El último paso de purificación consistió en realizar una cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de intercambio iónico detectando la absorbancia a 280 nm y a 210 nm. Se utilizó una columna *Resource Q* de intercambio aniónico, ya que la aS tiene un punto isoelectrónico de 4,6. La elución de la proteína se logró cambiando la fuerza iónica en gradiente, pasando de un *buffer* Tris 10 mM, pH 7,5 (*buffer* A) a un *buffer* Tris 10 mM, pH 7,5, NaCl 1 M (*buffer* B) a un flujo de 2,5 mL/min. El gradiente de fuerza iónica utilizado fue: 0-5 minutos 0% *buffer* B, 5-20 minutos se establece un gradiente lineal entre 0-20% de *buffer* B. Entre 20-35 minutos el gradiente aumenta a 35%. Entre 35-50 minutos el gradiente pasa a 100% de *buffer* B y entre 50-60 minutos se mantiene en 100%.

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 proteína purificada fue analizada por espectrometría de masa para corroborar su peso molecular. Para evitar la formación de agregados de alto peso molecular, la proteína purificada se fraccionó en alícuotas a 300  $\mu\text{M}$  y se almacenaron a -80°C hasta su uso.

### Cuantificación de proteínas

Se realizó el método de ácido bicinchonínico (BCA, *bicinchoninic acid assay*) en placas de 96 pocillos utilizando una curva de calibración con albúmina sérica bovina (BSA, *bovine serum albumin*). Se utilizaron 10  $\mu\text{L}$  de muestra y 200  $\mu\text{L}$  de reactivo BCA (50:1 ácido bicinchonínico:sulfato de cobre). Luego de incubar la reacción 30 minutos a 37°C, se lee la absorbancia a 562 nm en un lector de placas (Varioskan Flash, Thermo Scientific, USA).

Alternativamente, la cuantificación se realizó por absorbancia a 280 nm utilizando  $\epsilon_{280} = 5960 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  para la aS salvaje y  $\epsilon_{280} = 1490 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  para las mutantes Y(125/133/136)F e Y(39/125/133)F, calculado utilizando la herramienta ProtParam (Expasy).

### Nitración de proteínas

Las proteínas fueron diluidas a una concentración final de 100  $\mu\text{M}$  en 100  $\mu\text{L}$  de *buffer* de nitración (fosfato de sodio 0.1 M, pH 7,4, DPTA 0.1 mM,  $\text{HCO}_3^-$  25 mM). El  $\text{ONOO}^-$  se administró el  $\text{ONOO}^-$  por bolo a 0,5 mM, realizando una dilución previa en NaOH 0,1 M.

El protocolo de nitración por DNI de las proteínas consistió en diluir las proteínas a 50  $\mu\text{M}$  en un volumen de reacción 4 mL en *buffer* fosfato de potasio 0,1 M pH 6,0 con DNI 1 mM (sotck disuelto en DMSO). Se incubó hasta 30 minutos con irradiación UV-A. Se concentraron las proteínas y se realizó un cambio de *buffer* a pH 7,4 para los ensayos siguientes.

La nitración se analizó por espectrometría de masa, reconociendo la adición de +45 Da, correspondiente a la incorporación de un grupo  $-\text{NO}_2$ . Además, la nitración se confirmó mediante *western blot* con anticuerpos primarios contra aS y contra 3-NT.

### Formación de entrecruzamientos por ditirosina

Para oxidar las proteínas fueron diluidas a una concentración de 50  $\mu$ M en buffer HEPES 20 mM, pH 7,4 y tratadas con CuCl<sub>2</sub> 50  $\mu$ M y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1,25 mM preparado fresco, a 37°C con agitación. La reacción comienza con el agregado del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y se detiene con agregado de EDTA 1,25 mM. Por otro lado, también se trató la aS en buffer fosfato 100 mM pH 7,4 con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 250  $\mu$ M y la enzima HRP 2  $\mu$ M a 37°C sin agitación. Por último, se trató aS 50  $\mu$ M en buffer fosfato pH 7,4 u 8,5 con ABAP 50  $\mu$ M a 37°C.

Las reacciones de formación de dímeros fueron analizadas por fluorescencia intrínseca de ditirosina ( $\lambda_{ex} = 325$  nm  $\lambda_{em} = 410$  nm) o por *wester-blot*.

### **Electroforesis nativa**

Los ensayos de agregación a oligómeros fueron analizados por electroforesis en gel poliacrilamida 7,5% en condiciones nativas, cargando 1  $\mu$ g de proteína total. Para revelar los geles nativos se utilizó la tinción argéntica. Para ello, se fijó el gel en solución de fijación (ácido acético 12%, etanol 50%, formaldehído 0,5 mL/L) durante 60 minutos con agitación lenta y se lavó 3 veces con solución de lavado (etanol 50%) durante 5, 10 y 15 minutos cada uno. Luego se enjuagó rápidamente con solución Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 0,2 g/L y se lavó con H<sub>2</sub>O nanoQ 3 veces. Seguido a esto, se incubó durante 20 minutos en solución de AgNO<sub>3</sub> 2 g/L, formaldehído 0,75 mL/L y se enjuagó 3 veces. Finalmente se reveló con solución de revelado (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 30 g/L, Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 20 mL/L, formaldehído 0,5 mL/L) hasta observar bandas.

### **Electroforesis desnaturalizante SDS-PAGE y *Western blot***

Las proteínas puras o lisados celulares fueron analizados por electroforesis SDS-PAGE 10%, 12% y 15% y posteriormente transferencia húmeda a membranas de nitrocelulosa O.N., utilizando un sistema Biorad. Para verificar la correcta transferencia, las membranas fueron teñidas con Rojo Ponceau. El bloqueo de la membrana se realizó con solución fosfato salino (PBS) con leche al 5% durante una hora. Luego del bloqueo, se realizaron 3 lavados de las membranas con PBS-tween 0,1 % (PBS-t) durante 5, 10 y 15 minutos, para luego iniciar la incubación con anticuerpos primarios O.N. a 4°C. Posteriormente se realizó una serie de lavados en PBS-t y se incubó con anticuerpos secundarios contra conejo o contra ratón durante 1 hora. Luego de una segunda serie de lavados para remover el anticuerpo secundario, las proteínas se visualizaron utilizando un equipo LI-COR Odyssey System (Biosciences). Se utilizaron anticuerpos contra aS (Santa Cruz Biotechnologies #2B2D1 o SIGMA S3062), contra iNOS (Abcam, ab3523),

contra p38 (Cell Signaling #9212), contra p-p38 (cell Signaling #9215S), contra 3-NT (policlonal) y contra  $\alpha$ -tubulina (Cell Signaling #3873S) en una dilución 1:1000 diluidos en PBS-t con azida de sodio 0,02%. Se utilizaron anticuerpos secundarios Li-COR contra conejo o ratón (IRD 680 o IRD 800), diluidos 1:15000 en PBS-t con azida de sodio 0,02%.

### ***Dot blot***

Para evaluar la presencia de aS en fracciones de cromatografía o en medios de cultivo celular, se realizó un *dot blot* de las distintas muestras al sembrar aproximadamente 10  $\mu$ L en forma de gotas directamente sobre membrana de nitrocelulosa (LiCor). Una vez seca la membrana, se realizaron todos los pasos del *western blot*, bloqueo e incubación con anticuerpos primarios y secundarios.

### **Espectrometría de masa (MS)**

Las proteínas aS salvaje y mutantes, control y oxidadas fueron analizadas por espectrometría de masa (ESI-MS) (QTrap4500, ABSSciex). Las proteínas de aS sin digerir se diluyeron en ácido fórmico 0,1% a una concentración 0,14  $\mu$ g/ $\mu$ L (10  $\mu$ M). Se utilizó ionización en modo positivo y se obtuvieron espectros *m/z* con el cual se realizó una deconvolución a un espectro de masas. Las áreas de los picos fueron analizadas con el *software* Origin para obtener una cuantificación relativa entre especies entre el área total de especies identificadas.

### **Dicroísmo circular**

Las proteínas fueron analizadas por dicroísmo circular (CD) en la región UV lejano (190-260 nm). Se evaluó la capacidad de formación de estructuras secundarias con el agregado del detergente dodecilsulfato de sodio (SDS) 2 mM. Muestras de 0,1 mg/mL de aS se analizaron realizando un promedio de 4 espectros y restando un espectro de blanco con solución *buffer*, utilizando una cubeta de 0,1 cm de paso óptico. Adicionalmente, la concentración de proteínas se midió por el ensayo BCA de cada alícuota analizada para obtener la elipticidad molar y así poder comparar los espectros entre sí, independientemente de la concentración utilizada. Se utilizó un espectrofotómetro de dicroísmo circular Applied Photophysics (Chirascan V100), del Instituto Pasteur de Montevideo.

### **Ensayo formación de fibras**

Se incubaron 500  $\mu$ L de aS 100  $\mu$ M (1,4  $\mu$ g/ $\mu$ L) estéril en *buffer* de nitración a 37°C con agitación (1400 rpm) durante varios días. La cinética de agregación fue estudiada por dos métodos: tioflavina y con la sal roja Congo (RC). Para el ensayo de Th-T, se mezclaron 5  $\mu$ L extraídos de la mezcla de agregación con 1 mL de Th-T 10  $\mu$ M preparada en amortiguador glicina/NaOH 50 mM, pH 8,5. A esta mezcla se le midió la fluorescencia utilizando  $\lambda_{ex} = 450$  nm y  $\lambda_{em} = 482$  nm utilizando un espectrofluorímetro (FP-8500, JASCO). Para el ensayo RC, se tomaron 10  $\mu$ L de la mezcla de agregación y se mezclaron con 140  $\mu$ L de solución RC 20  $\mu$ M en solución *buffer* Tris 20 mM pH 7,5, NaCl 100 mM en una placa de 96 pocillos. La placa se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos y se midió la relación de absorbancias 540/480 nm usando un lector de placas Varioskan Flash. Para este ensayo se resta la relación 540/480 del blanco para todos los tiempos. La cinética de ambos ensayos se ajustó a la ecuación sigmoide  $y = \frac{a}{1+e^{\frac{x-x_0}{b}}}$  utilizando el *software* GraphPad Prism 8.4.3. Los parámetros representan la amplitud (a), el tiempo medio de agregación ( $x_0$ ) y la forma de la sigmoide (b). Cada ensayo se realizó por triplicado.

Adicionalmente, se midió la capacidad de agregación por *western blot* comprando la concentración de aS<sub>m</sub> remanente en sobrenadante luego de centrifugar a 100000 g las muestras de agregación al finalizar el ensayo. Se cuantificaron las bandas utilizando el software ImageJ-FIJI y se normalizó el área de la banda contra el tiempo inicial.

### **Ensayo formación de oligómeros**

Las proteínas liofilizadas se solubilizaron a una concentración de 300  $\mu$ M en 1 mL de solución *buffer* Hepes 10 mM pH 7,4, y se incubaron a 37°C sin agitación durante 24 horas. Una vez finalizada la incubación, la purificación de oligómeros se realizó por centrifugación a 14100 g durante 40 minutos a 4°C. Se filtró el sobrenadante mediante filtros con un corte de 100 kDa por centrifugación a 5000 g durante 6 minutos a 4°C. Luego se realizaron 5 lavados con 400  $\mu$ L del mismo *buffer* por centrifugación a 6000 g durante 10 minutos cada uno. Los oligómeros se solubilizaron y eluyeron invirtiendo el filtro y centrifugando a 6000 g durante 10 minutos. Por último, se diluyeron en 40  $\mu$ L del *buffer* Hepes estéril. Se tomaron alícuotas de las distintas etapas de purificación y se analizaron por electroforesis nativa para corroborar el proceso de purificación.

### **Formación de monómero, fibras y oligómeros marcados con Alexa488**

Una solución de aS salvaje se pasó por una columna PD10 equilibrada con solución *buffer* NaHCO<sub>3</sub> 100 mM, se cuantificó la concentración de proteína por absorbancia a 280 nm y se incubó a 37°C 10 minutos. Se incubaron 300 µM de aS en relación 1:1 o 10:1 con el reactivo Alexa488 succinimidilester (Thermo Scientific Mix-n-Stain™ CF™ 488™). La mezcla se incubó a 37°C con agitación lenta en oscuridad durante 30 minutos. Al pasar este tiempo, se volvió a pasar la mezcla por una columna PD10 (Sephadex™ G-25) equilibrada en PBS para separar el fluoróforo no unido. Este fraccionamiento se evaluó por absorbancia a 280 nm y a 490 nm. El monómero de aS marcado con Alexa488 obtenido (aS<sub>m</sub><sup>488</sup>) se concentró utilizando un filtro Amicon 10 kDa y se cuantificó por el ensayo de BCA.

Las fibras marcadas (aS<sub>f</sub><sup>488</sup>) se generaron a partir del monómero marcado con Alexa488 utilizando el protocolo de formación de fibras descrito anteriormente.

Para la obtención de aS<sub>o</sub> marcados con Alexa488 (aS<sub>o</sub><sup>488</sup>), se partió de oligómeros sin marcar purificados y se realizó un cambio de solución *buffer* a NaHCO<sub>3</sub> 100 mM. Estos oligómeros, se incubaron con una relación 1:1 (mismo protocolo que para marcar el monómero) con el reactivo de Alexa488. Se incubó la reacción 30 minutos y se realizó un nuevo cambio de solución *buffer* para eliminar el fluoróforo no unido y se solubilizaron en PBS estéril. Estos aS<sub>o</sub><sup>488</sup> obtenidos fueron cuantificados y evaluados por electroforesis nativa.

A todas las especies marcadas se le analizaron las propiedades espectrales de fluorescencia, espectros de emisión y excitación de tirosina ( $\lambda_{\text{ex}} = 275$  nm) y del fluoróforo Alexa488 ( $\lambda_{\text{em}} = 492$  nm) utilizando un espectrofluorímetro (FP-8500, JASCO).

### **Microscopía electrónica de transmisión (MET)**

Las muestras de fibras y oligómeros purificados se tiñeron con acetato de uranilo 1% utilizando rejillas (200 mesh) con membrana formvar/carbono y se tomaron imágenes utilizando un microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM-1010, del Departamento de Microscopía Electrónica de la Facultad de Ciencias (UdelaR). Las imágenes fueron analizadas utilizando el software ImageJ-FIJI.

### **Animales**

Los procedimientos que utilizan animales están de acuerdo con los lineamientos internacionales y fueron aprobados por la Comisión Honoraria de Experimentación

Animal de la Universidad de la República, CHEA; <https://chea.edu.uy/>. Para la realización de los cultivos primarios de astrocitos fueron empleados neonatos de ratas de 1 o 2 días de vida y para obtener las neuronas del hipocampo, embriones en estadio 18 (E18) de la cepa Wistar, criadas en la Unidad de Reactivos Biológicos de Experimentación (URBE) de la Facultad de Medicina. Las madres permanecieron en cajas separadas con agua y alimento disponibles, en régimen de temperatura y luz controlada.

### Cultivos primarios de astrocitos de rata

Se realizaron cultivos primarios de astrocitos obtenidos a partir de corteza cerebral de rata neonato P1. Se utilizó un protocolo basado en la disociación mecánica del tejido y enriquecimiento de astroglía con algunas modificaciones. Estos cultivos se realizaron en colaboración con el Departamento de Histología y Embriología de la Facultad de Medicina, UdelarR.

Neonatos en P1 fueron sometidos a eutanasia por decapitación y se les extrajo el encéfalo descartando las meninges. Se disecaron las cortezas utilizando una lupa estereoscópica. El tejido fue cortado con bisturí en fragmentos pequeños y estos fueron puestos en un tubo Falcon de 15 mL contenido medio *Bubelcco's Modified Eagle Medium* (DMEM). Se extrajo el medio y se incubaron las cortezas fragmentadas con solución de tripsina 0,25% en PBS, con fin de facilitar la disagregación del tejido y obtener células aisladas. Se retiró la tripsina y se agrega 1 mL de DMEM/Suero fetal bovino (SFB) 10% para inhibir la acción de la tripsina, junto con 50 µL de enzima DNasa I (1 mg/mL). A continuación, el *pellet* se solubilizó con micropipeta repetidas veces y se filtró con una malla de 80 µm, colectando el disagregado tisular en un tubo Falcon de 50 mL. Se centrifugó durante 8 minutos a 1100 rpm, se retiró el sobrenadante y se solubilizó el *pellet* en 1 mL de DMEM/FBS 10%. Se contaron las células en cámara de Neubauer y se plaquearon a una densidad de  $6 \times 10^6$  células por botella de  $75 \text{ cm}^2$  en DMEM/FBS 10%, incubándose en estufa a 37°C con atmósfera saturada de humedad, CO<sub>2</sub> 5% por 48 horas. Se cambió el medio de cultivo por primera vez a las 48-72 horas suavemente, y luego día por medio hasta formar una monocapa confluente de células. Al llegar a la confluencia (alrededor de 7-9 días), se eliminaron las células microgliales y oligodendroglía por agitación durante 48 horas en un agitador orbital, causando su desprendimiento, mientras que los astrocitos permanecen adheridos a la placa. Luego, se lavó dos veces con PBS y se agregó DMEM/FBS 10% con 5 µL de arabinósido de citosina (ara-C, 10 µM), durante

48 horas, lo que bloquea la proliferación celular y elimina células proliferativas como fibroblastos y otras glías, mientras que los astrocitos no se ven afectados, dado que su capacidad proliferativa está inhibida por interacción de contacto célula-célula. Luego de dicha incubación, se volvió a realizar lavados con PBS y cambio de medio, dejando los astrocitos por 48 horas en la estufa de cultivo, momento en que estuvieron listos para sembrar y realizar los distintos experimentos. Para el plaqueo se desprendieron con 1 mL de solución tripsina 0,25% durante 7-8 minutos a 37°C, y se agregaron 2 mL de DMEM/FBS 10%. Se colectaron las células en un tubo, se centrifugó a 1000 rpm por 5 minutos y se contaron en cámara de Neubauer. Se plaquearon a una densidad de  $2,85 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> y son mantenidas en medio de cultivo DMEM, suplementado con FBS 10%, HEPES 3,6 g/L, penicilina 100 U/mL y estreptomicina 100 µg/m. La pureza de los cultivos astrocitarios obtenidos se encuentra reportada mayor al 98%, determinada por inmunoreactividad a la proteína ácida fibrilar glial (GFAP).

### **SH-SY5Y**

Las células SH-SY5Y son células inmortalizadas derivadas de neuroblastoma humano. Fueron cedidas por colaboración con el Dr. Harry Ischiropoulos. Estas células fueron mantenidas en medio DMEM suplementado con Ham F12 (Gibco) y FBS 10%, 1 mM glutamina, 50 U/mL penicilina y 50 µg/mL estreptomicina. Las células fueron cultivadas en frascos de 75 cm<sup>2</sup> a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> con 12 mL de medio.

### **BV-2**

Las células BV-2 son una línea celular inmortalizada de microglía murina. Fue cedida por colaboradores del Instituto Pasteur de Montevideo. Se cultivaron en botellas de 75 cm<sup>2</sup> con 12 mL de medio de cultivo DMEM/FBS10%, y se mantuvieron en estufa de cultivo a 37°C, CO<sub>2</sub> 5% y humedad saturada. Se realizaron cambios de medio de cultivo regulares cada 48 horas, y se realizaron pasajes al llegar a la confluencia. Estos pasajes se realizaron utilizando 3 mL de tripsina 10% durante 7-10 minutos a 37°C, que luego se inactivó agregando 9 mL de DMEM/FBS 10%. Se realizaron subcultivos diluyendo las células 1:5 o 1:4. Para realizar los experimentos, las células fueron tratadas con solución de tripsina y sembradas en placas de 6, 24 o 48 pocillos para obtener una densidad sub confluente, y se realizaron los tratamientos 24 horas después.

### **Microscopía confocal e inmunocitoquímica**

Para la microscopía confocal se prepararon cultivos celulares en placas de 24 pocillos con un vidrio en el fondo del pocillo, plaqueando  $0,05 \times 10^6$  células. Para experimentos de cultivos vivos se utilizaron placas Greiner CellView 35/10 mm (#627870). Luego de realizar los tratamientos correspondientes con las diferentes especies de aS, se eliminó el medio de cultivo y se lavaron las células con PBS dos veces. Luego se fijaron las células con paraformaldehído 4% durante 10 minutos a 37°C. Se lavaron las células con PBS 3 veces. Por último, para evidenciar la presencia de cromatina nuclear, se incubaron con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) 5 ng/mL, y para evidenciar el citoesqueleto se incubaron con 2 gotas/mL de faloidina-ActinRed555 (Invitrogen #R37112, conjugada a rodamina), ambas incubaciones por 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad, realizando posteriormente 3 lavados con PBS. Por último, los vidrios se montaron en portaobjetos para microscopía utilizando un medio de montaje comercial (SIGMA, C9368) y se realizó un sellado con barniz para evitar la desecación. Los portaobjetos fueron almacenados en oscuridad hasta su visualización.

Las imágenes fueron adquiridas utilizando un microscopio confocal Leica SP5 utilizando láseres a 405, 488 y 543 nm, para DAPI, Alexa488 y rodamina respectivamente. Se utilizaron objetivos 20x y 63x en inmersión en aceite. Se ajustaron los parámetros de adquisición de ganancia, off-set y potencia de láseres para los controles negativos y para las condiciones de mayor concentración de aS<sup>488</sup> (como control positivo), y luego se adquirieron imágenes en el eje z, de 1024x1024 píxeles, a un mínimo de 3 campos por muestra, cada muestra realizada por duplicado. Las imágenes fueron guardadas en formato .tiff y analizadas mediante el software ImageJ-FIJI.

Para detectar la presencia de aS<sub>m</sub> en el interior celular se realizó inmunocitoquímica sobre células fijadas con paraformaldehído 4%. Para ello, luego de fijar las células tratadas, se realizaron pasos de permeabilización y bloqueo con Tritón-X 0,5% a temperatura ambiente por 5 minutos y BSA 5% en PBS por 1 hora a temperatura ambiente. Luego de varios lavados, se incubó O.N. con anticuerpo primario contra aS (SIGMA S3062) y anticuerpo secundario conjugado a Alexa488. Los preparados se analizaron utilizando un microscopio de epifluorescencia y confocal.

El análisis cuantitativo de fluorescencia, se realizó una separación de canales de fluorescencia. Al canal verde (Alexa488) se le realizó la función *Z Project / SUM slices*, mientras que al canal rojo (faloidina) se aplicó la función *Z Project / MAX intensity* para delimitar el contorno de la célula. Sobre el canal rojo se seleccionaron células individuales como regiones de interés (ROI), se duplicaron al canal verde y se cuantificaron valores

de *integrated density* y el *area* de las ROI generadas en este canal. Se tomaron también valores de fluorescencia de 5 regiones de fondo sin células en canal verde y se calculó la intensidad real de fluorescencia (CTCF, del inglés, *corrected total cell fluorescence*) con la ecuación:

$$\text{CTCF} = \text{Integrated Density} - (\text{Area de la célula} * \text{promedio de intensidad del fondo})$$

Se analizaron 10 células por campo. Las imágenes con las ROI fueron almacenadas.

### Citometría de flujo

Para evaluar la internalización de las distintas especies de aS con células, se utilizó citometría de flujo (FACS Calibur, Benton Dickinson) con fin de evidenciar la aparición de señal fluorescente en el interior celular. Para ello se plaquearon células BV-2 en 3 mL de medio de cultivo SFB 10% en placas de cultivo de 6 pocillos. Llegado a una confluencia del 75%, se realizaron las incubaciones con las distintas formas de aS a los tiempos correspondientes. Luego se aspiró el medio de cultivo y se lavó 3 veces con PBS. A continuación, las células se incubaron con 1 mL de tripsina 10% a 37°C hasta que las células pierdan la adhesión a la placa, observable por microscopía de campo claro, y se inactivó la tripsina con 3 mL de medio de cultivo 10% SFB tibio y se pasaron las células a tubos de centrífuga, donde fueron centrifugadas durante 5 minutos y solubilizadas en 1 mL de PBS. Este volumen es pasado por el citómetro donde se comienza realizando el ajuste de la nube con los canales FSC-H y SSC-A utilizando el control negativo sin tratamiento. Luego la muestra con mayor concentración de proteína fluorescente se pasa por el citómetro para ajustar la sensibilidad del detector FL1 que corresponde a la emisión del Alexa488. Todas las muestras fueron medidas con los mismos parámetros, adquiriendo 1000 eventos para cada réplica.

Los eventos fueron analizados utilizando el programa Cyflogic. Para ello, se excluyeron *debris* celulares y se realizó un *gateing* de la nube de eventos en el gráfico FSC-H vs SSC-A. A esta población de células se analizó el histograma de fluorescencia al canal FL1 y se adquieren las media geométricas de fluorescencia, ya que se trabaja con fluorescencia en escala logarítmica. Los valores fueron trabajados normalizados a la media geométrica de fluorescencia de la condición control, con motivo de realizar comparaciones entre experimentos independientes.

### **Ensayo de Griess**

La producción de nitrito se midió utilizando el ensayo de Griess, el cual consiste en la detección de nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ), que se forma como producto de descomposición del  $\bullet\text{NO}$  producido por las células y liberado al medio de cultivo. Luego del tratamiento de las células con diferentes condiciones, se colectó el medio de cultivo y se centrifugó a 1000 rpm para decantar células que crecen en suspensión. Se mezclaron 100  $\mu\text{L}$  del sobrenadante a una placa de 96 pocillos con igual volumen del reactivo de Griess (ácido sulfanílico y naftiletidiamina 1:1). Se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente y se midió la absorbancia a 540 nm en lector de placas Varioskan Flash. La concentración de nitrito en la muestra se determinó utilizando una curva de calibración construida a partir de concentraciones conocidas de  $\text{NaNO}_2$  (0 - 20  $\mu\text{M}$ ).

### **Ensayo Amplex Red**

Para medir la formación de peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) se utilizó el ensayo Amplex Red, para el cual se plaquearon las células en placas de 24 o 48 pocillos y al llegar a la confluencia se realizaron los distintos tratamientos con las formas de aS. Las células se lavaron con PBS y se agregó una mezcla de 300  $\mu\text{L}$  de Amplex red 20  $\mu\text{M}$  y 0,01 mg/mL de la enzima peroxidasa de rábano (HRP, *horseradish peroxidase*) en PBS. Se midió la fluorescencia en un curso temporal con una longitud de onda de excitación a 530 nm y de emisión a 590 nm en un equipo Varioskan LUX y se grafica la velocidad de oxidación de la sonda.

### **Ensayo de viabilidad MTT**

Para evaluar la citotoxicidad de las especies de aS, se utilizó el ensayo colorimétrico de la sal bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolio (MTT). Para ello, las células plaqueadas en placas de 24 pocillos se incubaron con las distintas especies de aS durante 48hs. Se incluyeron controles sin tratar, con disolvente (DMSO), un control sin células y un control tratado con rotenona. Pasado el tiempo de incubación, se retiró el medio de cultivo y se agregó una solución MTT/PMS preparada en PBS (MTT 5 mg/mL, PMS 0,22 mg/mL). Se agregó una dilución 1:5 a cada pocillo en dPBS. La placa se mantuvo en estufa a 37°C protegida de la luz mientras se forman cristales precipitados de la forma formazán, lo que fue evaluado por microscopía de campo claro. Pasado el tiempo de incubación (10 minutos aproximadamente) se retiró la solución de MTT/PMS y se agregaron 800  $\mu\text{L}$  de DMSO y 100  $\mu\text{L}$  de solución *buffer* glicina de

Sorensen (Glicina 0,1 M, NaCl 0,1 M, pH 10,5 ajustado con NaOH 0,1 M) para disolver los cristales formados. Por último, se midió la absorbancia a 590 nm en lector de placas Varioskan Flash. No se realizó corrección a 630 nm.

Para calcular porcentaje de viabilidad se utilizó la siguiente ecuación:

$$(A_{\text{muestra}} - A_{\text{blanco}} / A_{\text{control}} - A_{\text{blanco}}) * 100$$

### Lisado celular

Para obtener lisados celulares en cultivo, las células son lavadas con PBS y lisadas con 100  $\mu$ L de solución *Radioinmunoprecipitation assay* (RIPA, NaCl 150 mM, Tritón X-100 0,1%, desoxicolato sódico 0,5%, SDS 0,1%, pH 8,0) sobre hielo. Las células fueron solubilizadas en la solución utilizando micropipeta varias veces y fueron despegadas con la ayuda de un *scraper*. Se colectó el lisado y se centrifugó a 15000 g por 20 minutos a 4°C. Los sobrenadantes fueron conservados y diluidos en *buffer* de carga para subsiguiente análisis por SDS-PAGE desnaturizante. Las muestras fueron calentadas a 90°C durante 10 minutos y almacenadas a -80°C.

Para algunos lisados, se utilizó un amortiguador de lisis Tris-HCl 20 mM, pH 5,0, NaCl 150 mM, Tritón-X100 0,1% al cual se le agregó inhibidores de protestas y fosfatas. Como inhibidor de protestas se utilizó *Cocktail SIGMA FAST proteases inhibitor*, EGTA 1 mM, Na<sub>2</sub>EDTA 1 mM, NaPPi 25 mM, y un inhibidor de fosfatasas comercial. Luego de realizar el lisado de células, se pasaron a un tubo de 1,5 mL y se realizaron 3 ciclos de congelado-descongelado en nitrógeno líquido. Se centrifugaron los tubos a 14000 g durante 10 minutos a 4°C y se conservaron los sobrenadantes. Se cuantificó la concentración de proteínas de los lisados obtenidos por método de BCA, haciendo diluciones de la muestra 1:5 y 1:10 y se almacenaron a -80°C hasta agregar amortiguador de carga para electroforesis.

### Análisis de datos y estadística

Los resultados corresponden a datos obtenidos de dos o tres experimentos independientes realizados en diferentes días, cada uno con dos o tres réplicas técnicas. Todos los datos están expresados como la media  $\pm$  error estándar, a menos que se indique lo contrario. Los promedios se comparan utilizando el test t de student o *unpaired* ANOVA y se toma como significativo un valor p < 0,05. Los datos de citometría de flujo fueron analizados utilizando el test de Kolmogorov-Smirnov.



# 11 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

## 11.1 EFECTO DE LA NITRACIÓN EN RESIDUOS DE TIROSINA Y OXIDACIÓN DE METIONINA EN LA AGREGACIÓN DE aS

Uno de los modelos utilizados habitualmente por el laboratorio para producir nitración de residuos de tirosina es utilizando peroxinitrito, especie que se encuentran dentro las especies reactivas del nitrógeno (RNS). Estudios previos de nuestro laboratorio y de otros trabajos publicados han mostrado a la nitración de aS en sus residuos de tirosina como una modificación inhibitoria de la generación de fibras (173,179,288,289), siendo esta una modificación relevante en contextos patológicos, como se mostró en la sección de introducción. Sin embargo, desde el punto de vista experimental, el tratamiento con ONOO<sup>-</sup> como agente nitrante para producir las formas de aS nitradas produce, además, la oxidación de otros residuos, como oxidación de metionina, y DiTyr (173,288). Debido a esto, el uso de ONOO<sup>-</sup>, a pesar de ser una aproximación representativa de una situación *in vivo* (las células pueden formar peroxinitrito bajo ciertas condiciones), es un agente nitrante que presenta poca selectividad.

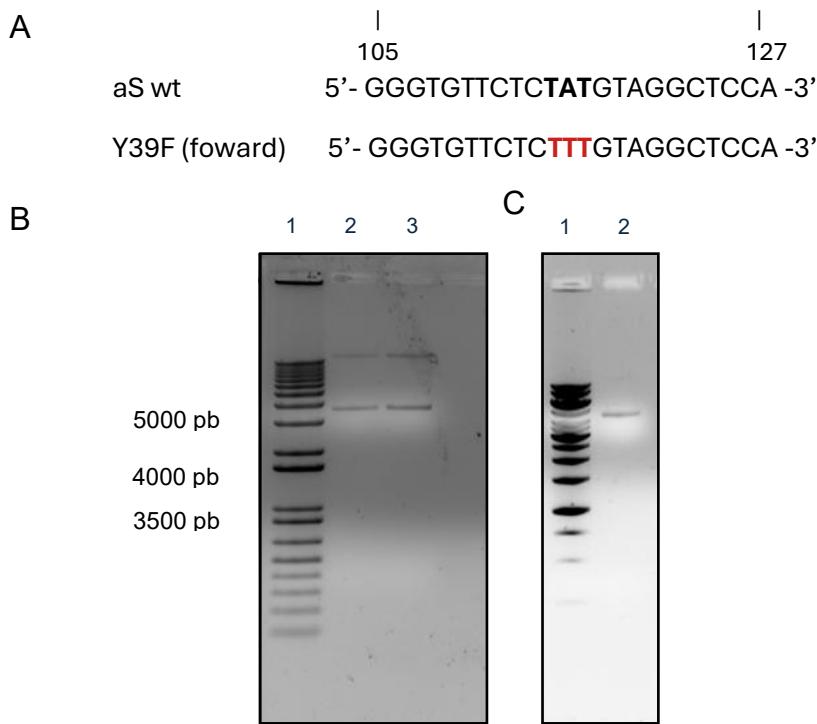
Por lo tanto, para lograr discernir entre los efectos que produce la nitración de tirosina y oxidación de metionina sobre la proteína aS, este trabajo propuso el diseño y obtención de aS carente de residuos de tirosina en su secuencia, el mutante Y(39/125/133/136)F (4YF), mediante mutagénesis de esos residuos por fenilalanina. Dado que, el tratamiento con ONOO<sup>-</sup> produce MetO (modificación también inhibitoria de la formación de fibras), si el tratamiento de la aS 4YF con ONOO<sup>-</sup> es capaz de inhibir la formación de fibras, entonces, la inhibición observada para la proteína salvaje tratada con peroxinitrito puede deberse a la contribución de ambas modificaciones.

### 11.1.1 Obtención de mutante de aS 4YF

Se realizó el diseño de cebadores (en inglés, *primers*) que abarcan el codón de la tirosina que se quiere sustituir por fenilalanina. Estos cebadores, de aproximadamente 25 pb, se diseñaron de tal forma que la mutación se localiza aproximadamente a la mitad de su longitud con el fin de maximizar la unión al ADN molde. Para generar el mutante de aS sin residuos de tirosina, se partió de un mutante obtenido previamente que solo contiene la tirosina en el extremo N-terminal, mutante Y(125/133/136)F (denominado “aS Y39” por contener solo la tirosina en la posición 39). En la figura 8A se muestra la

secuencia de ADN en la región de la tirosina 39, y la secuencia alineada del cebador diseñado.

La visualización del plásmido en gel por BrEt muestra bandas de aproximadamente 5 kb, como se muestra la figura 8B, lo que indica una buena integridad para proceder a realizar mutagénesis.

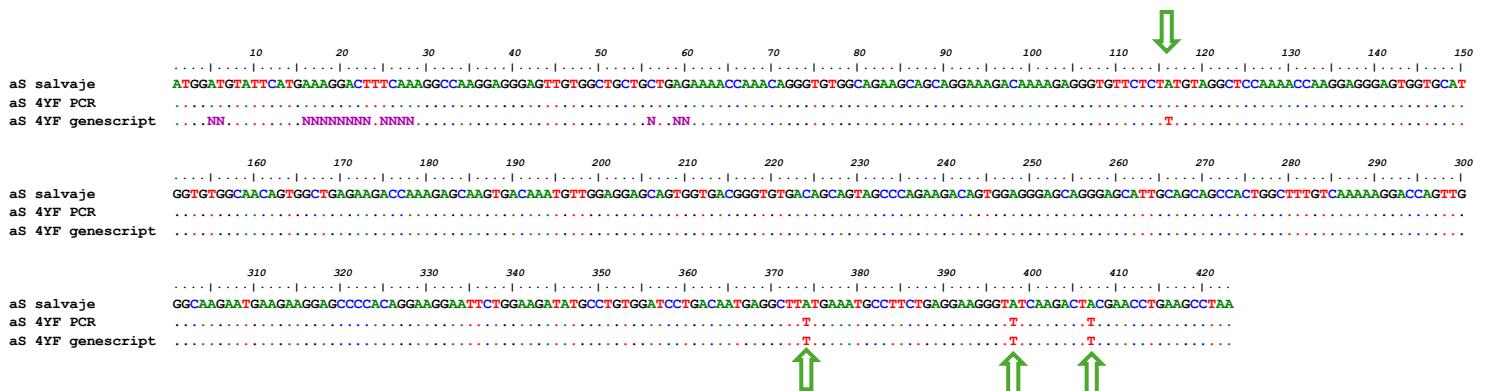


**Figura 8. Diseño y obtención de plásmidos de aS Y(39/125/133/136)F.** A. Región en la secuencia de aS salvaje donde se muestra resaltado el codón codificante de tirosina 39. Debajo, se muestra alineado el cebador utilizado para la mutagénesis de ese residuo. B. Gel de agarosa 1% de ADN plasmídico pET-30. Carril 1. Marcador GeneRuler 1 kb. Carril 2. plásmido aS Y(125/133/136)F. Carril 3. plásmido aS Y(39/125/133)F. C. Gel agarosa 1% Carril 1: marcador GeneRuler 1 kb. Carril 2. plásmido obtenido de mutante aS Y(29/125/133/136)F.

A continuación, se realizó el protocolo de PCR para la mutagénesis y la transformación del amplicón en células quimiocomponentes DH5-a. Una vez obtenida la extracción de ADN, se visualizó en un gel de agarosa, observándose la banda con un tamaño esperado de 5 kb (Figura 8C). La secuenciación del plásmido obtenido se muestra a continuación en la figura 9, donde se evidenció que no se tuvo éxito con este primer intento de mutagénesis, al no modificarse el codón TAT (posición 115 Figura 9), codificador de tirosina. Se realizó un segundo intento incorporando mayor cantidad de ADN molde, pasando de 60 ng a 100 ng, pero la secuencia obtenida continuó siendo la misma que la secuencia de partida. Por lo tanto, no se pudo realizar la mutagénesis

utilizando los cebadores y condiciones de PCR utilizadas, a partir del molde Y(125/133/136)F.

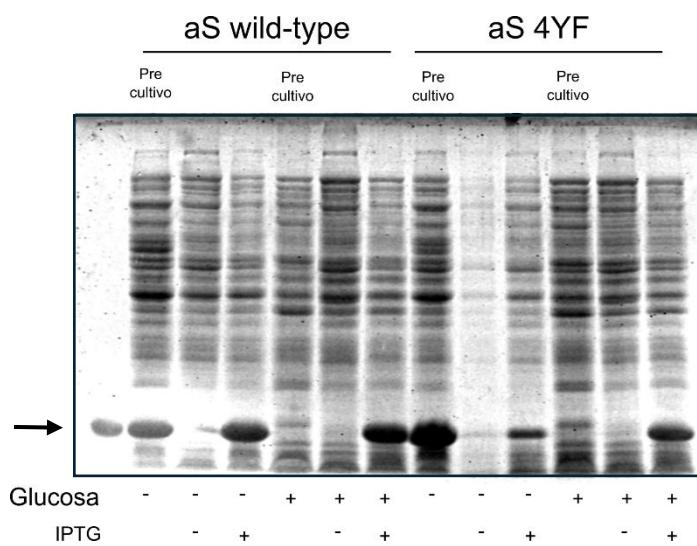
Se decidió enviar a sintetizar dicho plásmido a la empresa Genscript, la cual envió el plásmido generado, que fue corroborada su secuencia por la plataforma de secuenciación del Instituto Pasteur de Montevideo. El resultado de la secuencia obtenida por Genscript se detalla en la figura 9, donde se observó el codón que ahora codifica para fenilalanina (TTT).



**Figura 9. Secuenciación de plásmidos aS Y(39/125/133/136)F.** Los plásmidos obtenidos luego del proceso de mutagénesis por PCR y enviado a la empresa *Genescript* fueron secuenciados por la plataforma de secuenciación del Instituto Pasteur. Se compara contra la secuencia de aS salvaje la secuencia obtenida luego de la mutagénesis dirigida por PCR (aS 4YF PCR) la cual continúa manteniendo el codón codificante para tirosina TAT, habiendo quedado igual a la secuencia molde (mutante Y(125/133/136)F). En cambio, la secuencia obtenida por *Genescript* se muestra el cambio en el codón A→T, resultando en un codón codificante de fenilalanina TTT.

Durante la inducción de la expresión, se comenzó obteniendo un bajo crecimiento de los cultivos. El precultivo alcanzaba un crecimiento esperado, pero, sin embargo, el cultivo de mayor volumen no alcanzaba la densidad óptica esperada durante el tiempo de incubación, no observándose crecimiento bacteriano. Esto se aprecia en los geles de expresión de la figura 10 (carriles 8-10), donde no se ve la aparición de una banda correspondiente a aS, efecto que sí es visible para la proteína salvaje. Cabe destacar una alta expresión de las proteínas en ausencia del inductor glucídico IPTG en los precultivos, por lo que el plásmido presenta una alta expresión basal. En este sentido, se planteó que la proteína 4YF pueda impactar negativamente sobre el crecimiento bacteriano por algún mecanismo de toxicidad, que pueda generar una baja estabilidad del plásmido y, por consiguiente, pérdida de resistencia al antibiótico kanamicina. En base a un protocolo publicado (292), donde se plantea que la expresión basal de proteínas por este sistema de expresión puede representar problemas para la estabilidad del plásmido, y tomando como referencia la solución planteada para reducir la expresión basal, se realizó el protocolo de inducción utilizando medio de cultivo suplementado con glucosa 1%. Este cambio en el

protocolo logró reprimir la expresión basal de la proteína en los precultivos y en presencia del inductor IPTG los niveles de expresión vuelven a ser comparables a la proteína salvaje

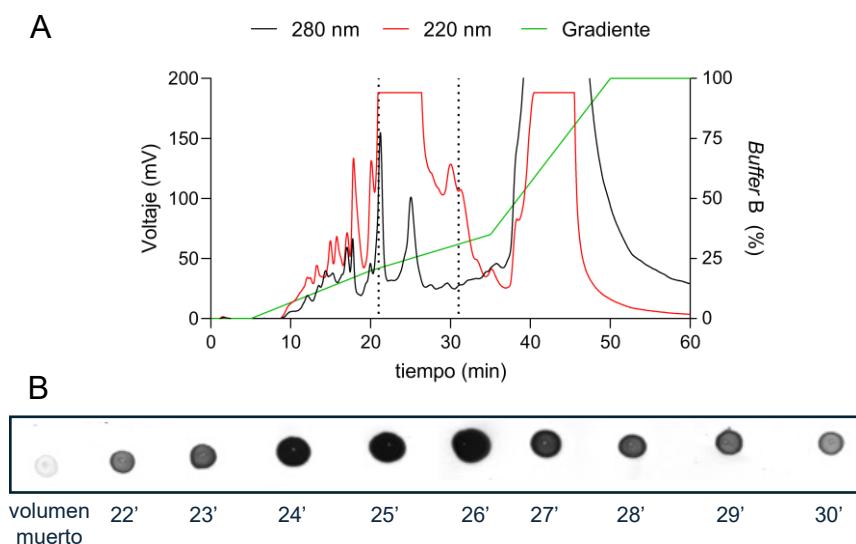


**Figura 10. SDS-PAGE 12% de expresión de aS.** Fueron sembradas muestras de los cultivos durante y luego la inducción con IPTG 0.5 mM. En el primer carril se sembró aS salvaje como marcador del peso molecular esperado (flecha). El aumento de expresión se evaluó por aparición de la banda correspondiente a aS luego del agregado de IPTG.

(Figura 10, carriles 5-7 y 11-13).

El plásmido utilizado pET-30 utiliza el operón *lac* bacteriano, el cual permite la transcripción de proteínas por medio de la ADN polimerasa T7, la cual es inducible por IPTG. Normalmente, la expresión del operón está, además, reprimida cuando la bacteria crece en medio con suficiente fuente de energía proveniente de la glucosa. Sin embargo, en los vectores plasmídicos pET, existe una mutación puntual en la región promotora que elimina este mecanismo regulatorio, haciendo posible la transcripción génica sólo con la presencia del inductor (aún en presencia de glucosa). Por lo tanto, la presencia de glucosa 1% permite la represión de la transcripción basal, pero en presencia del inductor IPTG la expresión ocurre a los niveles esperados, eliminando el efecto tóxico durante el crecimiento del precultivo.

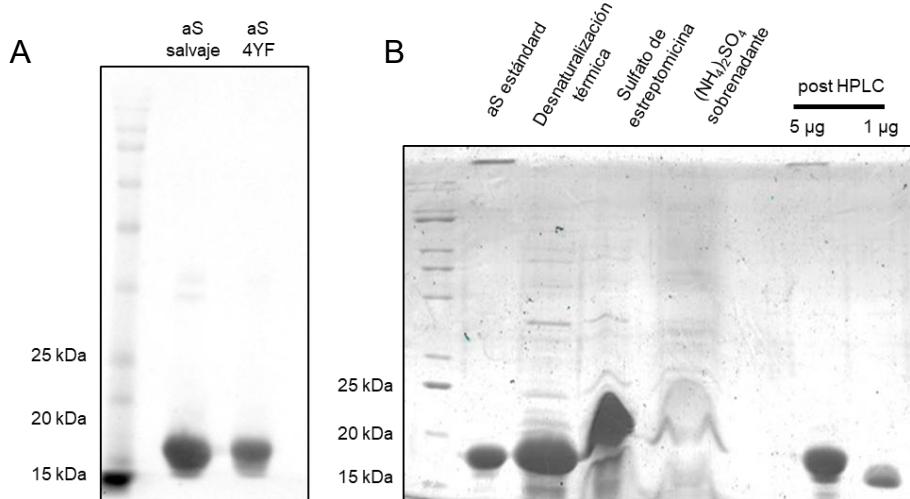
Habiendo obtenido la expresión exitosa de la proteína recombinante, se realizó su purificación según el protocolo establecido para la proteína salvaje. Sin embargo, esta construcción mutante presentó un problema para su análisis espectroscópico por absorción a 280 nm, ya que no posee residuos aromáticos tirosina o triptófano. Por ende, el análisis cromatográfico se realizó midiendo la absorbancia a 280 y 220 nm, con tal de evidenciar la absorción del enlace peptídico. A los 21 minutos ocurre un aumento en la absorción a 220 nm, pero no a 280 nm, lo que es indicativo que podría tratarse de la elución correspondiente al mutante 4YF. El cromatograma obtenido de esta purificación se presenta en la figura 11A. Fueron colectadas fracciones cada 1 minuto entre los 21 minutos y 31 minutos de elución y se realizó un *dot blot* de estas fracciones (figura 11B). Se observó que el eluído de la columna es reconocido por el anticuerpo contra aS.



**Figura 11. Cromatografía para purificación de aS 4YF por HPLC.**  
A. Cromatograma de purificación donde se observa la elución a dos longitudes de onda (eje izquierdo). Se ilustra, además, el gradiente de solución amortiguadora de elución “B” (eje derecho). B. *Dot blot* de distintas fracciones colectadas entre los 22 y 31 minutos de elución.

Las fracciones colectadas analizadas por *dot blot* se juntaron, se dializaron y la solución fue concentrada, realizando *western blot* de la proteína purificada (figura 12A). Se observó una señal para aS 4YF monomérica, sin la presencia de especies de alto peso molecular (dímeros y especies oligoméricas). El resultado del *western blot* y *dot blot* indican que puede tratarse de la proteína mutante de interés. El rendimiento de purificación resultó comparable a la proteína salvaje (aproximadamente 20 mg por litro de cultivo) y se realizó una electroforesis SDS-PAGE teñido con azul de coomassie, evaluando todos los pasos de purificación, mostrado en la figura 12B. En esta figura se

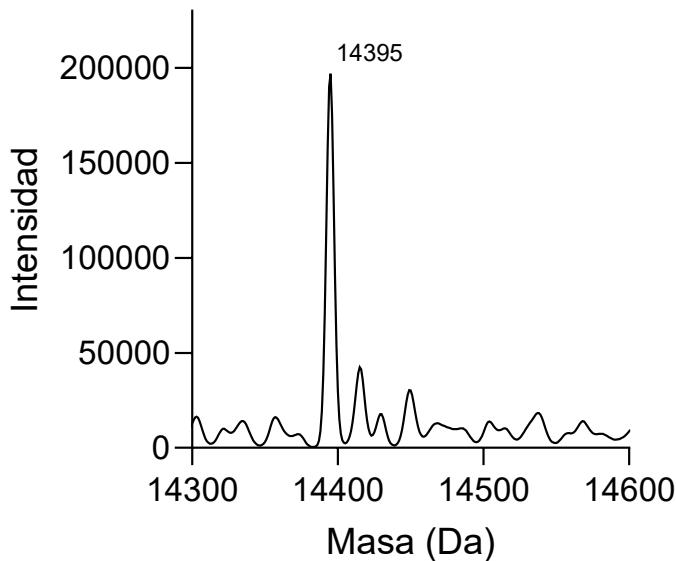
ve que la proteína purificada se comportó de forma similar en la corrida electroforética a la forma salvaje, no observándose agregados de mayor peso molecular, ni proteínas que generan contaminación significativa.



**Figura 12. Evaluación de la purificación de aS 4YF.** A. SDS-PAGE 12% y *western blot* contra aS. B. SDS-PAGE 12% teñido con azul de coomassie de las distintas fracciones de purificación.

Por último, se realizó una caracterización por espectrometría de masa (Figura 13), donde se observó la proteína purificada del peso esperado de 14395 Da, debido a la pérdida de 4 grupos hidroxilo ( $14460 - 4 \times 16 = 14396$ ). Se observó un pico minoritario +16 Da, correspondiente a la oxidación de una metionina, presente desde la purificación. Esta proteína obtenida se cuantificó por método de BCA, se fraccionó en aliquotas de 300  $\mu\text{M}$  y se almacenó a -80°C.

Previo de realizar ensayos funcionales de la proteína purificada, se debe asegurar que ésta posee propiedades estructurales similares a la proteína salvaje, ya que se pretende evaluar el impacto de las modificaciones oxidativas en los residuos de tirosina o metionina, por lo que debe descartarse que los residuos mutados sean importantes para las propiedades a evaluar y que generen diferencias importantes únicamente por ser mutados.

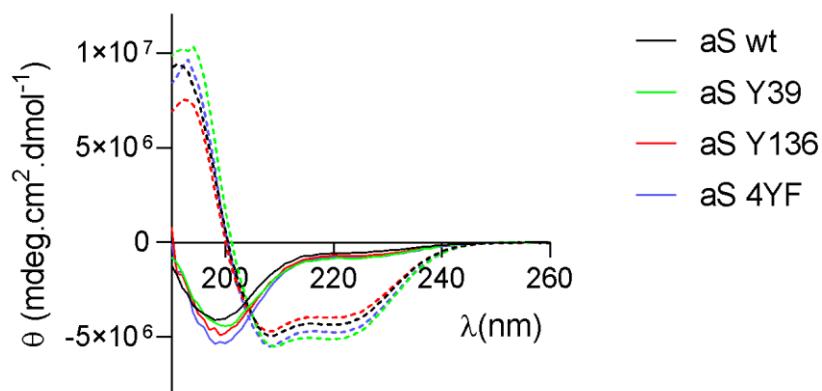


**Figura 13. Deconvolución del espectro de masa de aS 4YF.** Se confirmó la obtención del mutante aS 4YF por la presencia de una proteína de la masa esperada (14395 Da). Se observa algunos picos +16 Da.

Dado que la aS posee la habilidad de formar una estructura de  $\alpha$ -hélice en el extremo N-terminal frente al agregado de un detergente, se realizó una caracterización estructural del mutante obtenido para evidenciar si existen cambios en esta propiedad. Por lo tanto, para estudiar estas propiedades estructurales y el cambio asociado a la interacción con micelas lipídicas, se realizaron espectros de dicroísmo circular en ausencia y presencia de SDS 2 mM (Figura 14). Las proteínas monoméricas de aS salvaje y mutantes con un residuo de tirosina (Y39 e Y136) se incluyen en la figura para la comparación de todos los mutantes.

Al tratarse de proteínas intrínsecamente desordenadas, todas muestran un espectro característico con un mínimo cercano a los 200 nm, sin grandes diferencias entre ellas. En cambio, frente al agregado de SDS 2 mM, todas adoptan un espectro característico de  $\alpha$ -hélice, con mínimos en 210 y 222 nm. Esto indica que el mutante 4YF se comporta de igual forma que la proteína salvaje y los demás mutantes, formando estructuras de  $\alpha$ -hélice al interaccionar con membranas lipídicas. Como ha sido reportado previamente (288), las proteínas salvajes, Y39 e Y136 nitradas tratadas con peroxinitrito, no muestran diferencias en la formación de  $\alpha$ -hélices, teniendo espectros de DC similares tanto en ausencia como en presencia de SDS. En base a estos resultados, es posible inferir que los residuos de tirosina no son necesarios para la interacción con el detergente SDS, dado que

no se altera esta propiedad entre los mutantes. Adicionalmente, como los residuos de tirosina nitrados en las posiciones Y39 e Y136 no impiden la formación de la  $\alpha$ -hélice, la nitración tampoco afecta la interacción con lípidos. Sin embargo, una mejor resolución podría obtenerse realizando este experimento mediante la titulación con SDS a varias concentraciones, dado que diferencias en la afinidad por componentes hidrofóbicos podría verse alterada. Además, para las proteínas tratadas con peroxinitrito, se obtiene una mezcla de modificaciones, donde la proteína nitrada no es el componente mayoritario (como se verá en la sección siguiente), lo que podría enmascarar efectos en la interacción de las proteínas nitradas con componentes lipídicos.

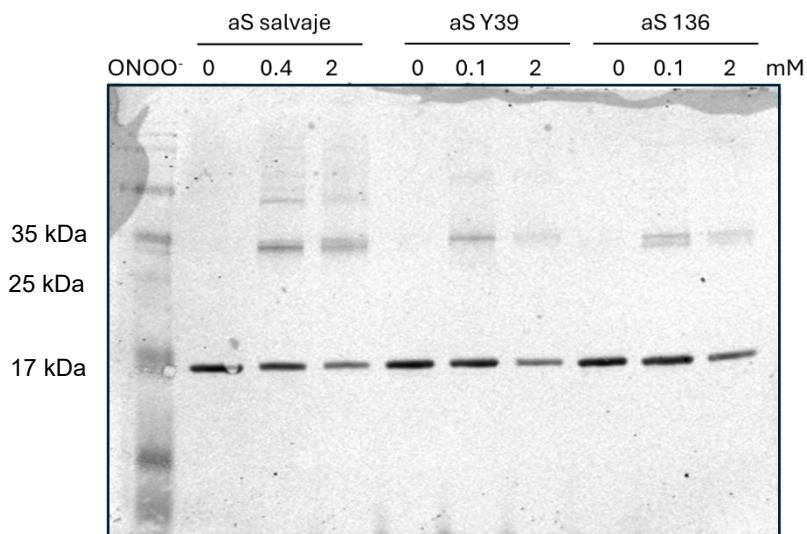


**Figura 14. Espectros de dicroísmo circular de mutantes de aS.** Se obtuvieron espectros de DC en región UV lejano para aS salvaje (wt), Y(125/133/136)F (Y39), Y(39/125/133)F (Y136), e Y(39/125/133/136)F (4YF), en ausencia (línea continua) o presencia (línea punteada) de SDS 2 mM.

#### 11.1.2 Perfil de modificaciones oxidativas por ONOO<sup>-</sup> y DNI

En trabajos previos, nuestro grupo de trabajo ha utilizado preferentemente el modelo de nitración por reacción con peroxinitrito en bolo para evaluar el impacto de la formación de 3-nitrotirosina (3-NT) en las propiedades de agregación de la aS (288). Sin embargo, una desventaja de este modelo radica en que el peroxinitrito puede reaccionar y oxidar residuos de metionina en proteínas produciendo MetO, u oxidar residuos de triptófano, por lo que no es un modelo selectivo para la formación de 3-NT. La aS cuenta con 4 residuos de metionina en su secuencia, todos potenciales blancos de oxidación por peroxinitrito, pero no contiene residuos de triptófano. Adicionalmente, puede producirse

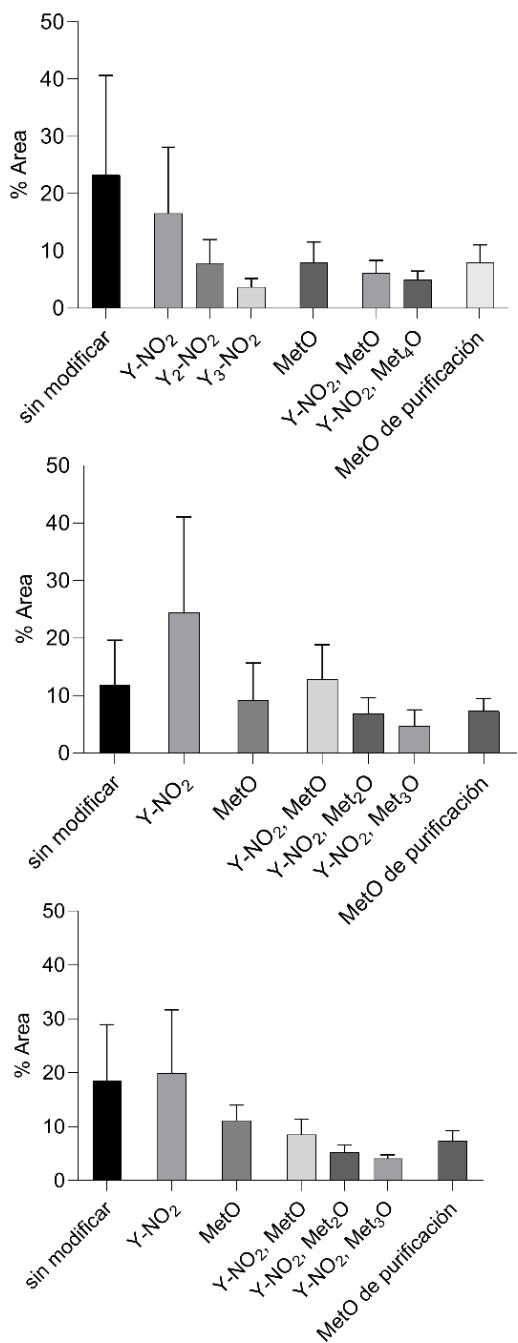
la formación de dímeros y multímeros de aS mediante entrecruzamientos 3,3'-ditirosina (Figura 15).



**Figura 15. Formación de entrecruzamientos de aS salvaje y mutantes con ONOO<sup>-</sup>.** SDS-PAGE 15% y *western blot* con anticuerpo primario contra aS donde 100  $\mu$ M de aS fueron tratadas con concentraciones crecientes de ONOO<sup>-</sup> administrado en bolo.

Con el fin de caracterizar las modificaciones oxidativas producidas por el tratamiento con ONOO<sup>-</sup>, se realizó una estimación de las modificaciones presentes utilizando los espectros de masa de las proteínas sin tratar y tratar por peroxinitrito 0,5 mM. De esta forma es posible obtener una aproximación al perfil de modificaciones producidas, y así caracterizar mejor la mezcla obtenida.

La tabla 3 muestra los pesos esperados para las distintas modificaciones oxidativas en residuos de tirosina y metionina, considerando la presencia de 4 tirosinas y 4 metioninas para la proteína salvaje y mutantes.



**Figura 16.** Perfiles de modificación de residuos de tirosina y metionina de aS tratada con  $\text{ONOO}^-$  obtenidos por MS. Las proteínas aS salvaje y mutantes Y39 e Y136 se expusieron a peroxinitrito 0.5 mM, en presencia de  $\text{HCO}_3^-$  25 mM. De los espectros de masa se calcularon las áreas de los picos asociados a las distintas especies y se cuantificaron de forma relativa. Se grafica el promedio y la desviación estándar de 3 experimentos.  $\text{Y-NO}_2$ : un residuo 3-NT.  $\text{Y}_2\text{-NO}_2$ : dos residuos 3-NT.  $\text{Y}_3\text{-NO}_2$ : 3 residuos 3-NT. MetO: un residuo MetO. Met<sub>2</sub>O: dos residuos MetO. Met<sub>3</sub>O: 3 residuos MetO. Met<sub>4</sub>O: 4 residuos MetO. *wild-type*: aS salvaje. *unmodified*: sin peroxinitrito.

**Tabla 4. Pesos moleculares de formas oxidadas.** Se calcularon los pesos moleculares esperados de las proteínas aS salvaje y mutantes para la formación de 3-NT (+45 Da) y MetO (+16 Da).

nº metioninas oxidadas

	nº tiroxinas nitratadas	nº metioninas oxidadas				
		0	1	2	3	4
aS salvaje	0	14460	14476	14492	14508	14524
	1	14505	14521	14537	14553	14569
	2	14550	14566	14582	14598	14614
	3	14595	14611	14627	14643	14659
	4	14640	14656	14672	14688	14704

aS Y39, aS Y136	0	14412	14428	14444	14460	14476
	1	14457	14473	14489	14505	14521
aS 4YF	0	14395	14411	14427	14443	14459

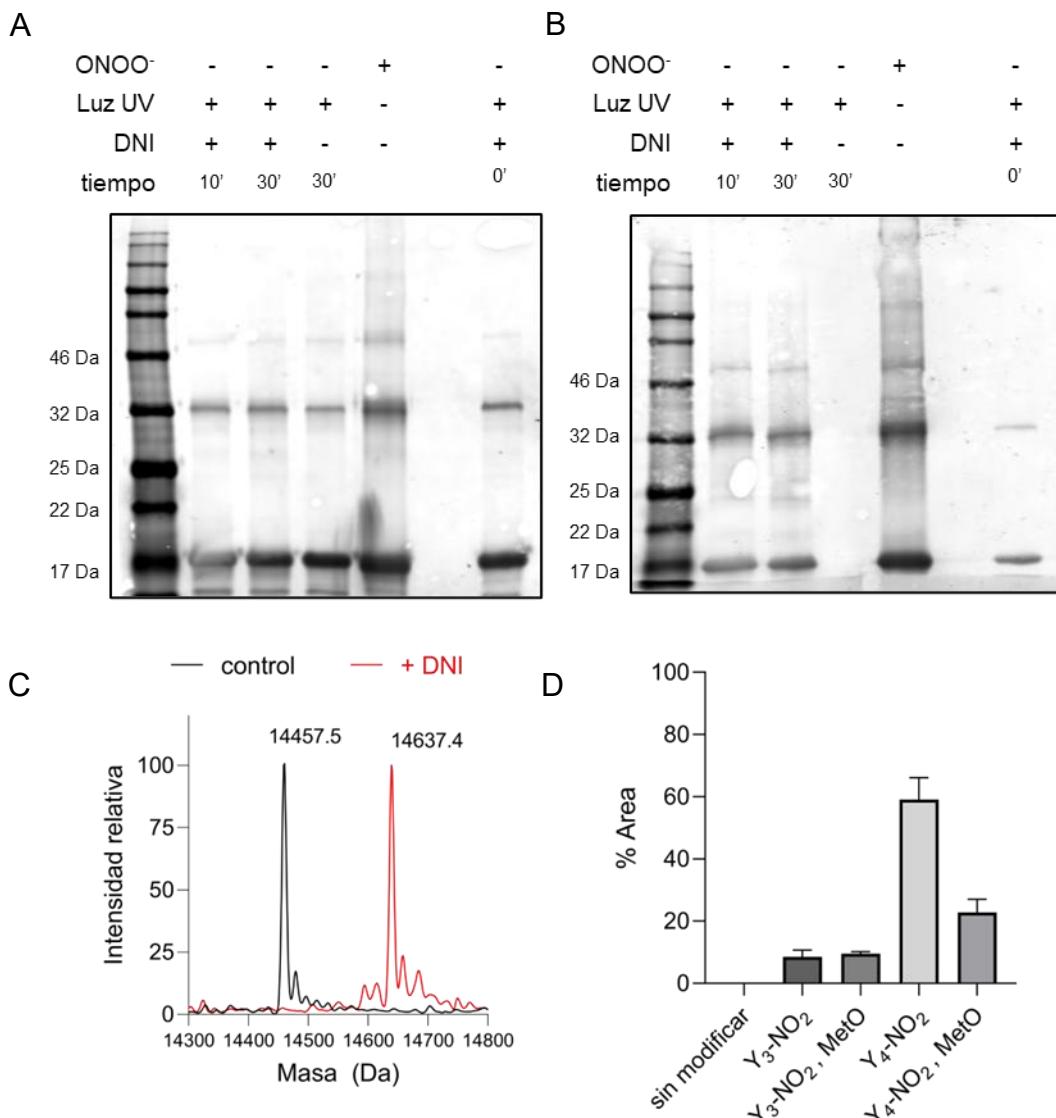
En la figura 16 y en la tabla 4 se observa el patrón de modificaciones estimado a partir de las áreas de los picos correspondientes a las especies identificadas según los pesos esperados en el espectro deconvolucionado de masa. Cabe destacar que, a partir de la purificación, la proteína purificada contiene un pequeño porcentaje correspondiente a la forma sulfóxido de metionina, alrededor del 8%. A pesar de que este método de cuantificación no es absoluto y no permite tener una medición cuantitativa de las modificaciones en los diferentes residuos, se considera que aporta una aproximación acerca de las diferentes modificaciones y su relación cualitativa.

El tratamiento con peroxinitrito produce entonces, una mezcla de proteínas modificadas. Luego del tratamiento se mantiene entre un 10 y 20% de aS sin ninguna modificación para todas las proteínas, siendo para el mutante Y39 el menor porcentaje obtenido de proteína sin modificar. El tratamiento con peroxinitrito produjo un 39%, 49% y 38% de proteína con, al menos, 1 residuo nitrado para las proteínas salvaje, Y39 e Y136, respectivamente. Sin embargo, con respecto al porcentaje de residuos de metionina oxidados, el tratamiento con ONOO<sup>-</sup> produjo un 19%, 34% y 29% para aS salvaje, Y39 e Y136, respectivamente con, al menos, una metionina oxidada. Por lo tanto, el efecto sobre la agregación de estas proteínas puede deberse a distintas modificaciones o a un efecto sinérgico entre ellas.

Con motivo de ahondar en el mecanismo de inhibición de la fibrilización inducido por la 3-nitrotirosina observado en trabajos previos, se realizaron dos abordajes: i) la utilización de un agente de nitración diferente con mayor selectividad hacia la nitración de residuos de tirosina, y ii) la oxidación del mutante 4YF descrito previamente, que permite evaluar el efecto de la oxidación de metioninas tras el tratamiento con peroxinitrito.

**Tabla 5. Porcentaje de especies obtenidas por tratamiento con ONOO<sup>-</sup>.** Promedios de los porcentajes de modificaciones obtenidos según espectros de masa en figura 15.

		nº metioninas oxidadas						
		0	1	2	3	4	MetO desde purificación	
aS salvaje	0	23	8	-	-	-	8	
	1	17	6	-	-	-		
	2	8	-	-	-	5		
	3	4	-	-	-	-		
	4	-	-	-	-	-		
	Y39	0	12	9	-	-	7	
		1	25	13	7	5	-	
Y136		0	19	11	-	-	9	
		1	20	9	5	4	-	

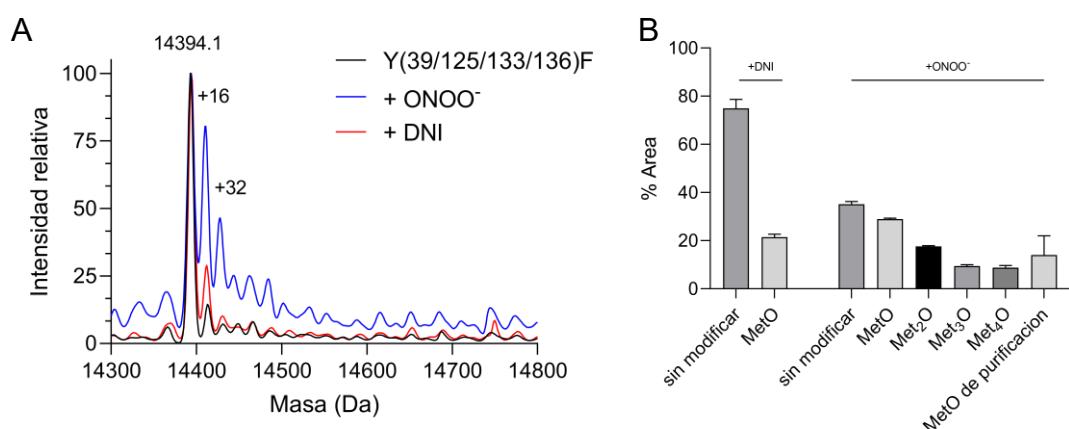


**Figura 17. Perfiles de modificación de residuos de tirosina y metionina de aS salvaje empleando DNI y luz UV.** A y B. SDS-PAGE 12% y western blot contra aS (A) o contra 3-NT (B). C. Deconvoluciones de espectrometría de masa de aS salvaje (*wild-type*) sin tratar y tratada con DNI y luz UV 30'. D. cuantificación relativa de las áreas de los picos en figura C. Se grafica el promedio y la desviación estándar de 3 experimentos. Y<sub>3</sub>-NO<sub>2</sub>: 3 residuos 3-NT. Y<sub>4</sub>-NO<sub>2</sub>: 4 residuos 3-NT MetO: un residuo MetO. *wild-type*: aS salvaje. *unmodified*: sin peroxinitrito.

En cuanto al primer abordaje, se comenzó analizando la capacidad de nitración de aS y la selectividad de formación de 3-NT frente a la formación de MetO por el DNI (Figura 17). El DNI, un compuesto imidazólico recientemente sintetizado por el laboratorio, se ha descrito como un dador de  $\bullet\text{NO}_2$  en presencia de luz UV (184). El mecanismo de nitración aún se encuentra en estudio, pero se basa en una reacción radicalaria que implica la ruptura homolítica del enlace C-N con el grupo nitro, y la salida del grupo nitro en forma de radical  $\bullet\text{NO}_2$  que conduce a la generación del radical tirosilo y nitración del anillo fenólico.

La nitración de aS salvaje con DNI y luz UV se confirmó mediante *western blot* utilizando anticuerpos contra nitrotirosina, con el cual se obtuvo señal para la proteína tratada pero no para los controles sin irradiar y sin DNI (Figura 17 A y B). Cómo se observa en el carril 7, a tiempo 0 ya se apreció la aparición de señal para 3-NT, lo que indica que es una reacción rápida o que la luz ambiente puede inducir la producción de radicales. En comparación con el tratamiento con  $\text{ONOO}^-$ , la formación de entrecruzamientos de alto peso molecular mediados por DiTyr es menor (aproximadamente 90% menor que el tratamiento con  $\text{ONOO}^-$ ) encontrándose en menor cantidad la aparición de especies diméricas sin aumentar la formación de especies triméricas. Cabe notar la presencia de estos dímeros en la proteína sin tratar, lo que puede ser indicativo de una muestra envejecida. El tratamiento con DNI, además, no produjo un aumento relevante en la formación de MetO, permitiendo obtener cerca del 60% de la proteína con los 4 residuos de tirosina nitrados (figura 17 C y D), con el 98 % de aS con por lo menos una tirosina nitrada. Por lo tanto, este parece ser un sistema mucho más selectivo y con mayor rendimiento para obtener la forma nitrada de aS.

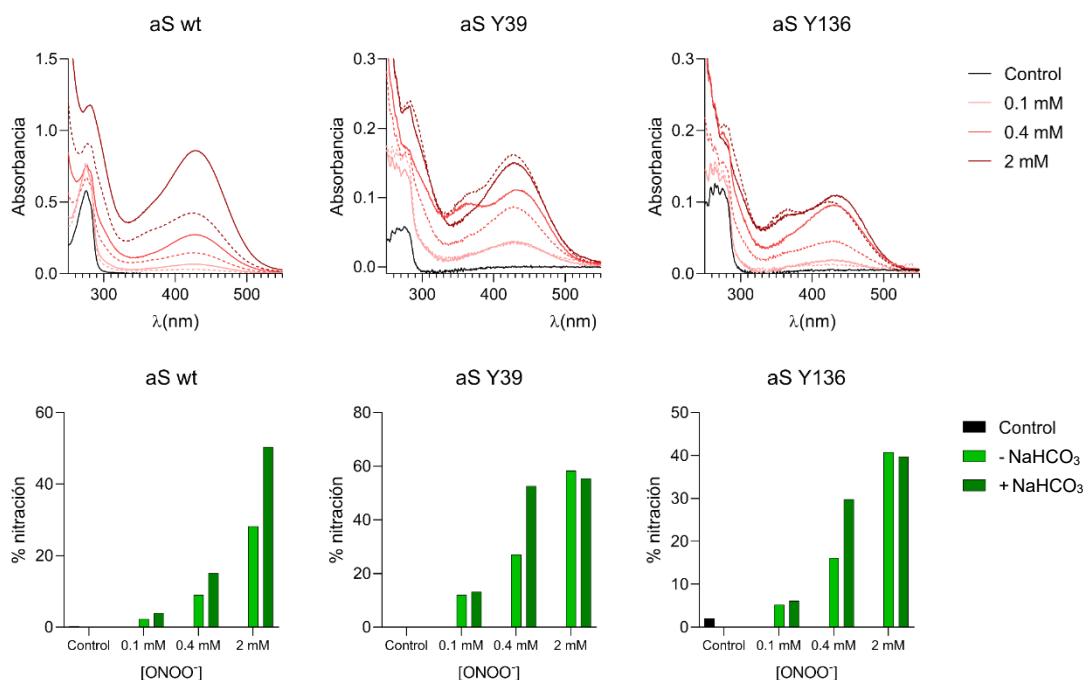
En el mismo sentido, el tratamiento de aS 4YF con DNI generó un aumento en la formación de MetO (más allá del porcentaje que se cuenta desde la purificación), obteniéndose cerca del 80% de la proteína sin modificar, como muestra la figura 18. Sin embargo, esta modificación representa un 32% en comparación al 60% producido por  $\text{ONOO}^-$ . Con estos resultados se concluye que el DNI es un agente nitrante más selectivo que el peroxinitrito, y produce un mayor rendimiento de nitración.



**Figura 18. Perfiles de modificación de residuos de tirosina y metionina del mutante 4YF con peroxinitrito o DNI.** A. Deconvoluciones de espectrometría de masa de aS 4YF sin tratar, tratada con 0.5 mM de  $\text{ONOO}^-$ , o con DNI y luz UV 30°. B. Cuantificación relativa de las áreas de los picos en A. Se grafica el promedio y la desviación estándar de 3 experimentos. MetO: un residuo MetO. Met<sub>2</sub>O: dos residuos MetO. Met<sub>3</sub>O: 3 residuos MetO. Met<sub>4</sub>O: 4 residuos MetO.

En cuanto al segundo abordaje, el tratamiento del mutante 4YF con peroxinitrito produjo las diferentes combinaciones de MetO, como muestra la figura 18. Se observó cerca de un 60% de aS con por lo menos una metionina oxidada, que representan cerca de un 40% con un residuo MetO, hasta cerca 10% con las 4 metioninas oxidadas, quedando así un 40% de la proteína sin modificar.

Por otro lado, es posible utilizar una estrategia complementaria a los espectros de masa para cuantificar la concentración de 3-nitrotyrosina utilizando sus propiedades espectrales. El espectro de absorción de la 3-NT depende del pH, teniendo un pico característico a 430 nm a pH básico y otro a 350 nm a pH ácido. Sin embargo, presenta un punto isosbético a 381 nm que puede utilizarse para calcular su concentración a cualquier pH según un  $\epsilon$  reportado de  $2200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (293,294). Luego de reaccionar aS con ONOO<sup>-</sup> a distintas concentraciones, se obtuvieron espectros UV-vis y se cuantificó la concentración proteica por BCA. En la figura 19 se muestran los espectros obtenidos junto con las cuantificaciones por absorbancia del porcentaje de nitración. Para obtener el rendimiento de nitración, y dado que el  $\epsilon_{280}$  de una proteína se modifica al nitrarse, los valores de concentración de 3-NT fueron normalizados por la concentración de proteína total medida por el ensayo de BCA, multiplicado por la cantidad de tirosinas proteicas.



**Figura 19. Cuantificación de 3-NT por espectrofotometría.** Arriba. Espectros de absorción UV-visible de  $100 \mu\text{M}$  aS salvaje y mutantes tratadas con concentraciones crecientes de ONOO<sup>-</sup>. Línea punteada: sin NaHCO<sub>3</sub>. Línea continua: con NaHCO<sub>3</sub> 25 mM. Abajo. Cálculo de porcentaje de nitración a partir de los espectros correspondientes como  $[3\text{-NT}]/[\text{Tyr}]^*100$ . n = 1 réplica

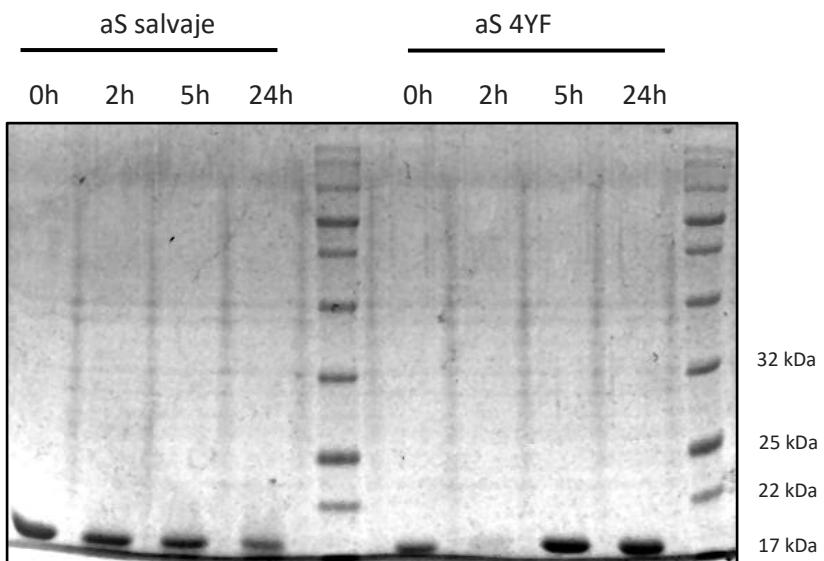
Para este experimento se trató con diferentes concentraciones de ONOO<sup>-</sup> las proteínas aS salvaje y mutantes con una tirosina, en presencia o ausencia de NaHCO<sub>3</sub> 25 mM, dado que la presencia de bicarbonato puede modificar los rendimientos de nitración. Se utilizaron concentraciones de ONOO<sup>-</sup> de 0,1 mM, 0,4 mM para tener concentraciones equimolares a la concentración de tirosina y 2 mM. Para la condición de 0,4 mM de ONOO<sup>-</sup> y 25 mM de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (similar al experimento por espectrometría de masa, solo que se utilizaba una concentración de 0,5 mM de ONOO<sup>-</sup>), se obtiene un rendimiento de nitración del 15% para la proteína salvaje y 50% para el mutante Y39, y 30% para Y136. Es necesario considerar que el valor de épsilon reportado para nitrotirosina corresponde a esa molécula en solución y no corresponde a un residuo de nitrotirosina unida a proteínas.

En cuanto a la presencia de bicarbonato en el amortiguador de nitración, este tiene mayor efecto cuando la relación ONOO<sup>-</sup>:tirosina es aproximadamente 5:1 para la proteína salvaje ([ONOO<sup>-</sup>] = 2 mM), y 4:1 para las proteínas mutantes ([ONOO<sup>-</sup>] = 0,4 mM). En cambio, para una relación 1:1 para la todas las proteínas no se ve un efecto significativo del bicarbonato, así como tampoco para una relación 20:1 utilizado en las proteínas mutantes.

El CO<sub>2</sub> disuelto en el amortiguador de nitración (aproximadamente 2,3 mM) reacciona con el ONOO<sup>-</sup>, lo que forma una mayor cantidad de especies radicalarias que forman radical tirosilo y radical •NO<sub>2</sub>, aumentando con ello el rendimiento de nitración. Sin embargo, cuando la relación ONOO<sup>-</sup>:tirosina es alta, el porcentaje de nitración no se afecta por la presencia de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, llegando a valores entre el 40% y 50% de nitración. Este abordaje está en concordancia con lo obtenido por espectrometría de masa, aunque no para la forma salvaje, quizá debido a la gran variabilidad observada en los espectros de masa para nitración por peroxinitrito. Sin embargo, esta metodología por espectros de absorción no permite evidenciar las otras modificaciones por peroxinitrito. En base a estos resultados, es posible concluir que se logró caracterizar la mezcla de productos obtenidos por la reacción de la aS con peroxinitrito, obteniéndose una mezcla de modificaciones, y donde continúa quedando un porcentaje de la aS sin modificar.

### 11.1.3 Formación de 3,3'-ditirosina

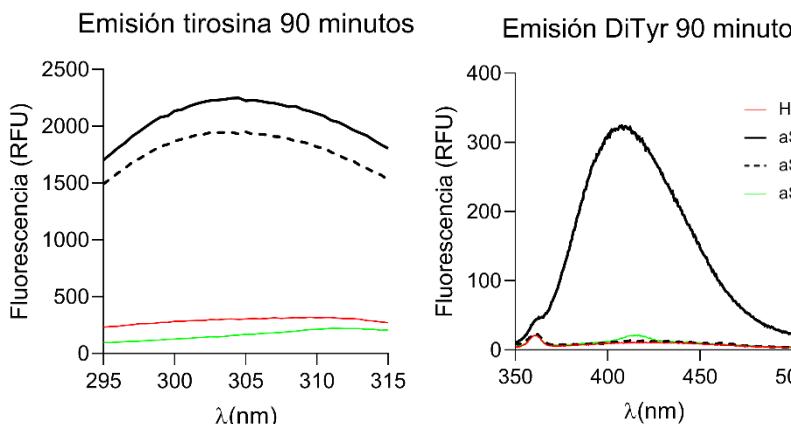
La formación de dímeros 3,3'-ditirosina se ha reportado como un evento que puede inhibir la formación de fibras de aS (295,296). Con el objetivo de formar dímeros DiTyr y evaluar los efectos de dímeros formados por entrecruzamientos entre las tirosinas Y39 (entrecruzamientos Y39-Y39) e Y136 (entrecruzamientos Y136-Y136), se buscó la formación de estos dímeros a partir de los mutantes Y39 e Y136. Se utilizaron varios métodos reportados (297–302) para la oxidación de aS y formación de estas especies diméricas i) oxidación con átomos de Cu<sup>2+</sup> ii) oxidación con la enzima peroxidasa de rábano (HRP) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, y iii) con un compuesto termolábil dador de especies radicalares del oxígeno •ROO 2,2'-azobis-(2-amidinopropano) dihidrocloruro (ABAP, Wako). La formación de DiTyr se evaluó utilizando sus propiedades de fluorescencia intrínseca ( $\lambda_{\text{ex}} = 325$  nm y  $\lambda_{\text{em}} = 410$  nm), así como por *western blot*.



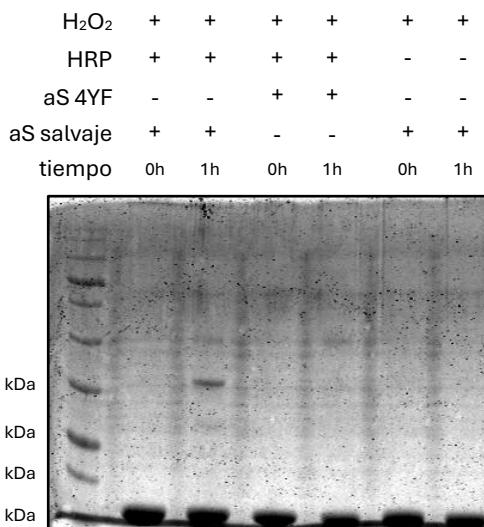
**Figura 20. Formación de DiTyr con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y Cu<sup>2+</sup>.** 50 μM de aS salvaje o mutante 4YF fueron incubados con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1.25 mM y CuCl<sub>2</sub> 50 μM a 37°C con agitación. 10 μL de reacción fueron extraídos y se agregó EDTA para detener la reacción. Se analizaron las muestras por SDS-PAGE 12% y *western blot* con anticuerpos contra aS.

Se comenzó incubando aS salvaje con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y Cu<sup>2+</sup> para evaluar la formación de DiTyr y se fueron extrayendo alícuotas a diferentes tiempos. Estas muestras fueron analizadas por *western blot* con anticuerpos contra aS y no mostraron formación de entrecruzamientos ni formación de agregados de alto peso molecular. Se incluyó la reacción con el mutante sin tirosinas 4YF como control negativo, para el cual tampoco se observó reacción (Figura 20).

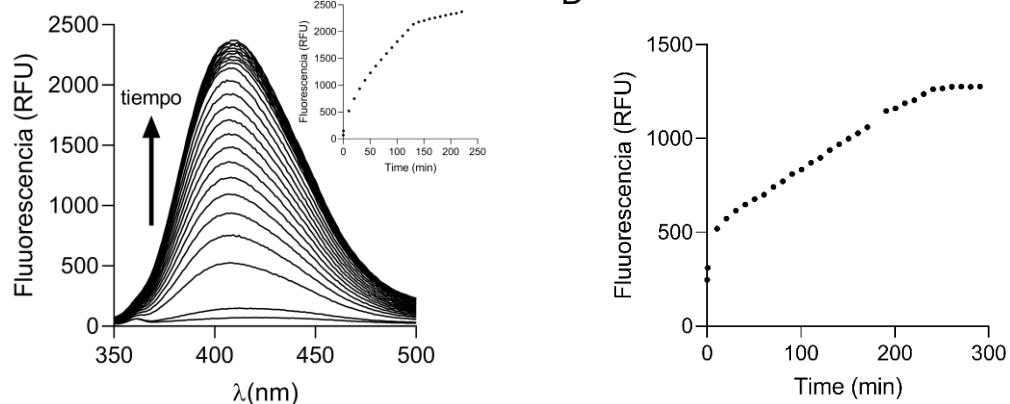
A



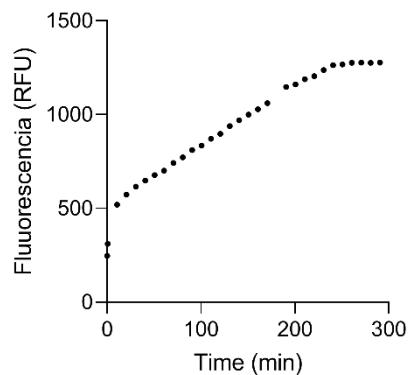
B



C



D

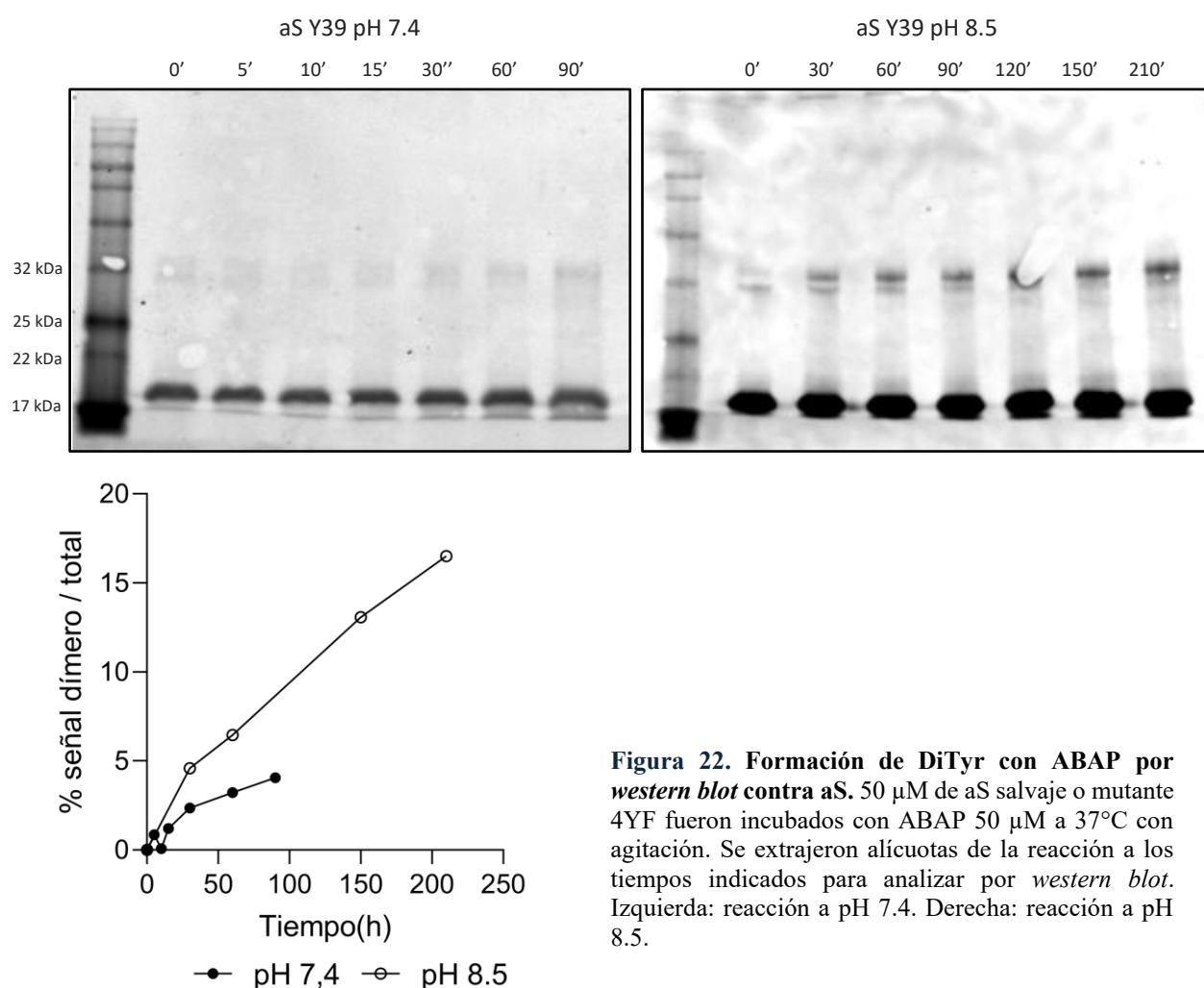


**Figura 21. Formación de DiTyr con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y HRP.** 50 μM de aS salvaje o mutantes (Y39 y 4YF) fueron incubados con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,25 mM y HRP 2 μM a 37°C con agitación. La reacción se monitoreó por fluorescencia y *western blot* de los tiempos inicial y final. A. Cambios de fluorescencia de tirosina ( $\lambda_{ex} = 275$  nm  $\lambda_{em} = 315$  nm) y de DiTyr ( $\lambda_{ex} = 325$  nm  $\lambda_{em} = 410$  nm) para aS salvaje y 4YF. B. Espectros de emisión de DiTyr en el tiempo para aS salvaje y en el inserto se representa la intensidad de fluorescencia a 410 nm. C. Curso temporal a 410 nm para aS Y39 con HRP y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. D. *western blot* de muestras en A. n = 1 réplica

Otro método utilizado consistió en incubar aS con HRP y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Para ello, se incubó aS salvaje 50 μM con la enzima HRP 2 μM y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 250 μM. Se analizaron cambios en los espectros de fluorescencia en el tiempo, analizando cambios a tiempo inicial y final con controles sin HRP y con el mutante 4YF (Figura 21). Adicionalmente, se realizó el ensayo con el mutante Y39. Analizando este resultado, se observó la formación de DiTyr por el aumento de la intensidad de fluorescencia a 410 nm en el tiempo y la aparición de una banda visible por *western blot* con un peso correspondiente al dímero de aS (28 kDa, la cual migra como 32 kDa). No se observó este efecto en ausencia de HRP ni para el mutante 4YF, por lo que la señal es dependiente de tirosina. Se observó una pérdida de emisión de tirosina (Figura 21A). Se logró el mismo efecto

(aunque con menor intensidad) para el mutante Y39 (Figura 21C), donde se formarían dímeros entre dos tirosinas en el extremo N-terminal.

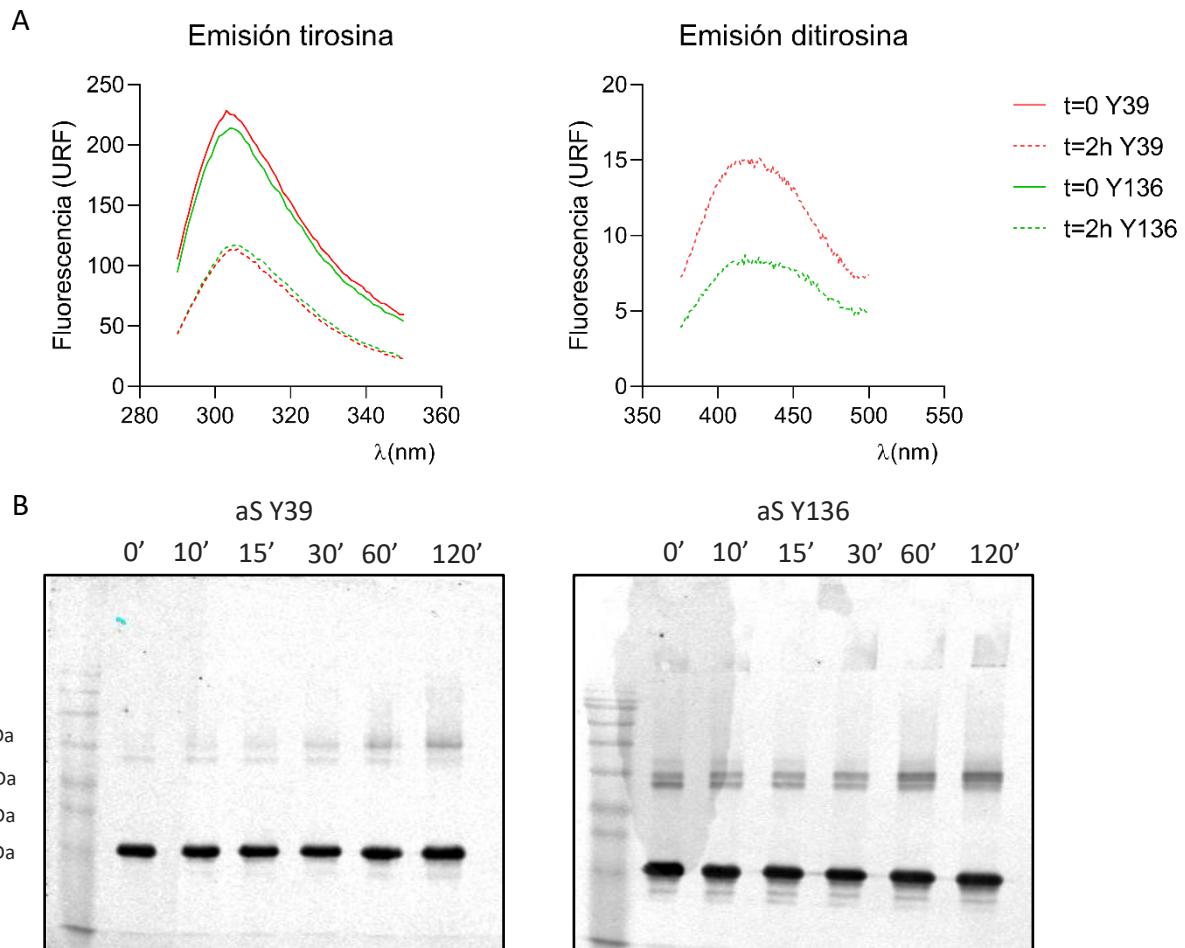
Como último método para formar estos entrecruzamientos, se incubó aS con el dador termolábil de radicales  $\bullet\text{ROO}$  ABAP. Se incubó aS 50  $\mu\text{M}$  Y39 e Y136 con 50  $\mu\text{M}$  de ABAP en amortiguador fosfato 100 mM a pH 7,4 y se extrajeron alícuotas en el tiempo para analizar por *western blot* (Figura 22). Se observó un aumento dependiente del tiempo de una banda correspondiente al dímero de aS. Sin embargo, para aumentar aún más el rendimiento de formación de DiTyr se realizó el ensayo a un pH más alcalino, pH 8,5, lo que favorece la liberación de  $\bullet\text{ROO}$  (Figura 22).



**Figura 22. Formación de DiTyr con ABAP por western blot contra aS.** 50  $\mu\text{M}$  de aS salvaje o mutante 4YF fueron incubados con ABAP 50  $\mu\text{M}$  a 37°C con agitación. Se extrajeron alícuotas de la reacción a los tiempos indicados para analizar por *western blot*. Izquierda: reacción a pH 7,4. Derecha: reacción a pH 8,5.

Dado que a pH 8,5 se observó una mayor cantidad de formación de DiTyr (aproximadamente 3 veces superior), se realizó esta reacción para aS Y39 e Y136 a este pH, analizando los resultados tanto por *western blot* como por fluorescencia (Figura 23). Se observó la formación de dímeros unidos por entrecruzamientos DiTyr de aS unidos

desde el extremo N-terminal como C-terminal. Sin embargo, el rendimiento de obtención es bajo (la relación de intensidades dímero/proteína total por *western blot* es aproximadamente 0,1) por lo que no pudo lograrse una cantidad de dímero purificado aceptable para utilizar en ensayos de agregación y evaluar de los distintos entrecruzamientos en este proceso, dada la gran concentración de proteína requerida.



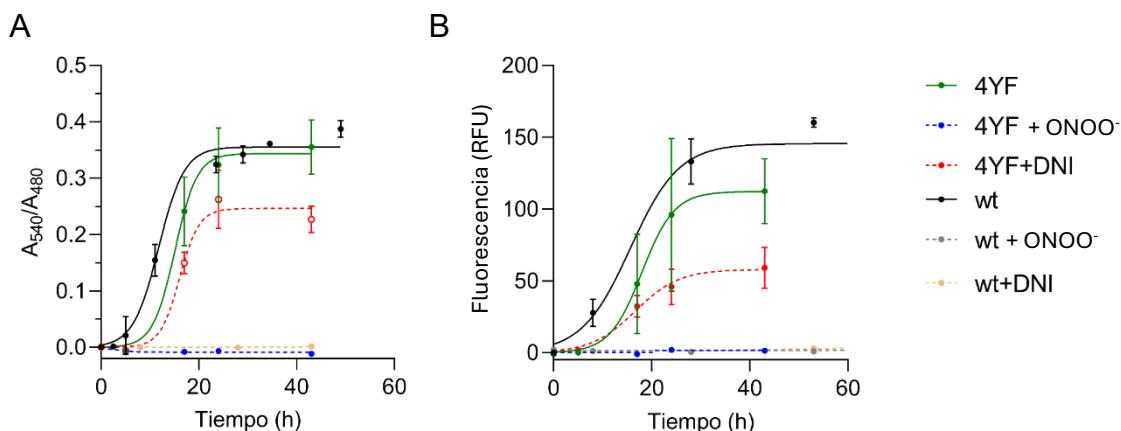
**Figura 23. Formación de DiTyr con ABAP para aS Y39 e 136 a pH 8.5.** A. Formación de DiTyr por reacción con ABAP durante 2h a pH 8.5 analizando los espectros de fluorescencia de tirosina y DiTyr. B. *Western blot* para la reacción en A con anticuerpos contra aS. Se observa la aparición de bandas correspondientes al dímero de aS.

La nitración de tirosina y formación de dímeros DiTyr en aS son modificaciones que pueden ocurrir de forma simultánea durante el estrés oxidativo. Los modelos de nitración clásicos como tratamiento con  $\text{ONOO}^-$  producen la formación de estos entrecruzamientos, por lo que su presencia en los cuerpos de Lewy no tardó en especularse (37,164), y han sido identificados en modelos animales de EP (303). Estos entrecruzamientos DiTyr en aS fueron detectados en cuerpos de Lewy de pacientes con EP por técnicas como *inmunogold* y microscopía MET (300). Por otro lado, utilizando

métodos de oxidación para formar entrecruzamientos *in vitro* utilizando iones de Cu<sup>2+</sup>, se encontró que se forman preferentemente dímeros entre tirosinas Y39, lo que sugiere que esta posición puede tener relevancia en la formación de cuerpos de Lewy (300). Aislar estas especies diméricas Y39-Y39 para analizar su impacto en las propiedades de agregación de aS monomérica es importante para comprender el rol de las diferentes modificaciones oxidativas en la formación de agregados proteicos de aS.

#### 11.1.4 Impacto de 3-NT y MetO en la capacidad de formación de fibras y oligómeros.

La capacidad de formación a fibras se evaluó por dos métodos diferentes: i) por cambios espectrales en la unión de la sal roja Congo y ii) por aumento de fluorescencia por la unión de la sonda Tioflavina T a estructuras en hoja-β, como muestra la figura 24 y tabla 5.



**Figura 24. Formación de fibras de aS salvaje y 4YF oxidadas.** Agregación de aS medida por Rojo Congo (A) y Tioflavina-T (B). Los datos se ajustaron a una ecuación sigmoidea  $y = \frac{a}{1+e^{-\frac{x-x_0}{b}}}$ . Se representan promedios de 3 réplicas ± SEM.

**Tabla 6.** Tiempo medio en horas de agregación ( $t_{1/2}$ ) en horas para aS tratada con ONOO<sup>-</sup> o DNI. Se reporta el intervalo a 95% de confianza. Ind: indeterminado.

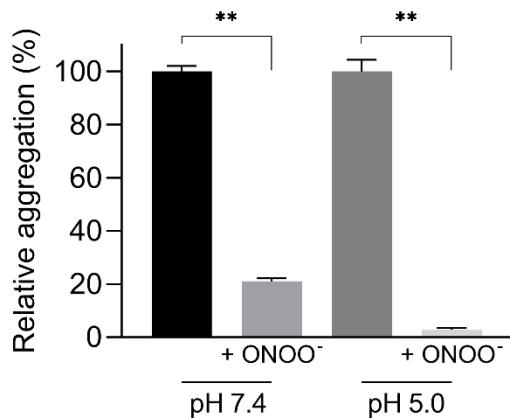
	RC (h)	Th-T (h)
aS 4YF	15.11 (8.86-18.70)	18.02 (ind)
aS 4YF + PN	-	-
aS 4YF + DNI + UV	16.07 (11.58-18.11)	16.65 (9.47-31.08)
aS salvaje	11.79 (10.71-14.87)	15.65 (ind)
aS salvaje + PN	-	-
aS salvaje + DNI + UV	-	-

Bajo las condiciones de agregación, la proteína 4YF presentó un  $t_{1/2}$  de agregación según el ensayo RC de 15,11 h, similar al obtenido para la proteína salvaje de 11,79 h,

por lo que los residuos de tirosina no parecen tener un rol significativo en las propiedades amiloidogénicas de la aS. En contraste, el tratamiento con peroxinitrito inhibe la agregación de las proteínas salvaje y mutante 4YF, lo que indica que la oxidación de aminoácidos diferentes a la tirosina contribuye al efecto inhibitorio, en particular la formación de MetO. Estos resultados analizados hasta ahora muestran que la proteína mutante 4YF se comporta de manera similar a la proteína salvaje. Por otro lado, utilizando el agente nitrante DNI, de forma esperable, la nitración de la proteína salvaje inhibe la agregación a fibras, mientras que el tratamiento del mutante 4YF con DNI (y, por ende, sin nitrotirosina ni gran formación de MetO) mantiene sus propiedades de agregación ( $t_{1/2} = 16,07$  h vs 16,11 h para el ensayo de RC). Por tanto, la nitración de tirosinas es una modificación que inhibe la amiloidogénesis de aS, al igual que la oxidación de metioninas, visto por el mutante 4YF tratado con peroxinitrito. Es interesante notar que, el porcentaje de MetO, siendo menor que el porcentaje de 3-NT, puede igual ejercer un efecto de inhibición en la formación de fibras, proceso que se ve inhibido completamente.

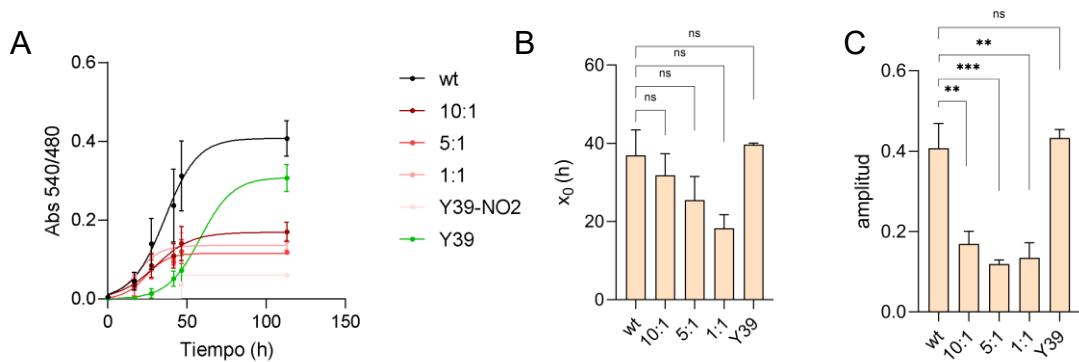
La presencia del grupo nitro en la estructura de la aS, plantea la posibilidad de que el efecto inhibitorio en la agregación sea debido a la carga negativa introducida (por la mayor desprotonación del fenol), o simplemente un efecto estérico debido al tamaño del grupo añadido. La carga negativa generada proviene de que el  $pK_a$  del grupo fenólico disminuye 3 unidades (de 10 a 7) al formarse 3-NT. Usando la ecuación de Henderson y Hasselbach para ácidos débiles, es posible calcular que la formación de 3-NT a pH 7,4 implica pasar de una relación  $[Tyr-O^-]/[Tyr-OH] = 2,51 \times 10^{-3}$  a 1.58, dejando la mayoría de los residuos de tirosina en su forma aniónica, de fenolato. Sin embargo, a pH 5,0, la formación de 3-NT deja una relación  $[Tyr-O^-]/[Tyr-OH] = 6,31 \times 10^{-3}$ , donde la mayoría de los residuos de tirosina permanecen en estado protonado. Este análisis toma en cuenta que los valores de  $pK_a$  para tirosina y nitrotirosina, corresponden a los valores para aminoácidos libres, y no formando parte de una cadena polipeptídica. Sin embargo, dada las características estructurales de la aS, la cual es intrínsecamente desordenada, es esperable que estos valores sean similares a los reportados, y que, además, sean similares entre los 4 residuos. Para evaluar si el efecto de la nitrotirosina se debe a la carga negativa del fenolato, se realizó el ensayo de formación de fibras para la proteína sin nitrar y nitrada con peroxinitrito a pH 7,4 y a pH 5,0. Al trabajar a pH 5,0, los grupos hidroxilo de la 3-NT se mantienen protonados y se elimina la carga negativa adquirida, manteniendo únicamente el efecto estérico. Realizando el ensayo de agregación a este pH, no se observó una recuperación de la capacidad de agregación (Figura 25), lo que sería

esperable observar si el efecto inhibitorio se debiese al fenolato. Este resultado sugiere que la inhibición observada no se debe a un efecto de la carga, sino a un efecto estérico del grupo nitro (en adición al efecto de otras modificaciones). Esto podría explicar la independencia de la ubicación del grupo  $-NO_2$  en la secuencia de la aS, ya que el efecto inhibitorio ocurre tanto para la nitración en Y39 como en Y136.



**Figura 25. Efecto del pH en la formación de fibras de aS nitrada.** Se realizó el ensayo de formación de fibras a pH 7.4 y pH 5. Se grafica el porcentaje de inhibición con respecto a la condición sin nitrar de cada pH, considerando el máximo de intensidad en la fase estacionaria. Unpaired t-test P-value < 0.001. n = 3

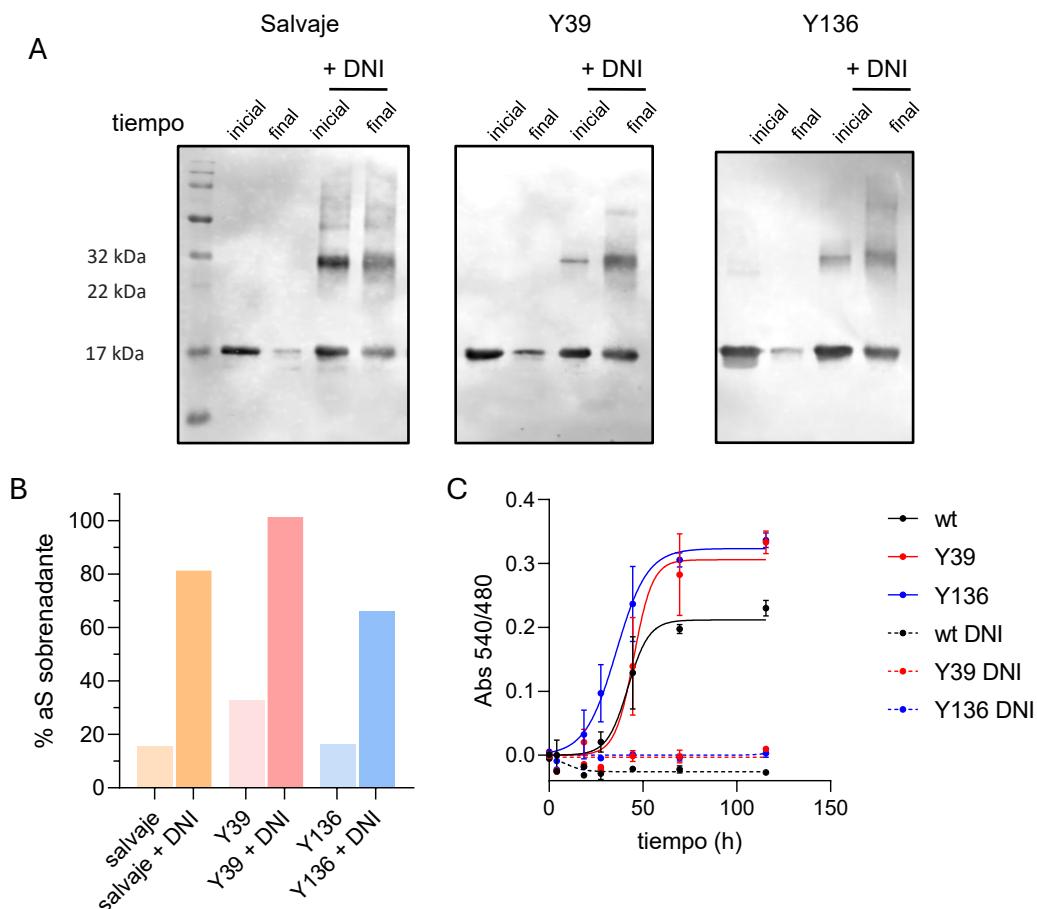
Por otro lado, se planteó analizar la dependencia del efecto de la nitración con la concentración de 3-NT. Para ello, se realizó el ensayo de agregación para la proteína salvaje, mezclada con concentraciones crecientes de aS Y39 nitrada con DNI (Figura 26). Se utilizaron proporciones [salvaje]:[Y39-NO<sub>2</sub>] de 10:1, 5:1 y 1:1, observándose que no hay alteraciones en la cinética de agregación medida con el tiempo medio de agregación, mientras que la cantidad total de fibras formadas es drásticamente menor a partir de una relación 10:1, observado por la amplitud del ajuste. Por lo tanto, esto parecería indicar que una pequeña cantidad de nitrotirosina es capaz de producir un efecto inhibitorio en la generación de fibras, no mostrando un gran impacto en la cinética del proceso. Aún resta investigar si los residuos de aS nitrados son incorporados a las fibras formadas, o si las fibras contienen solo aS sin modificar. Esto podría realizarse con técnicas como *western blot* de las fibras purificadas o espectrometría de masa de las fibras digeridas, así como inmunodetección con anticuerpos conjugados a nanopartículas de oro visibles por microscopía electrónica.



**Figura 26. Efecto dosis dependiente de la nitración en la tirosina 39.** A. Se realizó el ensayo de formación de fibras con aS salvaje con distintas proporciones de aS Y39 nitrada con DNI. Las curvas se ajustaron a una función sigmoidal  $y = \frac{a}{1+e^{-\frac{x-x_0}{b}}}$ . B y C. Parámetros obtenidos del ajuste sigmoidal, el tiempo medio de agregación (B) y la amplitud (C) del ajuste. n = 2

Al contar con los mutantes de aS que presentan una única tirosina en el extremo N-terminal o C-terminal y el agente de nitración DNI, se trataron ambos mutantes con DNI y luz UV para generar las especies nitradas y evaluar si la ubicación de la 3-NT en la secuencia de la aS tiene efectos diferenciales, como modelo más selectivo que el tratamiento con ONOO<sup>-</sup>. El resultado de la agregación se observa en la figura 27. La agregación de las proteínas mutantes Y39 e Y136 se observó por aumento en el cociente de absorbancias 540/480 en el ensayo RC. Se observó una diferencia con la proteína salvaje al tiempo final, lo que remarca la gran variabilidad de estos ensayos y por ende, la importancia de corroborar esta metodología por electroforesis. Para ello, se corroboró la agregación a fibras analizando por *western blot* con anticuerpos contra aS la fracción soluble al tiempo final de agregación luego de centrifugar a 100000 g durante 40 minutos. Se observó que, para las proteínas sin tratar con DNI, aumenta la señal de CR en el tiempo, así como la desaparición de aS en la fracción soluble. En contraposición, el tratamiento con DNI, y por ende nitración, inhibe la formación de fibras independiente de la ubicación del residuo de tirosina en la secuencia de la aS. Esta aproximación es novedosa para el laboratorio, y aunque se habían obtenido condiciones para las cuales el tratamiento con DNI y luz UV minimiza la generación de entrecruzamientos DiTyr, este experimento fue realizado bajo una lámpara UV recientemente adquirida por lo que se generaron importantes cantidades de estos entrecruzamientos. Por lo tanto, es importante continuar poniendo a punto las condiciones de nitración que disminuyan la formación de otros productos para eventualmente tener una herramienta que permita evaluar el efecto de la nitración de residuos de tirosina sitio-específica, algo valioso al contar con los mutantes Y39 e Y136. Estos resultados obtenidos contrastan con algunos publicados en la literatura

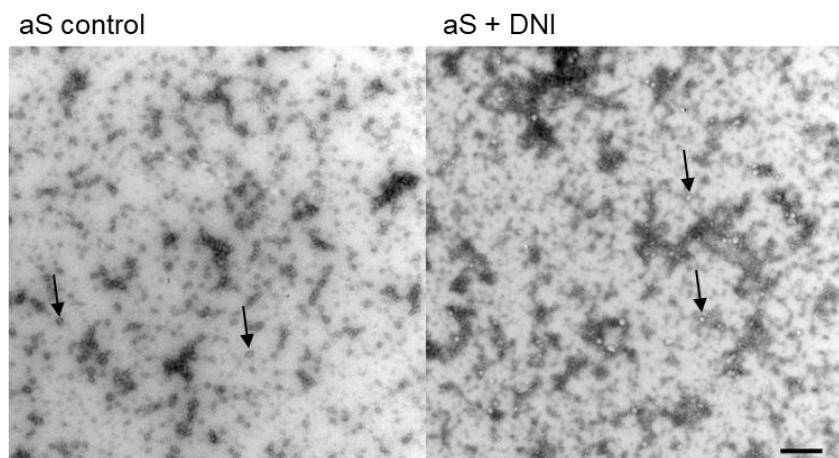
que muestran que la nitración en la tirosina Y39 o Y125 (otra tirosina del extremo C-terminal), no impacta en la cinética de formación de fibras, sino que produce fibras de menor tamaño (289). Estos autores afirman que la nitración induce no solo cambios cinéticos, sino morfológicos, por lo que la afinidad de los agregados formados por las sondas no son comparables a la forma sin tratar. Corroborar por microscopía electrónica sería una buena estrategia para evaluar si efectivamente existe formación de agregados amiloides en las proteínas mononitradas en las tirosinas Y39 e Y136.



**Figura 27. Efecto en la agregación de aS mediado por nitración en extremo N-terminal o C-terminal.** A. SDS-PAGE 15% y *western blot* contra aS de tiempos inicial y final de sobrenadantes luego de centrifugar las muestras de agregación. B. Cuantificación de intensidad de carriles de tiempo final contra tiempo inicial para cada condición. C. Cinética de agregación por Rojo Congo. A y B, n = 1. C, n = 3.

Visto que la nitración por peroxinitrito y por DNI inhibe la formación de fibras de aS, se evaluó si la capacidad de formación de oligómeros se ve alterada. Para ello utilizamos la proteína aS salvaje nitrada con DNI, dado que fueron las condiciones en las que se obtuvo la mayor selectividad y rendimiento de nitración, y a partir de allí se realizó la agregación a oligómeros. Se lograron purificar oligómeros formados a partir del

monómero nitrado y se observaron por MET (Figura 28). En vista de este resultado, es posible concluir que la nitración no afecta la formación de oligómeros, dado que las micrografías mostraron la presencia de oligómeros formados con características similares a los oligómeros sin nitrar, y en concentración similar. Sin embargo, aún resta realizar una cuantificación del rendimiento de formación, así como una caracterización cuantitativa para evaluar el impacto de la 3-NT en el proceso de formación de oligómeros. Es posible plantear que la nitración puede estabilizar la formación de estas estructuras oligoméricas, las cuales también presentan toxicidad para las células. El rol de estas especies y su nitración *in vivo* aún se encuentra sin esclarecer. Por lo tanto, la nitración de aS tiene un impacto inhibitorio de la formación de fibras, mientras que no produce alteración en la capacidad de formación de oligómeros. Si estos oligómeros nitrados presentan mayor toxicidad neuronal que los oligómeros sin nitrar es un aspecto no explorado hasta el momento.



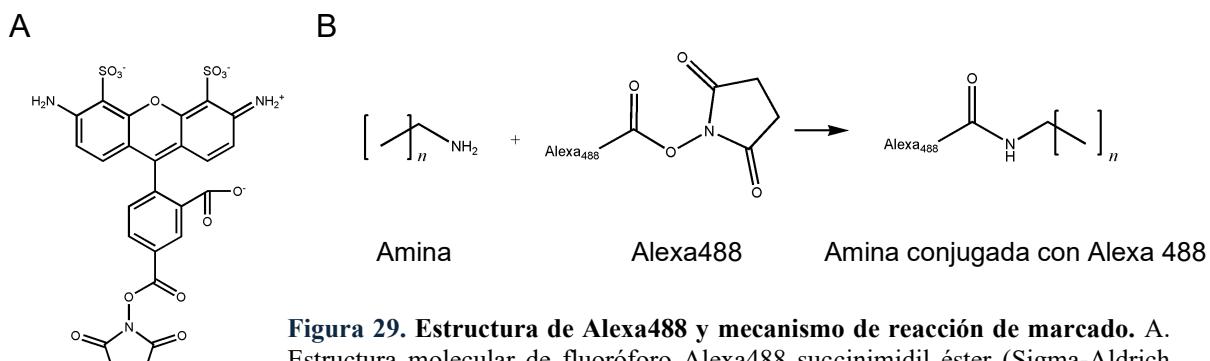
**Figura 28. Formación de oligómeros de aS nitrada con DNI.** Los oligómeros de aS fueron generados y purificados a partir de aS salvaje sin nitrar (izquierda) y nitrada con DNI (derecha). Las flechas señalan oligómeros de aS. Escala: 500 nm. n = 1

## 11.2 MARCADO DE ESPECIES AGREGADAS DE AS CON ALEXA488

Diversos estudios acerca de la interacción de aS con células y sus componentes se basan en la observación directa de la aS intracelular, por lo general utilizando métodos de detección fluorescentes (inmunocitoquímica, o marcaje de proteínas con moléculas fluorescentes). Este trabajo pretende la observación de aS en cultivos celulares para estudiar su internalización, proceso clave para la propagación de ésta por diferentes componentes del SNC en las sinucleinopatías. Para este objetivo, se generó la proteína aS con una marca fluorescente utilizando el fluoróforo Alexa488. A partir de esta proteína marcada, se produjeron las distintas especies agregadas fluorescentes, con el propósito de investigar si existen diferencias en esta interacción con las células para las distintas formas de aS: monómero, fibra y oligómero.

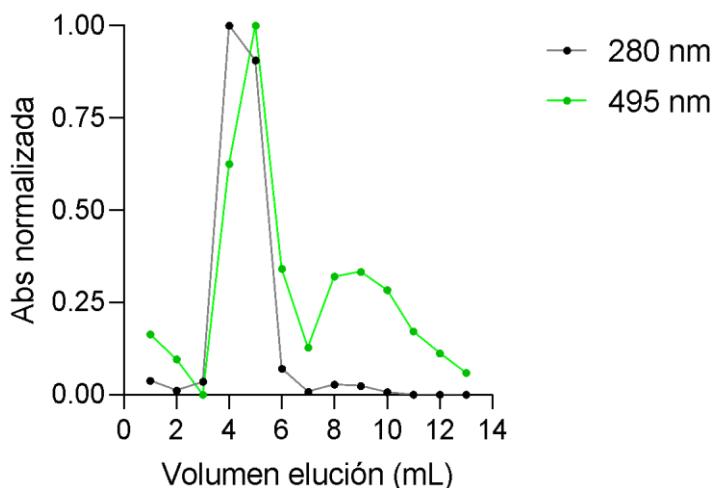
### 11.2.1 Formación de aS<sub>m</sub> conjugado a Alexa488

Para generar la proteína aS monomérica marcada con Alexa488 ( $aS_m^{488}$ ) se utilizó un *kit* comercial de marcaje de inmunoglobulinas, con el cual se conjuga el fluoróforo Alexa488 mediante un enlace éster a los residuos lisina de las proteínas en pH alcalino. La estructura molecular del Alexa488 y el esquema de la reacción se muestran en la figura 29.



**Figura 29. Estructura de Alexa488 y mecanismo de reacción de marcado.** A. Estructura molecular de fluoróforo Alexa488 succinimidil éster (Sigma-Aldrich Mix-n-Stain™ CF™ 488™). B. Mecanismo de condensación entre el fluoróforo y grupos amino proteicos. El fluoróforo queda unido a la proteína por un enlace amida en residuos de lisina y por el extremo amino terminal.

En la figura 30 se observan las fracciones de elución de 1 mL de la columna PD10 luego del marcado, evaluando la aparición de absorbancia a 280 nm correspondiente a la proteína, y un máximo de absorbancia a 495 nm, el cual corresponde al Alexa488. A los 8 mL eluye el fluoróforo libre, indicativo únicamente por el aumento en la absorbancia a 495 nm. De esta forma se logró separar la proteína monomérica conjugada con Alexa 488.



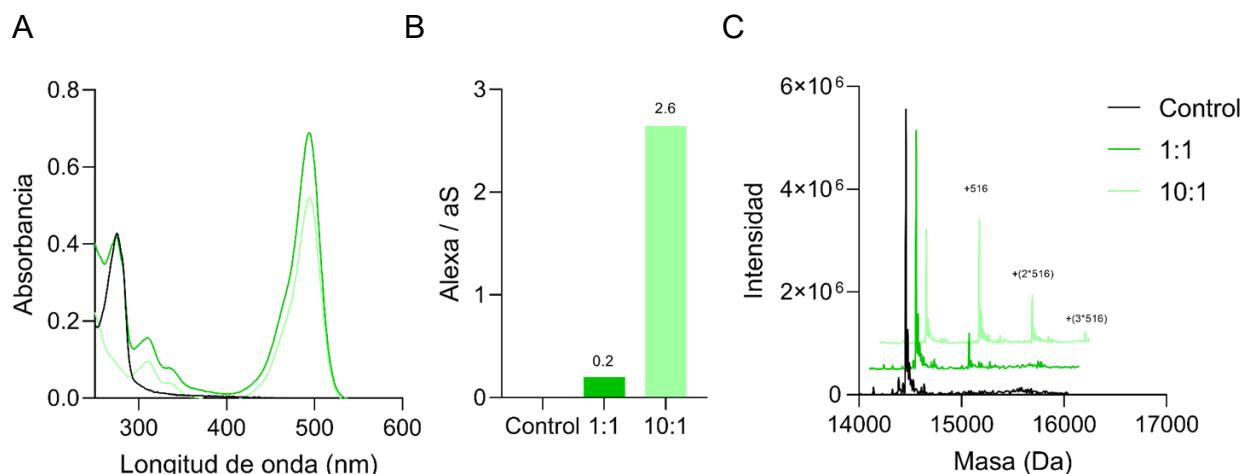
**Figura 30. Cromatograma de PD10 de aS<sub>m</sub>488.** Luego el marcado de aS con Alexa488, se separó la proteína marcada del fluoróforo libre mediante columna PD10 (Sephadex™ G-25). Se colectaron fracciones de 1 mL y se midió absorbancia a 280 nm (absorbancia de proteínas) y 495 nm (absorbancia de Alexa488).

Fue necesario poner a punto las condiciones de marcado, por lo que se comenzó realizando un marcado a distintas concentraciones de fluoróforo, tal que [aS]:[Alexa488] sean 1:1 y 1:10. Se realizaron espectros de absorción UV-visible y MS para corroborar la presencia de Alexa488 conjugada y calcular el rendimiento del marcaje (figura 31). Los espectros de absorción (Figura 31A) muestran el máximo de absorción característico de la tirosina a 275 nm, en conjunto con el máximo de absorción a 492 nm del fluoróforo. No se aprecian cambios en el espectro según la estequiométría utilizada. Utilizando las absorvidades molares de la aS y del fluoróforo a las longitudes de onda 280 y 494 nm, es posible calcular la relación [Alexa488]/[aS] obtenida. Esto se realiza utilizando las siguientes ecuaciones:

$$\text{Ecuación 1: } [\text{aS}] = (\text{A}_{280} - (0.11\text{A}_{494}))/5960$$

$$\text{Ecuación 2: } [\text{Alexa488}]/[\text{aS}] = \text{A}_{494}/(71000 * [\text{aS}])$$

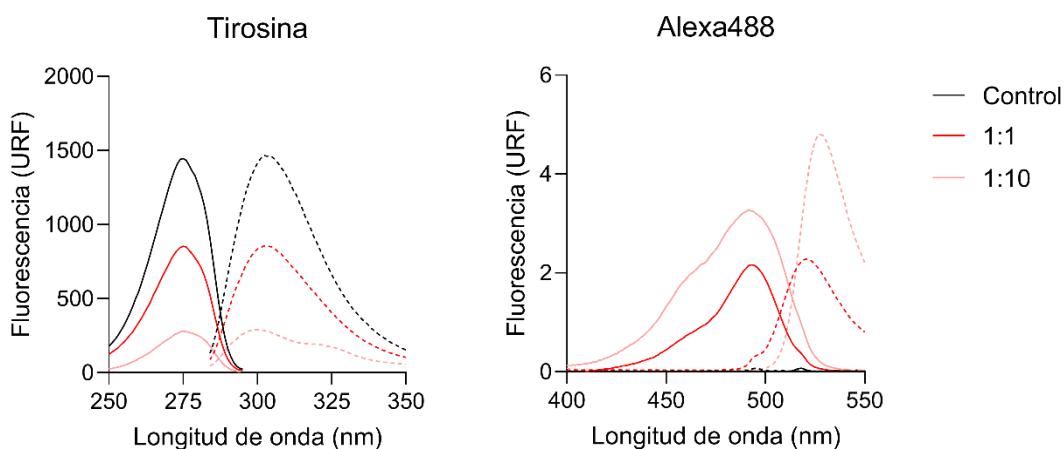
A partir de estas ecuaciones, es posible obtener una estimación de la eficiencia de marcado (figura 31 B). Estos rendimientos fueron de 0.2 y 2.6 moléculas de fluoróforo por molécula de aS en promedio para las estequiométrías 1:1 y 1:10 respectivamente. Estos valores se calcularon considerando la concentración proteica de aS. Sin embargo, el fluoróforo se conjuga a residuos de lisina peptídicos, de los cuales la aS contiene 14, todos ellos capaces de ser marcados. Por ende, el rendimiento calculado por residuo de lisina es mucho menor. Adicionalmente, los espectros de espectrometría de masa (Figura 31 C) muestran que la reacción con una relación 1:1 produce monómeros con una única marca incorporada, correspondiente a un aumento de 516 Da. En contraste, una relación 1:10 produce mayor cantidad de monómero con una molécula de Alexa488 unida, y, además, monómeros con 2 y hasta 3 moléculas de fluoróforo conjugadas. Estos resultados confirman que se logró obtener la especie monómero de aS unida covalentemente a moléculas de Alexa488.



**Figura 31 Condiciones de marcado de  $aS_m^{488}$ .** A. Espectros de absorción de  $aS_m^{488}$  luego del protocolo de marcado. El espectro de la condición 10:1 fue diluido 10 veces. B. Cuantificación de Alexa488 por monómero de aS, calculado a partir de los valores de absorción en A. C. Deconvoluciones de espectros de masa de  $aS_m^{488}$  de las muestras en A. n = 1

Se estudiaron las propiedades de fluorescencia de la proteína monomérica marcada (Figura 32), realizándose espectros de excitación y emisión de tirosina ( $\lambda_{ex} = 275$  nm  $\lambda_{em} = 315$  nm) como de Alexa488 ( $\lambda_{ex} = 482$  nm  $\lambda_{em} = 525$  nm). Con respecto a los espectros de excitación y de emisión de tirosina, ambos disminuyen su intensidad al aumentar la relación [Alexa488]/[aS]. En cambio, la emisión del Alexa488 aumenta al incrementar esta relación, indicativo del aumento en la cantidad de fluoróforo. Este aumento, sin embargo, no se corresponde linealmente con la estequiometría de la reacción (lo que sí ocurría para los espectros de absorción), ya que un aumento de 10 veces en la

cantidad de Alexa488 no aumenta la intensidad de fluorescencia en la misma proporción. Adicionalmente, para la relación de 1:10, los espectros de excitación y emisión no son simétricos, por lo que puede estar ocurriendo algún fenómeno que afecta la fluorescencia del fluoróforo, como, por ejemplo, agregación proteica u homoFRET. Sin embargo, al realizar medidas de fluorescencia en estado estacionario, no es posible evaluar la presencia de homoFRET.



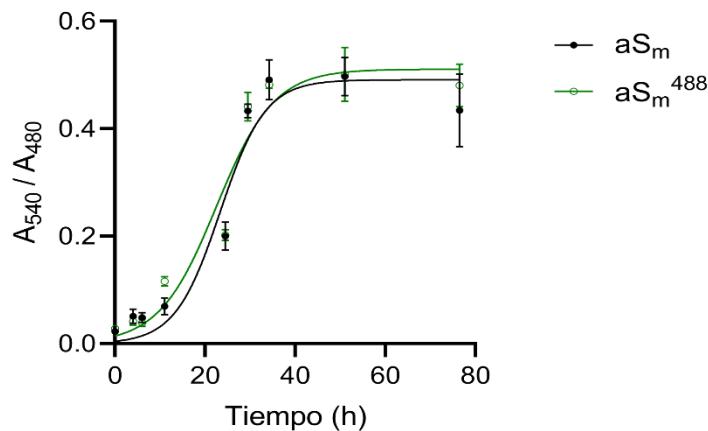
**Figura 32. Esepectros de fluorescencia de  $aS_m^{488}$ .** A. Espectros de excitación y emisión de  $aS_m^{488}$  al excitar residuos de tirosina ( $\lambda_{ex} = 275$  nm  $\lambda_{em} = 315$  nm) o el fluoróforo Alexa488 ( $\lambda_{ex} = 482$  nm  $\lambda_{em} = 525$  nm) para las distintas condiciones de marcado.

Dado que este trabajo propone la formación de especies agregadas a partir del monómero marcado y que estas sean comparables a nivel estructural a las formas sin marcar, se propuso utilizar la relación 1:1 para ensayos siguientes. Esta decisión se basó en que para esta condición se obtuvieron espectros simétricos de excitación y emisión y, además, se obtuvo una cantidad baja de moléculas de fluoróforo unidas, lo que resulta deseable para generar las estructuras agregadas y que estas sean estructuralmente similares a las formas sin marcar.

### 11.2.2 Formación de $aS_f$ conjugada a Alexa488

Para la formación de fibras de  $aS$  conjugadas con Alexa488 ( $aS_f^{488}$ ), se realizó el ensayo de agregación descrito previamente a partir del monómero marcado en las condiciones de agregación ya establecidas por el laboratorio. Para ello, 100  $\mu\text{M}$  de  $aS_m^{488}$  se agitaron en amortiguador de nitración durante varios días y se midió en el tiempo la formación de fibras mediante Th-T y rojo Congo. El ensayo utilizando Th-T no fue consistente con la proteína sin marcar, utilizada como control positivo. Esto puede deberse a que la Th-T emite fluorescencia a 482 nm, cercano a donde se encuentra la

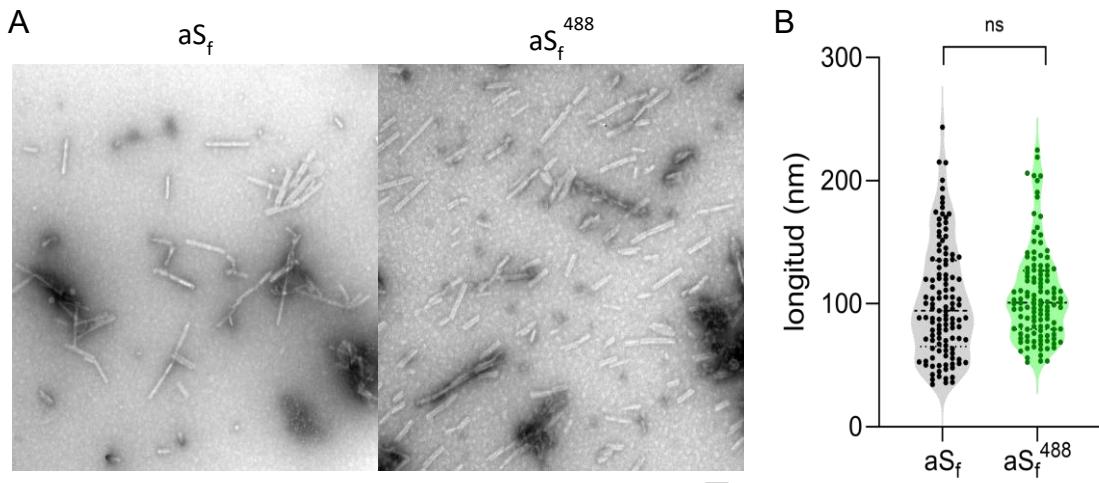
máxima excitación del Alexa488. Por lo tanto, el ensayo por RC fue el que permitió evidenciar la cinética de agregación (Figura 33). No se encontraron diferencias significativas en las curvas cinéticas de agregación ( $p$ -valor = 0.1464), ni en el  $t_{1/2}$  de agregación para ambas proteínas, con un  $t_{1/2}$  de 23,36 h para la condición control y 22,53 h para la proteína marcada ( $p$ -valor = 0.6955).



**Figura 33. Cinética de formación de  $aSm^{488}$  por ensayo CR.** Formación de fibras midiendo la relación de absorbancias a 540 y 480 nm para el ensayo por CR. 100  $\mu$ M de proteína control y marcada con Alexa488 fueron utilizadas. Se grafica promedio  $\pm$  SEM de 3 ensayos.

Las fibras formadas fueron caracterizadas por MET para evaluar sus características estructurales, como ser el tamaño y forma, y de esta forma comparar si son alteradas por la presencia del fluoróforo. La figura 34 muestra las microfotografías obtenidas, donde se observa que las fibras formadas presentan una distribución de tamaño similar para ambos tipos de fibras, con una media de tamaño de 102,0 nm y 107,5 nm para las fibras sin marcar y marcadas, respectivamente ( $p$ -valor = 0.1497), similar a lo obtenido previamente (269,288). Con este resultado es posible realizar posteriores comparaciones contra el control sin marcar, dado que no se observaron alteraciones estructurales debidas al fluoróforo. Sin embargo, se debería complementar con un análisis ultraestructural de mayor complejidad (como Cryo-EM), dado la alta variabilidad conformacional que puede adoptar la estructura fibrilar (104).

Adicionalmente, se marcaron fibras luego de ser formadas, tampoco encontrándose diferencias en tamaño con las fibras sin marcar (dato no mostrado).



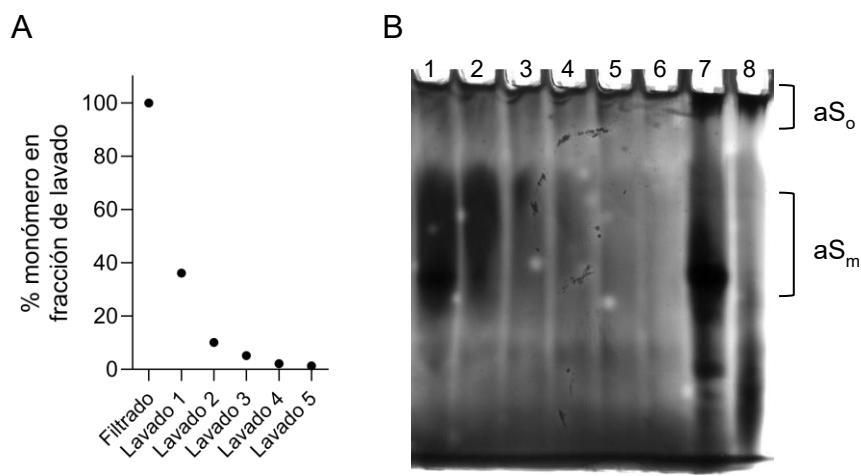
**Figura 34. Caracterización estructural de aS<sub>f</sub><sup>488</sup>.** A. Microfotografías obtenidas por MET de aS<sub>f</sub> y aS<sub>f</sub><sup>488</sup> teñidas con acetato de uranilo 1%. Escala: 100 nm. B. La longitud de cada fibra individual fue obtenida utilizando el software ImageJ-FIJI. Mann-Whitney test, p-valor: 0.1497. Se analizaron 3 imágenes obtenidas para cada condición. n = 1.

#### 11.2.3 Formación de aS<sub>o</sub> conjugados a Alexa488

El ensayo de formación de oligómeros presenta un bajo rendimiento por lo que una cantidad importante de monómero no se incorpora en los oligómeros formados. El protocolo de formación de oligómeros utilizado en este trabajo presenta un rendimiento estimado de un 0,3% al medir la concentración proteica de oligómeros purificados y la cantidad de proteína inicial. Por lo tanto, debido a esta limitante sumada al bajo rendimiento del marcado de aS<sub>m</sub> con el fluoróforo Alexa488, se optó por realizar primero la formación de oligómeros a partir de aS<sub>m</sub>, purificarlos y realizar el marcado de estos aS<sub>o</sub> luego de su purificación para obtener oligómeros marcados (aS<sub>o</sub><sup>488</sup>). De esta forma se evita un gasto excesivo de fluoróforo que quedará sin reaccionar, y que el porcentaje bajo de aS<sub>m</sub><sup>488</sup> resultante genere poca cantidad de aS<sub>o</sub><sup>488</sup> (suponiendo que el rendimiento de agregación no se altera para el monómero marcado).

Para corroborar la correcta eliminación de monómero residual en la preparación de oligómeros, a las fracciones de lavado se les midió la fluorescencia de tirosina ( $\lambda_{ex} = 275$  nm,  $\lambda_{em} = 302$  nm) para evaluar la desaparición de monómero remanente (Figura 35 A). Los oligómeros formados y purificados fueron marcados con Alexa488 en una relación 1:1 y, al igual que para las fibras, se realizan más lavados por filtración para lavar el exceso de fluoróforo que no hubiera reaccionado. La figura 35 B muestra el proceso de purificación de oligómeros evaluado por electroforesis nativa en un gel de poliacrilamida al 7% con tinción con plata. Se obtuvieron aS<sub>o</sub><sup>488</sup> purificados como se evidencia en el gel

de electroforesis una banda de alto peso molecular, y la ausencia de monómero, así como la desaparición de fracción monomérica en los lavados.



**Figura 35. Purificación de  $aS_o^{488}$  por filtración.** A. Fluorescencia de tirosina en fracciones de filtrado inicial y lavados posteriores. B. Evaluación de purificación de  $aS_o^{488}$  por electroforesis nativa y tinción argéntica. Carril 1. Filtrado. Carril 2-6: Lavados. Carril 7:  $aS_o$  sin purificar. Carril 8:  $aS_o^{488}$ .

Con respecto a la caracterización estructural de  $aS_o^{488}$ , dado que estos se marcaron a partir de oligómeros preformados, se asumió que a nivel estructural (tamaño promedio y distribución de tamaño) no existen alteraciones entre los oligómeros marcados y sin marcar. Sin embargo, es necesaria una caracterización confirmatoria por técnicas como microscopía electrónica o dispersión dinámica de la luz.

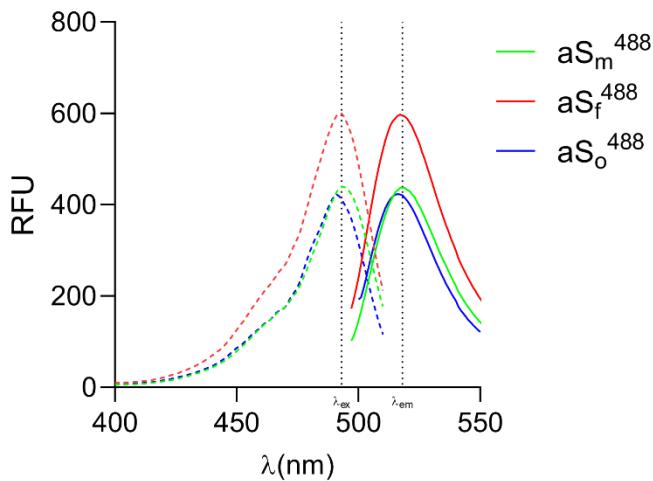
#### 11.2.4 Propiedades espectrales de las especies de aS marcadas con Alexa488

Para confirmar que las especies marcadas de aS con fluoróforo poseen propiedades espectrales similares, se realizaron espectros de excitación y emisión de las distintas conformaciones a igual concentración (Figura 36). En la tabla 6 se presentan las longitudes de onda correspondientes a los máximos de excitación y emisión para las distintas especies.

**Tabla 7.** Propiedades de fluorescencia para las formas de aS marcadas con Alexa488.

	$\lambda_{\text{excitación máxima}}$	$\lambda_{\text{emisión máxima}}$
$aS_m^{488}$	493 nm	518 nm
$aS_f^{488}$	492 nm	517 nm
$aS_o^{488}$	491 nm	516 nm

Todas las especies marcadas de aS presentan espectros simétricos, sin diferencias en los máximos de excitación o emisión, por lo tanto, se espera que se comporten de igual forma para los estudios de fluorescencia que se realizarán en las secciones siguientes.



**Figura 36. Propiedades de fluorescencia para las formas de aS marcada con Alexa488.** Aproximadamente 1.4 mg/mL de aS en distintas formas (monómerica, fibrilar y oligomérica) se estudiaron mediante espectros de excitación (línea punteada) y emisión (línea continua) en solución PBS.

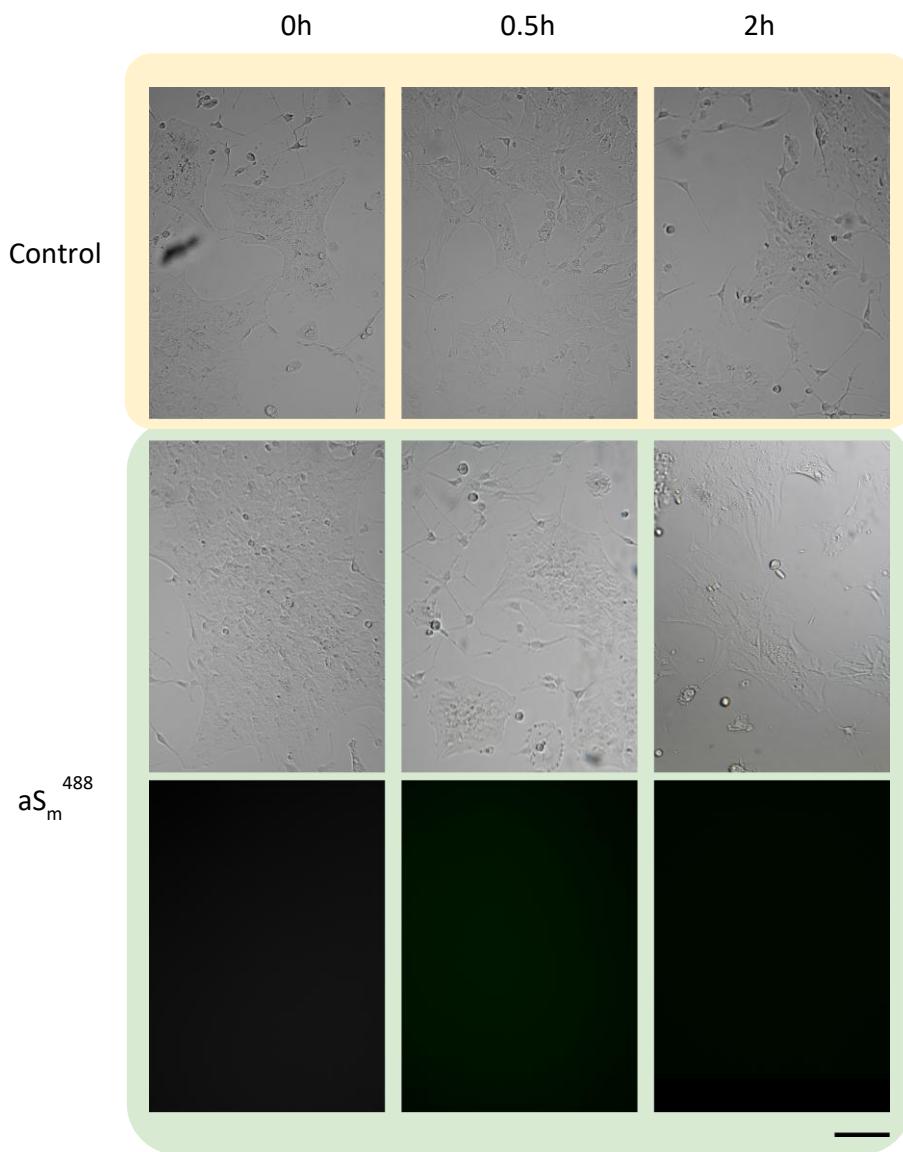
## 11.3 INTERACCIÓN DE LAS ESPECIES DE AS MARCADAS CON CULTIVOS CELULARES

### 11.3.1 Internalización de las especies de aS

Al tener las formas de aS marcadas con un fluoróforo como Alexa488, es posible estudiar la interacción de aS con células en cultivo, tanto con células vivas o fijadas. La capacidad de distintas macromoléculas de atravesar membranas celulares depende de dos grandes mecanismos principales: endocitosis y translocación. La endocitosis es un mecanismo que requiere del aporte de energía y se basa en la formación de estructuras membranosas que incorporan el material a endocitar, incorporándose éste en vesículas intracelulares. La endocitosis refiere, en realidad, a un conjunto de mecanismos mediados por maquinarias intracelulares diferentes como pueden ser pinocitosis, macropinocitosis, fagocitosis, entre otros. Por otro lado, la translocación se basa puramente en un mecanismo que depende de la solubilidad de la molécula en medios hidrofóbicos, por lo que puede atravesar la membrana celular cuanto mayor sea su hidrofobicidad.

Para evaluar la internalización de las distintas especies de aS marcadas, se comenzó utilizando la fluorescencia de la aSm<sup>488</sup> en cultivos primarios de astrocitos de

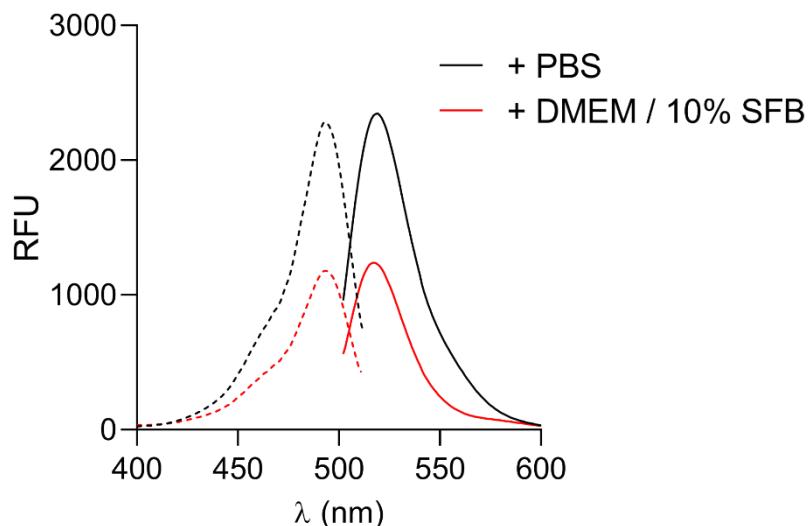
rata, dado la relevancia de las sinucleinopatías en células del sistema nervioso central, y los antecedentes del grupo de trabajo donde se evaluaron los cambios fenotípicos en astrocitos (269).



**Figura 37. Cultivos primarios de astrocitos vivos tratados con  $aS_m^{488}$ .** Los astrocitos fueron incubados con  $aS_m^{488}$  0,07 mg/mL en medio de cultivo DMEM/10% SFB. A los tiempos indicados (en horas) se observaron con microscopio de epifluorescencia y se tomaron fotografías de contraste de fases y fluorescencia de los mismos campos. Arriba: Contraste de fases de astrocitos sin tratar durante el tiempo de incubación. Centro: Contraste de fases de astrocitos tratados con  $aS_m^{488}$ . Abajo: Epifluorescencia de imágenes en centro. Barra escala: 100  $\mu$ m.

En una primera aproximación, se realizó una incubación de astrocitos en cultivo con  $aS_m^{488}$ . Para ello, los astrocitos se mantuvieron en medio de cultivo DMEM/10% SFB y se incubaron con  $aS_m^{488}$  hasta 2 horas. Durante el tiempo de incubación, se adquirieron imágenes de microscopía de epifluorescencia y de contraste de fases (Figura 37). La concentración de  $aS_m^{488}$  utilizada fue de 0,07 mg/mL (aproximadamente 5  $\mu$ M). Se seleccionó esta concentración por ensayos previos publicados por el grupo de trabajo en astrocitos, donde se ven cambios funcionales de los astrocitos a esas concentraciones (269).

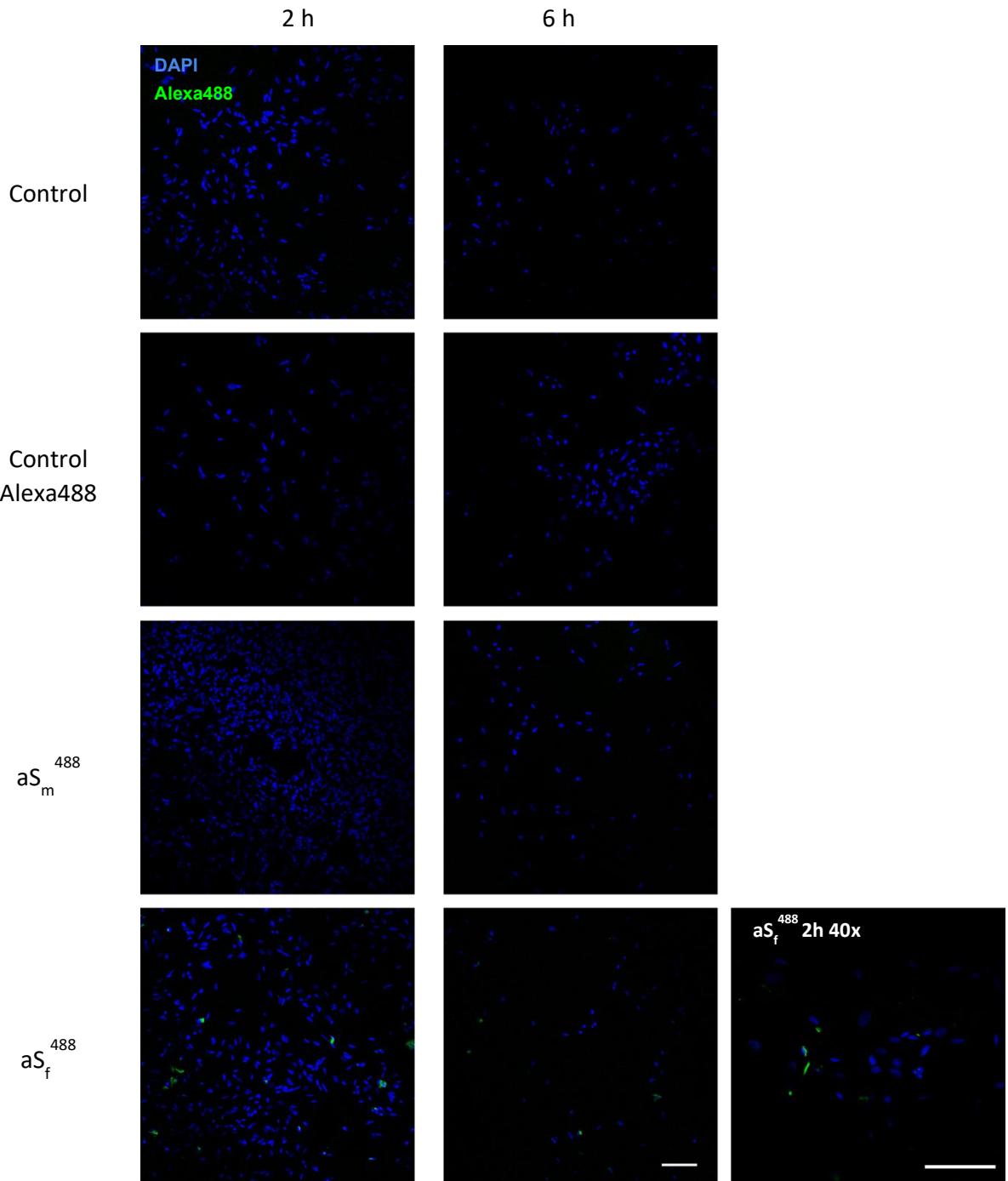
Las imágenes obtenidas de campo claro indican que no se observaron cambios significativos a nivel morfológico de los astrocitos durante el tiempo de incubación, y no fue posible evidenciar fluorescencia para Alexa488 mediante epifluorescencia (tampoco en microscopía confocal). Sin embargo, dado que el ensayo requería que los astrocitos permanecieran vivos, debían mantenerse en medio de cultivo. Se planteó que el medio de cultivo pueda apagar la fluorescencia del fluoróforo, fenómeno conocido como apagamiento o “*quenching*”, en inglés. El medio de cultivo utilizado tiene rojo fenol como indicador de pH, así como una gran cantidad de componentes moleculares provenientes del suero fetal bovino, los cuales pueden apagar la fluorescencia del Alexa488, como también generar un aumento en la señal de fondo (*background*), lo que disminuye el cociente señal/ruido haciendo menos sensible este método. Para analizar si pudiese pasar esto en nuestras condiciones, se midió la fluorescencia de una solución de  $aS_m^{488}$  0,07 mg/mL en DMEM/10% SFB o en PBS (Figura 38). Se observó que la intensidad de fluorescencia disminuye en medio de cultivo, lo que implica que realizar los ensayos de microscopía en este medio no es útil para detectar señal de Alexa488.



**Figura 38. Fluorescencia de  $aS_m^{488}$  en medio de cultivo.** Se adquirieron espectros de excitación (línea punteada) y de emisión (línea continua) para  $aS_m^{488}$  0,07 mg/mL en PBS (línea negra) o DMEM / 10% SFB (línea roja).

Debido al efecto de apagamiento de la intensidad de fluorescencia, se propuso realizar un protocolo de fijación y lavado de las células a distintos tiempos previo al análisis por microscopía (otra opción podría ser el uso de medio de cultivo sin rojo fenol o un *buffer* Krebs-Ringer-Henseleit). El objetivo de realizar estos cambios en el protocolo, consisten en i) eliminar posible señal de fondo de aS marcada en solución, y

ii) poder realizar microscopía con las células sin interferencia del medio de cultivo, evitando cualquier fenómeno que afecte la emisión de fluorescencia del Alexa488. Para este nuevo diseño experimental, se utilizaron cultivos de astrocitos incubados con aS en forma monomérica y fibrilar durante 2 y 6 horas. El resultado se muestra en la figura 39. En este caso, para la forma monomérica no se ve señal para fluorescencia en los tiempos evaluados. En cambio, para la forma fibrilar se observa la aparición de señal fluorescente que podría indicar la interacción entre aS<sub>f</sub> y los astrocitos a las 2h de incubación, y menor intensidad de señal a las 6h. Sin embargo, no es posible determinar de donde proviene la señal (intracelular o extracelular). Por otro lado, se incluyó un control solo con Alexa488 libre a una concentración similar a la estimada según el rendimiento de marcado (0,3 μM). No se observó señal para esta condición, lo cual podría indicar que la señal fluorescente proviene del Alexa488 unido covalentemente a la aS.



**Figura 39. Internalización de  $aS^{488}$  en astrocitos fijados.** Astrocitos primarios de rata se trajeron por 2h o 6h con  $aS_m^{488}$  o  $aS_f^{488}$  0,02 mg/mL. Los astrocitos se fijaron y prepararon para microscopía confocal. Se realizó un control con Alexa488 libre. n = 2. Barra escala: 100  $\mu$ m.

Dado que los cultivos de astrocitos son cultivos primarios, cuya preparación requiere de varias semanas y luego de tiempos de espera a que alcancen la confluencia y pureza necesarias, para continuar con la puesta a punto de la técnica por microscopía se utilizaron cultivos celulares derivados de microglía murina de la línea celular BV-2. La elección de esta línea también se apoya en que la microglía es un tipo celular presente en

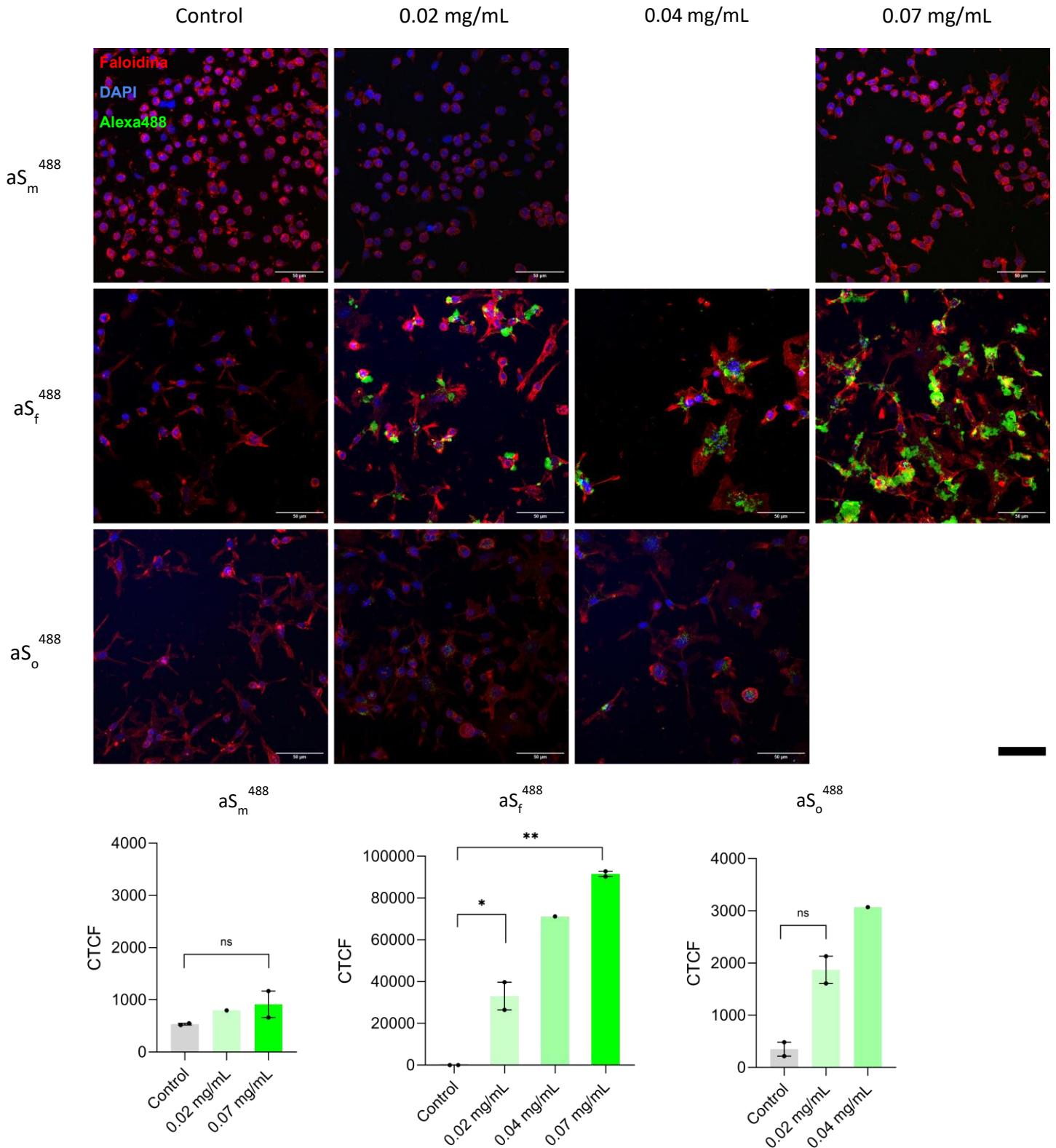
el SNC que cumple un rol importante en la patología de la EP al activarse hacia un fenotipo citotóxico (304). Al disponer de estas células en el laboratorio, se pasó a realizar los ensayos de microscopía en estas células. Para esta línea celular hay varios estudios publicados que reportan la interacción con la aS extracelular (197,305–308). Adicionalmente, al ser células especializadas en la endocitosis, lo consideramos un buen modelo de estudio para observar la internalización de proteínas extracelulares.

Con motivo de tener una mejor representación del citoplasma celular, para los ensayos de microscopía se utilizó además un marcador de actina fluorescente. Con este marcador se podría realizar la obtención de imágenes por microscopía confocal a distintos planos de profundidad (eje Z) y posteriormente realizar una reconstrucción tridimensional de la célula. En la figura 40 se observan las imágenes obtenidas por microscopía confocal para las células BV-2 incubadas con distintas concentraciones de aS (con las distintas especies agregadas) luego de 3 horas de incubación. Se cuantificó la intensidad fluorescente correspondiente al Alexa488 por célula (sumando la intensidad de los planos en el eje z), promediando un total de 10 células por campo. Las imágenes muestran la proyección de varios planos con la función “*Max intensity*” para una mejor visualización.

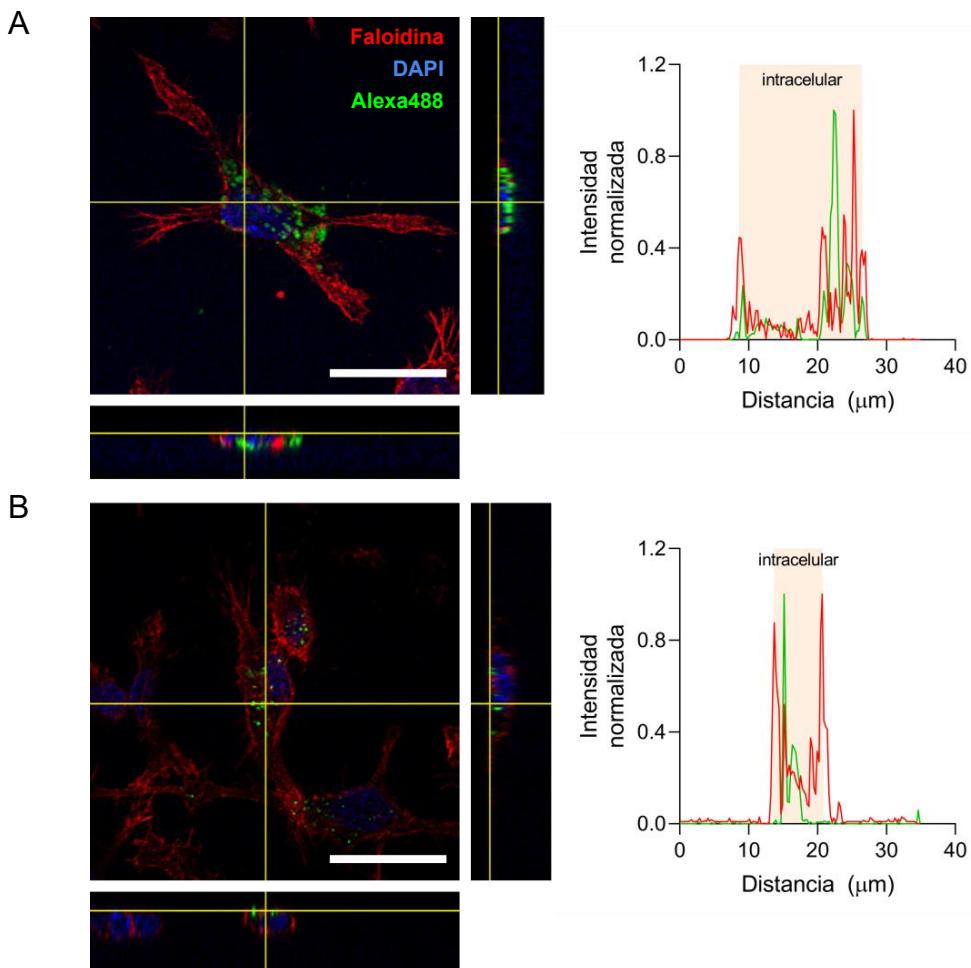
Los gráficos de barras de la figura 40 muestra los promedios de intensidad de fluorescencia corregida para el canal verde (señal de Alexa488). De igual modo que para los experimentos anteriores, no se observa señal para las células tratadas con aS monomérica, pero si para los tratamientos con aS en forma fibrilar. Adicionalmente, se observa señal para las células tratadas con aS oligomérica, aunque no es un aumento estadísticamente significativo, aunque solo se realizó esta condición una única vez ( $n=1$ ). Tanto para la forma  $aS_f$  como  $aS_o$  no se logra llegar a saturar la señal obtenida, por lo que mayores concentraciones se requieren estudiar para completar un análisis de unión de las diferentes especies.

Al realizar una reconstrucción tridimensional en el eje z y analizar la localización de la señal para Alexa488, es posible observar que la señal se encuentra localizada en el interior celular, lo que muestra su internalización durante el tiempo del ensayo (Figura 41). Otra visualización posible es trazar una línea recta transversal a la célula y graficar el perfil de intensidad para el canal rojo y verde (gráficas de la figura 41). Para el canal rojo se ven dos picos correspondientes a la transición extracelular-intracelular, por lo que la región entre medio de ambos picos corresponde a la región intracelular para ese plano confocal (señalizado como “intracelular” en color en el gráfico). En esta región coincide

un pico para la señal verde, correspondiente a señal para aS<sup>488</sup>, lo que sugiere que la señal para aS se encuentra en el interior celular.



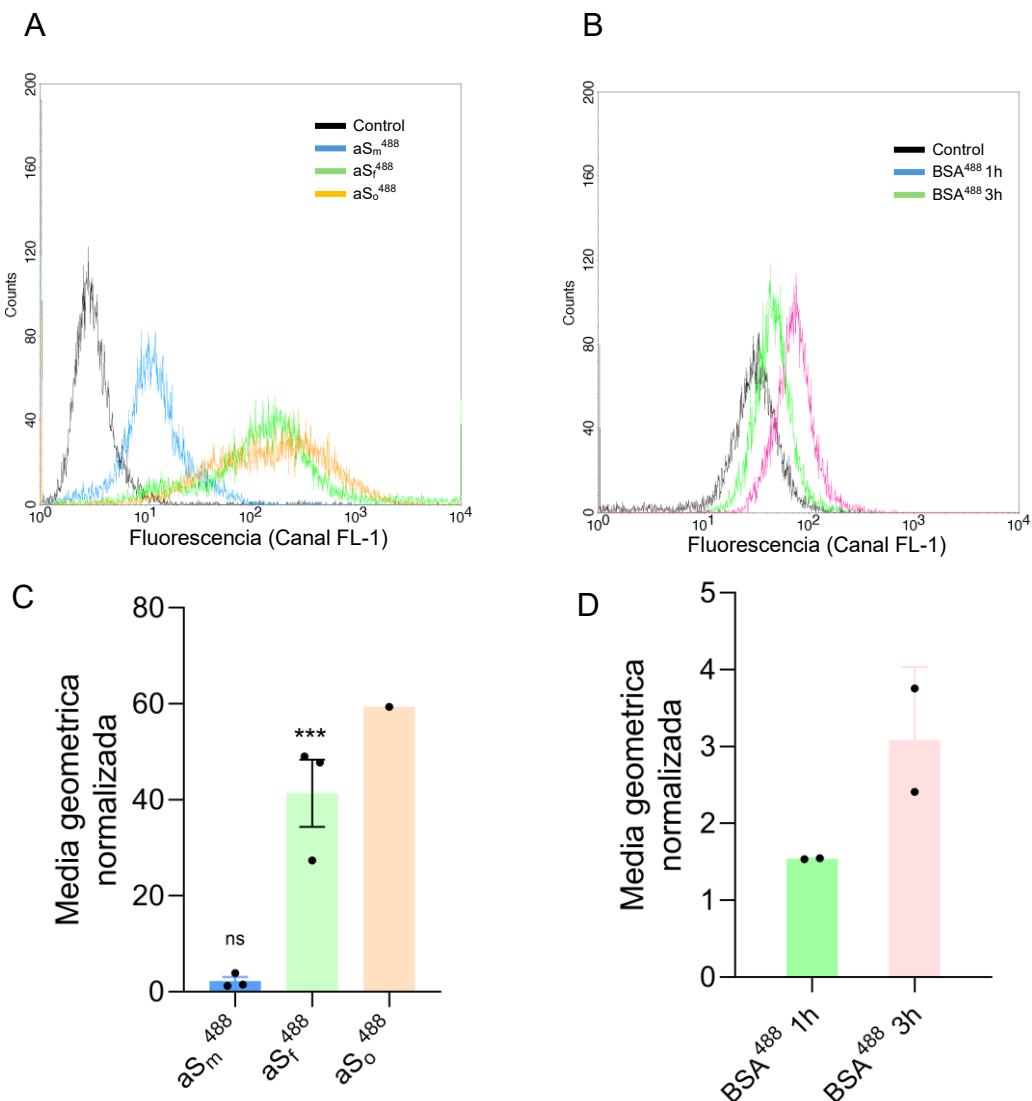
**Figura 40. Microscopía confocal de aS<sup>488</sup> con células BV-2.** Células BV-2 fueron tratadas con aS en distintas formas agregadas a diferentes concentraciones durante 3h. Luego las células se lavaron, fijaron y prepararon para microscopía confocal. Barra escala: 50  $\mu$ m. La gráfica de barras representa la cuantificación de intensidad de fluorescencia. Se grafica intensidad de fluorescencia de Alexa488 por célula. Izquierda: aSm<sup>488</sup>, Centro, aSf<sup>488</sup>. Derecha: aSo<sup>488</sup>. CTCF: fluorescencia de una célula corregida. Cada experimento fue realizado 2 veces, con 3 réplicas técnicas cada uno. ANOVA una vía. \* p-valor  $\leq 0.05$  \*\*: p-valor  $\leq 0.01$  ns: p-valor  $> 0.05$



**Figura 41. Internalización de aS<sub>f</sub><sup>488</sup> y aS<sub>o</sub><sup>488</sup> en células BV-2.** Análisis de z-stacks obtenidos por microscopía confocal luego de 3h de tratamiento de células BV-2 con aS<sub>f</sub><sup>488</sup> (A) y aS<sub>o</sub><sup>488</sup> (B) 0,04 mg/mL. Barra escala: 20  $\mu$ m. Izquierda: se grafica intensidad de fluorescencia normalizada contra el máximo valor en un corte transversal de la célula. Rojo: señal para faloidina. Verde: señal Alexa488.

La internalización de proteínas extracelulares puede ser estudiada complementariamente por citometría de flujo. Esta técnica se basa en la medida de fluorescencia de eventos que pasan por el denominado “sitio de interrogación” del citómetro, en el cual se ilumina con un láser de excitación y se recolecta la fluorescencia emitida. Esta es una técnica extensamente utilizada en inmunología para estudiar la presencia de marcadores de superficie celular, pero también detecta proteínas intracelulares. Para evidenciar la internalización de aS<sup>488</sup> se diseñó el experimento de tal forma que se elimina la aS del medio que queda libre, así como la posible cantidad de aS que quede unida a la membrana plasmática mediante el tratamiento con la enzima peptidasa tripsina. El tratamiento con tripsina es, además, necesario para poder despegar

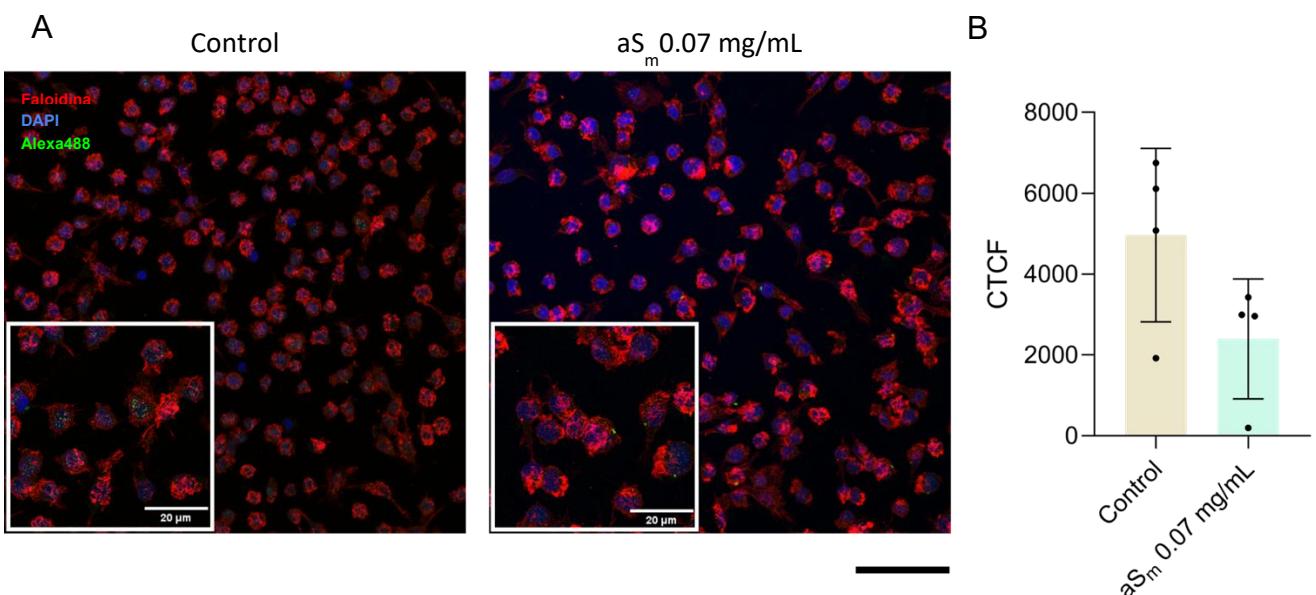
la monocapa de células adheridas a la placa de cultivo y poder analizarlas por el citómetro.



**Figura 42. Internalización de  $aS^{488}$  por citometría de flujo.** Células BV-2 fueron incubadas durante 3 horas con las distintas conformaciones de  $aS^{488}$  0,01 mg/mL (A) o  $BSA^{488}$  0,01 mg/mL (B). Se muestra la media geométrica de los histogramas de fluorescencia normalizada contra el control sin tratar. Los valores de  $BSA^{488}$  se grafican en eje derecho. ANOVA de una vía. \* p-valor  $\leq 0,05$ . ns: p-valor  $> 0,05$ . Cada punto representa el promedio de tres réplicas técnicas.

Se trataron cultivos de células BV-2 confluentes en placas de 6 pocillos con  $aS^{488}$  durante 3 horas. El resultado de este experimento se ve en la figura 42. En este experimento se utilizó una concentración de 0,01 mg/mL de aS, dado que para obtener un mayor número de células utilizando placas de 6 pocillos se requiere un gasto mayor de proteína. De igual forma que la microscopía, existe un gran aumento en la intensidad de fluorescencia detectada para las células tratadas con formas agregadas de aS en contraposición con la forma monomérica, aunque si se observa un desplazamiento del

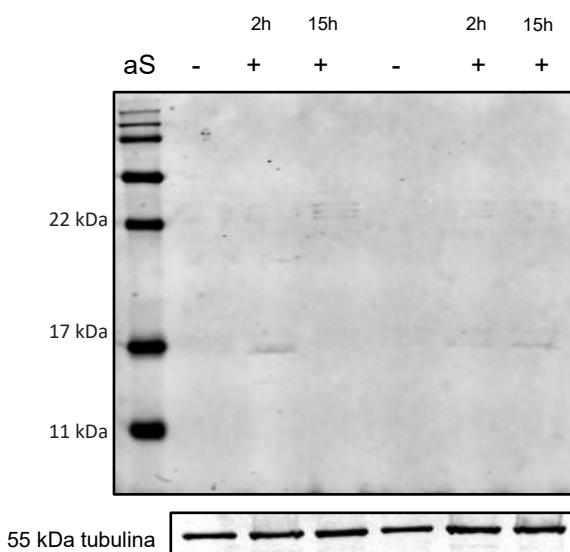
histograma. Esto puede deberse a que la concentración de fluoróforo es mucho menor que la concentración de aS debido al rendimiento del marcaje. Por lo tanto, podría ser que ambas técnicas, microscopía y citometría, no tengan la sensibilidad suficiente para su detección. Quizás, el desplazamiento observado para aSm se deba a fluorescencia de fondo debido a la marca. Controles de fluoróforo libre podrían indicar si este es el caso. Como control de endocitosis se utilizó albúmina sérica bovina (BSA) marcada con el mismo fluoróforo ( $\text{BSA}^{488}$ ), ya que esto estaba reportado como control negativo. Sin embargo, en este diseño experimental se vio un aumento, aunque leve, de señal para las células BV-2 tratadas con  $\text{BSA}^{488}$ . Sería posible suponer que, dado que son células con una actividad endocítica basal, puede estar ingresando por fagocitosis o mecanismos no específicos para aS.



**Figura 43. Inmunocitoquímica de células BV-2 tratadas con  $\text{aS}_m$ .** A. Inmunocitoquímica de células BV-2 incubadas con  $\text{aS}_m$  por 3h. Se utilizó un anticuerpo primario contra aS y secundario contra conejo conjugado a Alexa 488. Inserto: magnificación de una región de la imagen mostrada. Barra de escala negra: 50  $\mu\text{m}$ . B. Cuantificación de fluorescencia en 4 preparados diferentes. CTCF: fluorescencia de una célula corregida. n = 1

Para confirmar si efectivamente el monómero no presenta un ingreso al interior celular significativo, se utilizaron dos estrategias complementarias: i) inmunocitoquímica y ii) *western blot* de lisados celulares. La primera estrategia se basó en incubar las células con aS monomérica sin marcar durante 3h, y luego se realizó la detección de la aS intracelular utilizando anticuerpos contra aS (Figura 43). Se observó señal de fluorescencia basal para la condición control, pero esta puede deberse a un pegamiento inespecífico del anticuerpo secundario. Realizar un control de la técnica incubando las células omitiendo el anticuerpo primario podría confirmar esta hipótesis. Mientras tanto,

para el segundo abordaje, se incubaron las células BV-2 con aS<sub>m</sub> a distintos tiempos y se procedió a realizar *western blot* de los lisados celulares (Figura 44). Era esperable observar un aumento en la detección de aS intracelular en el tiempo. Sin embargo, no se detectó la presencia de aS<sub>m</sub> intracelular por ninguno de estos métodos. Esto plantea algunas interrogantes ya que, en contraposición con la literatura científica, el monómero de aS tendría la capacidad de ser internalizado en este modelo celular de células BV-2, habiendo sido observado por las técnicas utilizadas en esta tesis (307). Este artículo publicado utilizó concentraciones de aS<sub>m</sub> hasta 1μM (0,02 mg/mL), similares a las utilizadas en esta tesis. Sin embargo, diferencias en el comportamiento del cultivo pueden deberse a la expresión de marcadores celulares específicos diferentes entre laboratorios, dado que el proceso de purificación de aS es comparable.

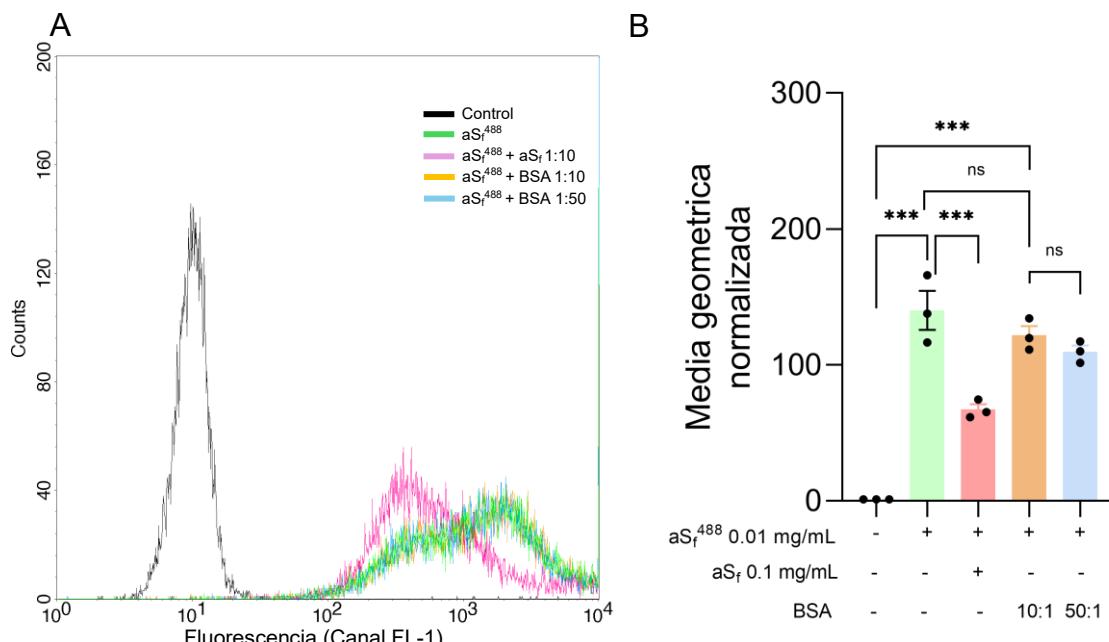


**Figura 44. Ensayo internalización aS<sub>m</sub> con BV-2.** Las células BV-2 se incubaron con aS<sub>m</sub> 0,01 mg/mL. A las 2 y 15h se extrajo el medio de cultivo y se realizó un lisado celular. Se realizó SDS-PAGE 15% *western blot* contra aS de lisado celular. Se usó tubulina como control de carga.

Para estudiar el mecanismo de ingreso de las aS<sub>f</sub> a las células BV-2, se realizaron experimentos que tienen como objetivo evaluar la presencia de receptores de membrana. Estos abordajes consistieron en i) realizar un ensayo de competencia con fibras sin marcar ii) preincubación de las células con una enzima proteasa (proteasa K) y iii) evaluar la dependencia del ingreso de aS<sub>f</sub> con la temperatura.

El primer abordaje consistió en incubar las células BV-2 con aS<sub>f</sub><sup>488</sup> 0,01 mg/mL durante 3 horas en simultáneo con aS<sub>f</sub> sin marcar en exceso (figura 45), a una concentración 10 veces superior y observar la fluorescencia de Alexa488 por citometría de flujo. En caso de que se trate de un mecanismo específico para aS<sub>f</sub> dependiente de un receptor, es esperable que la presencia de fibras sin marcar disminuya el ingreso de fibras fluorescentes al competir por el sitio de unión. Por otro lado, se utilizó BSA en exceso

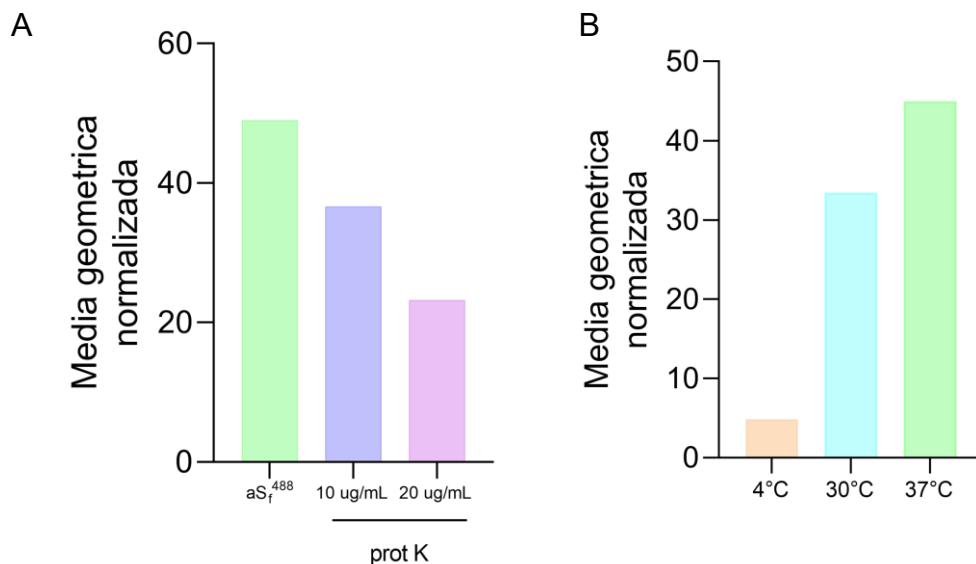
como control negativo a dos concentraciones (10 y 50 veces superior a la concentración de  $aS_f^{488}$ ). Como muestra la figura 45, el tratamiento con  $aS_f^{488}$  0,01 mg/mL produce un aumento significativo de fluorescencia respecto al control, como se vio anteriormente. Sin embargo, la incubación en simultáneo con fibras sin marcar en exceso produce una disminución significativa de la intensidad de fluorescencia, lo que sugiere la intervención de un receptor específico. Adicionalmente, la incubación con exceso de BSA no produce disminución en la fluorescencia, por lo que la internalización de BSA ocurre por un mecanismo diferente que para las fibras de  $aS$ . Es interesante remarcar que dada un exceso 10 veces superior, la disminución del efecto no sea proporcional a este valor, solo logrando una disminución a la mitad del valor máximo. Esto podría interpretarse de que aún no se encuentra en las condiciones de saturación del sistema por las fibras sin marcar, o que, además, existe otro mecanismo independiente de este receptor que esté actuando en simultáneo. A pesar de ello, es necesario realizar este ensayo incorporando mayores concentraciones hasta asegurar una saturación completa.



**Figura 45. Ensayo de competencia para  $aS_f^{488}$  por citometría de flujo.** BV-2 tratadas con  $aS_f^{488}$  0,01 mg/mL durante 3h, lavadas y tratadas con tripsina. Se grafica la media geométrica de fluorescencia del gate realizado de células y se normaliza el cambio frente al control. n = 3 ANOVA una vía. \*\*\*: p-valor ≤ 0.001 ns: p-valor > 0.05

El segundo abordaje para evidenciar que si existe un receptor situado en la membrana extracelular consistió en el pretratamiento de las células con proteinasa K. Este tratamiento digiere las proteínas de membrana y, por tanto, debería impedir la internalización de  $aS_f$  de ser mediada por un receptor proteico específico (307). Esto se

ve en la figura 46 A, donde se observó que dicho pretratamiento inhibió el ingreso de aS<sub>f</sub><sup>488</sup> al detectarse menor señal de fluorescencia por citometría de flujo. Este efecto es dependiente de la dosis de proteína K, ya que, a mayor concentración de proteasa, mayor es la inhibición observada. Sin embargo, tampoco se logra una inhibición completa de su internalización, lo que coincide con la hipótesis que existen dos mecanismos independientes.



**Figura 46. Mecanismo de internalización aS<sub>f</sub><sup>488</sup>.** Cultivos de BV-2 fueron tratados con aS<sub>f</sub><sup>488</sup> 0,01 mg/mL durante 3h, lavadas y tratadas con tripsina. A. Se realizó un pretratamiento de las células con diferentes concentraciones de proteína K. Luego se realizó el tratamiento con aS<sub>f</sub><sup>488</sup>. B. Se realizó la incubación con aS<sub>f</sub><sup>488</sup> a diferentes temperaturas. Se grafica la media geométrica de fluorescencia normalizada frente al control sin incubar con aS<sub>f</sub><sup>488</sup>. n = 1.

Para aproximarnos a esto, se planteó realizar el experimento de internalización de aS<sub>f</sub><sup>488</sup> a diferentes temperaturas, dado que el tráfico endosomal de vesículas se inhibe a baja temperatura. Por lo tanto, el tercer abordaje tiene como fin evidenciar la participación de la vía endosomal dependiente de la temperatura. Al realizar el ensayo a 30°C hay una tendencia a una menor intensidad de fluorescencia, lo cual es completamente inhibido a 4°C, figura 46 B. Estos resultados fueron realizados una única vez, por lo que las tendencias observadas deben ser replicadas un número mayor de veces para corroborar los efectos descritos.

En suma, utilizando las distintas especies de aS marcadas con una molécula fluorescente, fue posible comenzar a caracterizar la interacción de éstas con células derivadas de microglía murina. En particular, los estudios por microscopía confocal y citometría de flujo en este trabajo permitieron evidenciar la internalización de aS<sub>f</sub>, así

como explicar esta internalización por procesos de endocitosis, posiblemente mediada por un mecanismo mediado por receptor. La incorporación de marcadores endosomales en el estudio por microscopía, así como el uso de inhibidores puede ser útil para complementar estos estudios. Se ha descrito la presencia de receptores proteicos en microglía como los receptores tipo TOLL, LAG3 o FcyRIIB. Sin embargo, para esta línea celular, también se ha descrito la interacción de aS<sub>f</sub> con componentes glucídicos y lipídicos, como algunos gangliósidos, cerebrósidos, así como heparán sulfato, los cuales cabría suponer actuarían en simultáneo (308). Resultaría interesante profundizar en estos mecanismos, ahondando en la contribución relativa de ambos, dado el potencial que presenta la inhibición de estos como abordaje terapéutico.

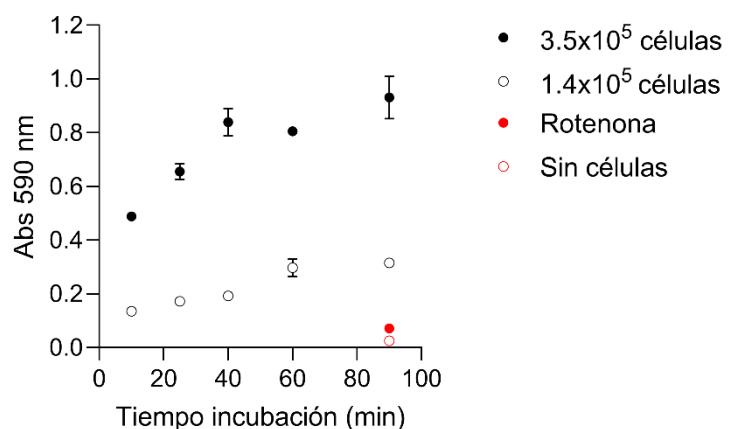
Aunque es difícil comparar resultados experimentales con otros resultados publicados en la literatura científica debido a la heterogeneidad de conformaciones de aS utilizadas y modelos celulares, los resultados aquí mostrados se encuentran dentro de lo esperado y están en acuerdo con lo existente en la literatura. Para la forma oligomérica, se logró ver por microscopía su internalización para la misma línea celular, observándose una distribución más discreta que para las fibras. Aún resta comenzar la caracterización del proceso molecular subyacente de igual forma que se realizó para la forma fibrilar, y ya existen algunos reportes en la literatura científica que muestran que intervienen los mismos mecanismos para ambas conformaciones (309). En contraste, para la forma monomérica no se logró observar internalización a los tiempos y concentraciones utilizados, lo cual no coincide con lo reportado para esta línea celular. Otros ensayos podrían realizarse para continuar ahondando en esta discrepancia, quizás utilizar mayores concentraciones de aS<sub>m</sub>, inmunoprecipitación de los lisados celulares o citometría de flujo utilizando anticuerpos contra aS. Adicionalmente, se podría plantear utilizar controles positivos induciendo a las células previamente a aumentar la fagocitosis. De esta forma, sería posible medir la cantidad de aS<sub>m</sub> que puede ser detectada como máxima señal, lo que permitiría contar con controles positivos de internalización para las diferentes técnicas utilizadas (*western blot*, microscopía, citometría). El uso de inhibidores de receptores específicos también puede ser una vía de corroborar su participación en la internalización de las distintas conformaciones de aS.

#### **11.3.2 Alteración funcional de cultivos celulares tratados con aS**

Para tener una aproximación de las alteraciones funcionales que produce la interacción de aS con cultivos celulares, se incubaron estas células con aS<sub>m</sub> y aS<sub>f</sub> y se

determinó si existen diferencias en la viabilidad y producción de especies oxidantes en distintos cultivos celulares.

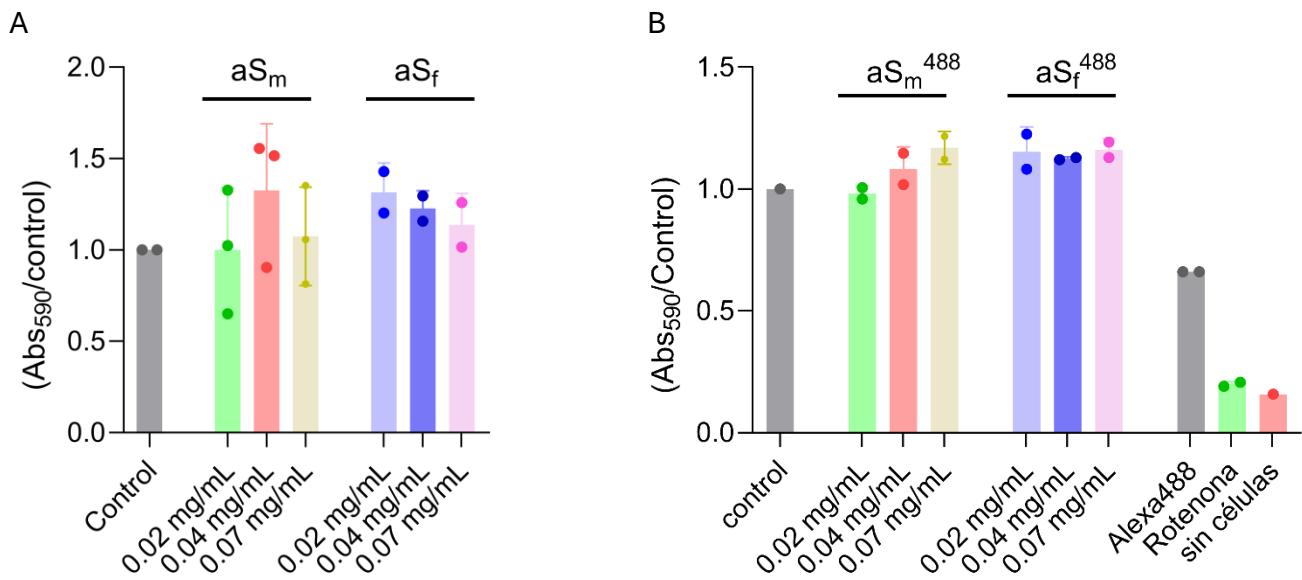
Se realizaron ensayos de viabilidad por el ensayo de MTT en células SH-SY5Y (las cuales son derivadas de neuroblastoma) y BV-2. Para poner a punto la cantidad de células para realizar el ensayo, así como el tiempo de incubación con MTT se realizó una prueba con diferentes concentraciones de células plaqueadas y se detuvo la incubación con MTT a diferentes tiempos (Figura 47). Este ensayo permite determinar la concentración de células y tiempo de incubación a utilizar para que las condiciones de medida no ocurran en la región de saturación de la reacción.



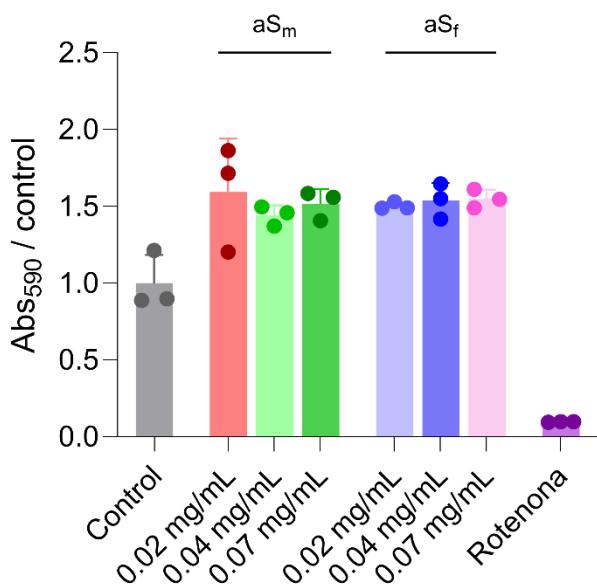
**Figura 47. Curso temporal del ensayo MTT con células SH-SY5Y.**  
Se plaquearon en placas de 24 pocillos células SH-SY5Y realizando las diluciones 1:2 y 1:5 para llegar a la cantidad de células de  $3.5 \times 10^5$  y  $1.4 \times 10^5$  células correspondientes. Como control positivo de muerte celular se incluyó un tratamiento con rotenona 100  $\mu\text{M}$  24h previo al ensayo.  $n = 1$ . Se grafican los promedios y la desviación estándar.

Al analizar los resultados de la figura 47 se decidió utilizar una dilución al medio de las células en cultivo ( $3.5 \times 10^5$  células plaqueadas) y se detener la reacción del ensayo MTT a los 30 minutos de incubación. Los tratamientos con aS se realizan en medio sin SFB durante 24h, momento en el cual se realiza un lavado y el ensayo de viabilidad (Figura 48) para las formas aS<sub>m</sub> y aS<sub>f</sub> sin marcar y marcadas con las células SH-SY5Y. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en viabilidad celular para las células derivadas de neuroblastoma SH-SY5Y incubadas durante 24h con las formas monomérica o fibrilar de aS, tanto en las formas marcadas como sin marcar. Una disminución en la viabilidad se vio para la incubación con el fluoróforo libre, así como para el control de muerte celular rotenona.

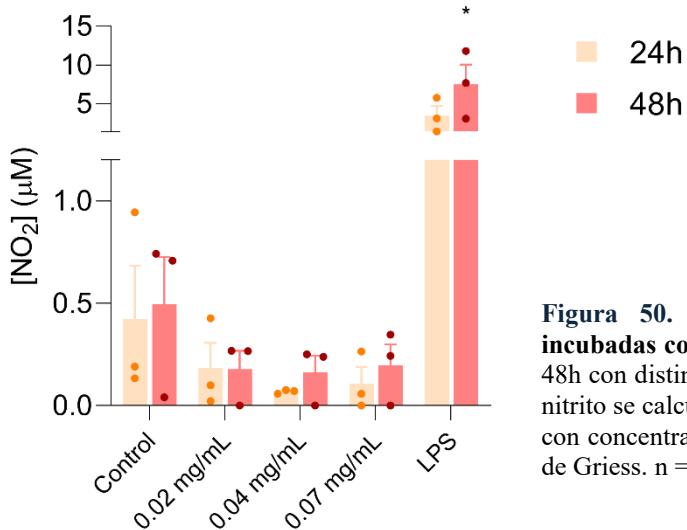
El ensayo de viabilidad para las células BV-2 de microglía para las formas sin marcar no evidenció un efecto significativo mediado por las especies agregadas de aS (Figura 49).



**Figura 49.** Ensayo viabilidad de células SH-SY5Y incubadas con  $aS_m$  y  $aS_f$ . Se incubaron células SH-SY5Y durante 24h con  $aS_m$  y  $aS_f$  (A) y marcadas con Alexa488 (B) a diferentes concentraciones. Se realizó el ensayo de viabilidad con MTT y se cuantificó la absorbancia a 590 nm, representándose normalizada contra la absorbancia del control sin tratar. Se incluyó un control con Alexa488 libre y rotenona 100  $\mu\text{M}$  durante 24h, así como un blanco sin células.  $n = 3$  o  $n = 2$

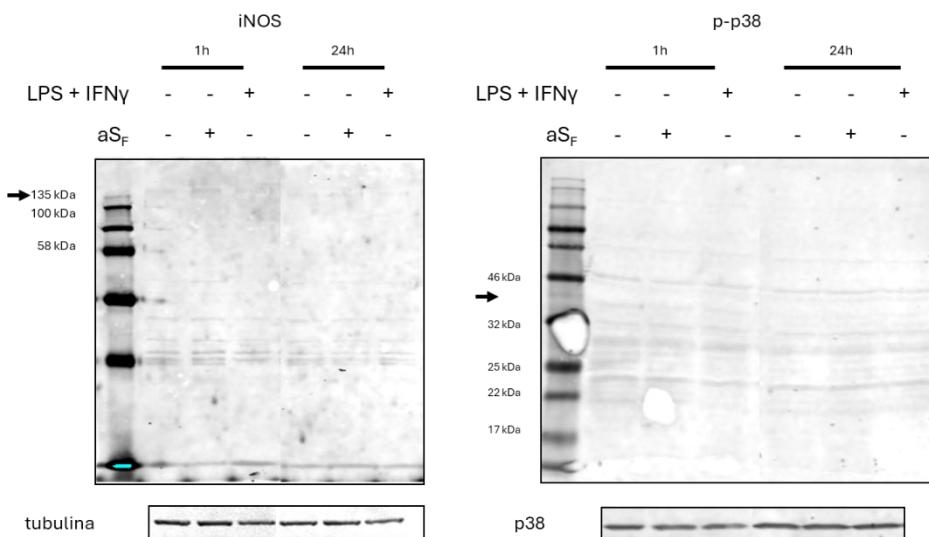


**Figura 48** Ensayo viabilidad de células BV-2 incubadas con  $aS_m$  y  $aS_f$ . Se incubaron células BV-2 durante 24h con  $aS_m$  y  $aS_f$  en su forma sin marcar. Se realizó el ensayo de viabilidad con MTT y se cuantificó la absorbancia a 590 nm, representándose normalizada contra la absorbancia del control sin tratar. Se incluyó un control con rotenona 100  $\mu\text{M}$  durante 24h como control de máxima muerte celular.  $n = 3$



**Figura 50. Producción de nitrito por células BV-2 incubadas con  $aS_f$ .** Se incubaron células BV-2 durante 24h o 48h con distintas concentraciones de  $aS_f$ . La concentración de nitrito se calculó a partir de una curva de calibración realizada con concentraciones conocidas de nitrito de sodio y el ensayo de Griess. n = 3.

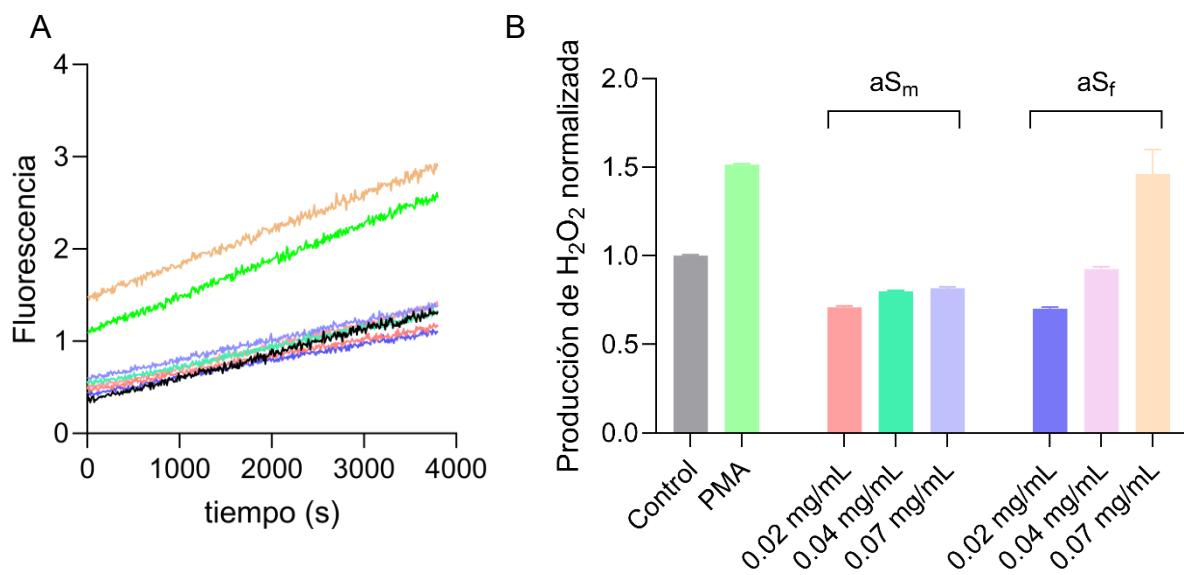
Para evaluar una respuesta funcional de las células se realizó la medición de nitrito en el medio de cultivo mediante un ensayo de Griess luego del tratamiento con fibras de aS en células BV-2 (Figura 50). El tratamiento con  $aS_f$  no induce la producción de nitrito a las concentraciones y tiempos estudiados. En el mismo sentido, se buscó mediante *western blot* un aumento en la expresión de la iNOS y la fosforilación de p38, un marcador de activación de estas células (Figura 51). Estos resultados no muestran una activación de estas células por interacción con  $aS_f$ , que sería indicativo de la vía mediada por receptores TLR. Sin embargo, tampoco es visible una activación por el control positivo con lipopolisacárido (LPS), por lo que no es posible descartar que las  $aS_f$  produzcan un efecto de activación microglial.



**Figura 51. Marcadores de activación de células BV-2 incubadas con aS.** Se evaluaron como marcadores de activación la expresión de la iNOS y fosforilación de p-38 (p-p38) en células BV-2 incubadas con fibras de aS 0.07 mg/mL durante 1h o 24h. Como control positivo se trató las células con LPS 10  $\mu$ g/mL + IFN 0.1  $\mu$ g/mL. Las flechas indican la altura a los pesos moleculares esperados.

Se buscó, además, la producción de oxidantes por medio de oxidación de la sonda Amplex Red. El ensayo de Amplex Red utiliza la enzima HRP que como sustratos utiliza  $H_2O_2$  (producido por las células) y el reactivo Amplex Red el cual es oxidado en la reacción por la HRP, produciendo un producto fluorescente que puede medirse en un lector de placas. Se incubaron células SH-SY5Y con aS<sub>m</sub> y aS<sub>f</sub> durante 24 horas y se realizó el ensayo. Se obtuvieron gráficas en función del tiempo de las cuales se calcula una pendiente en la región lineal. Estas pendientes corresponden a la producción de  $H_2O_2$ , la cual se normaliza contra la condición control sin tratar (Figura 52). El  $H_2O_2$  se produce normalmente debido a un aumento en la producción de  $O_2^{\bullet-}$ , derivado de una actividad mitocondrial alterada o de enzimas NOX. No se encontraron diferencias concluyentes en la producción de  $H_2O_2$ , por lo que no es posible concluir sobre alteraciones en la función mitocondrial y producción de especies oxidantes, aunque se observó una tendencia creciente a 0,07 mg/mL de aS<sub>f</sub>.

Se utilizó como control positivo el tratamiento con 12-miristato-13-acetato forbol (PMA), un activador de la enzima NOX (310,311).



**Figura 52. Producción de  $\text{H}_2\text{O}_2$  por células SH-SY5Y.** Se evaluó la formación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  por la sonda Amplex Red en células SH-SY5Y incubadas con aS<sub>m</sub> y aS<sub>f</sub> a diferentes concentraciones durante 24h. Las pendientes obtenidas se normalizaron contra el control sin tratar. n = 1.

## 12 CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

---

Los estudios sobre las modificaciones oxidativas en aS aún continúan siendo relevantes en biomedicina y la diversidad de estrategias, principalmente la mutagénesis, permiten diferente selectividad y especificidad hacia la modificación que se pretenda estudiar. En este trabajo se pretendió estudiar el rol que cumplen los residuos de tirosina Y39 e Y136 de la proteína aS en la formación de especies agregadas. La presencia de aS nitrada (así como otras proteínas) en los cuerpos de Lewy, indica que es una modificación presente en el tránsito de un proceso patológico como la EP, y dado que puede afectar sus capacidades de agregación, esta modificación podría afectar la susceptibilidad de las neuronas frente a la degeneración.

La nitración de aS ha sido reportada como una modificación que no afecta su capacidad de interactuar con vesículas lipídicas, aunque nitrar la Y39 puede producir una disminución en esta capacidad, seguramente debido a que se localiza en la región bisagra entre los dos segmentos  $\alpha$ -hélices. (173,289). Hasta la fecha pocos artículos publicados logran abordar la nitración de residuos específicos, por ejemplo, utilizando mutagénesis como este trabajo (298) o utilizando una estrategia de semi síntesis química con tal de obtener un péptido de aS mononitrado en Y39 e Y125 (289). En el primero, la mutagénesis Tyr→Phe no afecta la formación de fibras por lo que los -OH de tirosina no intervienen en el proceso de fibrilización, lo que está en acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo. Adicionalmente, el tratamiento con ONOO<sup>-</sup> inhibe la formación de fibras para todos los mutantes, y una ligera inhibición de su mutante 4YF. En cambio, utilizando una estrategia semisintética de aS nitrada, se observó que la nitración en Y39 e Y125 no inhibe completamente la fibrilización, pero las fibras formadas son morfológicamente diferentes a la forma sin modificar (289).

En este trabajo, el uso de un agente nitrante más selectivo que el peroxinitrito representa un nuevo abordaje para la generación de 3-NT con una disminución en la oxidación de otros aminoácidos. La nitración de aS por DNI tiene un gran rendimiento produciendo la nitración de las 4 tirosinas y menor formación de MetO y 3,3'-ditirosina (183,184), por lo que es una herramienta a continuar explorando su aplicabilidad en el estudio de la formación de 3NT. Adicionalmente, en este trabajo, el uso del mutante 4YF funcionó para controlar la relevancia de la MetO en el sistema de estudio con ONOO<sup>-</sup>. El tratamiento de este mutante con ONOO<sup>-</sup> tiene un efecto inhibitorio en la formación de

fibras, mientras que el tratamiento con DNI no produce dicha inhibición. Por ende, la oxidación de metionina es una modificación que se adiciona al efecto de la nitración. A pesar de inhibir la formación de fibras, la nitración de tirosina no impide la formación de oligómeros (aS salvaje tratada con DNI forma oligómeros). Como perspectivas de este trabajo, se propone estudiar los mecanismos de inhibición de la fibrilización por la 3NT, mediante herramientas computacionales que permitan evaluar modificaciones en la dinámica conformacional de aS nitrada y sin nitrar. A partir de allí, se podrían extraer hipótesis acerca de los mecanismos que producen la inhibición. También se propone estudiar el efecto de los oligómeros nitrados en un sistema celular *in vivo*, con tal de evaluar su impacto en funciones celulares y viabilidad, ya que no hay reportes en este sentido. Se propone como perspectiva evaluar viabilidad celular como una primera aproximación en cultivos primarios de neuronas comparando oligómeros de aS nitrados contra no nitrados. Encontrar diferencias en estas condiciones resultaría relevante para entender el rol de la nitración como *driver* de la patología neuronal, y no únicamente como marcador. Como estrategia alternativa al estudio del impacto de oxidación de metionina, nuestro laboratorio, además, cuenta con mutantes Met→Val (M5V y M5/116/127V), lo que permitirá continuar disgregando la contribución de cada oxidación al proceso de agregación de aS. En cuanto a la formación de dímeros, se debe continuar en su purificación para lograr realizar ensayos de agregación partiendo con mezclas de aS salvaje con dímeros específicos de aS. La obtención de columnas de HPLC apropiadas es una limitante para este objetivo actualmente. Sin embargo, la metodología de formación de dímeros con ABAP es buena y resta poner a punto la mayor formación posible mejorando el flujo de radicales y aprovechando la resistencia de la aS a altas temperaturas.

En cuanto al impacto de la aS y sus diferentes conformaciones en cultivos celulares, este trabajo pretendió la generación de la aS conjugada a una molécula fluorescente de Alexa488 como herramienta para su estudio intracelular. Esta estrategia es utilizada en varios estudios de aS con diferentes cultivos celulares y otorga buenos resultados (312–314). En este trabajo se comenzó obteniendo la forma monomérica marcada, de la cual se lograron formar fibras marcadas. No se encontraron diferencias estructurales entre las fibras marcadas y sin marcar, dado que el porcentaje de marcado es bajo. Esto es ventajoso dado que permite evaluar que las fibras tendrán comportamientos comparables entre sí y solo se evaluará la fluorescencia como forma de

visualizar la aS intracelular. Los oligómeros, en cambio, se generaron a partir de oligómeros preformados, por lo que no se espera que se produzcan alteraciones estructurales significativas.

Los estudios por microscopía y citometría de flujo en esta tesis mostraron que las diferentes conformaciones presentan diferencias en su interacción con células BV-2. Existen varios reportes sobre el efecto de las diferentes conformaciones de aS en esta línea celular. Un trabajo publicado por Hoffmann *et al.* en 2016 (305) ha analizado esta internalización de las distintas conformaciones de aS en esta línea celular utilizando inmunocitoquímica con anticuerpos contra aS. En este estudio se reportó una gran internalización de la aS<sub>f</sub> a diferencia de aS<sub>m</sub> y aS<sub>o</sub>, lo que concuerda con los resultados de este trabajo. Sin embargo, en esta tesis se vio la internalización de aS<sub>o</sub>, y su distribución intracelular parece ser diferente a las aS<sub>f</sub>, ya que presentan una localización más discreta. En contraposición, otro estudio con células BV-2 y aS<sub>m</sub> (307), a diferencia de esta tesis, se observa una internalización dependiente del gangliósido GM1 y del colesterol para el aS<sub>m</sub>. Esto se observó tanto por citometriá de flujo, por inmunocitoquímica y por *western blot* de lisados celulares. Esto está en contraposición con esta tesis y que por las mismas técnicas no se observó internalización de la forma aS<sub>m</sub>. Quizás diferencias en la línea celular puedan explicar esta oposición. Adicionalmente, otro estudio realizado con células SH-SY5Y y monómeros marcados fluorescentes demuestra su internalización por mecanismos de endocitosis, y que existe colocalización con marcadores endosomales tempranos (309).

Como perspectivas del trabajo aquí presentado, se debe continuar con la caracterización por citometría de flujo del ingreso de aS oligomérica en células BV-2. Una vez habiendo puesto a punto la técnica de marcado, microscopía y citometría, será posible pasar a cultivos celulares relevantes para las patologías neurodegenerativas como neuronas y astrocitos, por lo que se propone también continuar con estudios de co-localización para todas las formas marcadas en estos tipos celulares.

Por último, la activación de células BV-2 por aS<sub>f</sub> no logró ser observada en esta tesis ya que no se vio un aumento de expresión de la enzima iNOS, ni fosforilación de p-38. Sin embargo, estos marcadores se han observado en este modelo (306,308,315) de células BV-2 incubadas con aS<sub>f</sub> a una concentración de 10 µM y 1h de incubación.

En suma, el trabajo realizado logró caracterizar las modificaciones nitrooxidativas de aS, utilizando diversas técnicas y estrategias de oxidación. Por otro lado, se logró evidencias que la aS fibrilar y oligomérica es internalizada en células BV-2, aunque la activación fenotípica no se logró evidenciar. El rol de estos mecanismos para las distintas conformaciones de aS así como las formas oxidadas en modelos *in vivo* continúa siendo un área para explorar, por lo que como perspectivas más generales se propone la incorporación de estudios *in vivo*, modelos celulares relevantes del SNC como astrocitos y neuronas, tanto en cultivos aislados como co-cultivos. Eventualmente, existen modelos animales de propagación de aS que implican la inyección estereotáctica de aS en grupos neuronales discretos. Esto podría ser posible utilizando las formas de aS marcadas y evidenciar su propagación. El estudio de los mecanismos de oxidación y propagación de aS por el SNC permitiría avanzar en el entendimiento de la patología y el eventual desarrollo de moléculas que puedan actuar como fármacos interviniendo en estos mecanismos de endocitosis (bloqueando posibles receptores proteicos o procesos de activación fenotípica) lo que contribuirá al entendimiento de la progresión de la patología.

## **13 AGRADECIMIENTOS**

---

En primer lugar, al CEINBIO y su gente, por el crecimiento permitido.

A mis orientadores, Pepe y Ceci, quienes han estado apoyándome en toda mi formación académica, profesional y humana, desde que me incorporé al grupo *sinucleína*.

Al Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, UdeLaR y el Dr. Rafel Radi, por proporcionar un lugar como los hay pocos en nuestro medio para un desarrollo científico de alto nivel académico.

A lxs colaboradorxs que han contribuido en la enseñanza de técnicas de laboratorio, préstamo de reactivos e ideas, y discusión de resultados.

Dra. Dolores Piñeryro

Dr. Mauricio Mastrogiovanni

Dra. Natalia Rios

Dra. Jennyfer Martinez

Dr. Nicolas Campolo

Dr. Ari Zeida

Dra. Carolina Prolo y Dra. Lucía Piacenza

Dra. Patricia Cassina y Dr. Ernesto Miquel

Mariana Di Doménico

Dra. Gabriela Casanova

Dra. Gaby Martinez

Mg. Sofía Abramo

A los miembros del tribunal para evaluación de esta tesis, Dra. Giselle Prunell, Dr. Ernesto Miquel, Dr. Matías Möller.

A Pao, por la preparación de material de cultivo celular, electroforesis y demás *amenities* de laboratorio.

A las agencias financieradoras por el apoyo económico brindado: ANII, PEDECIBA y CSIC.

Agradecimiento especial a mi compañera de vida. Andy, esta tesis se sustentó también gracias a tu esfuerzo. Gracias por acompañarme en este recorrido y empujar para adelante siempre.

A mi familia, por el apoyo de siempre inagotable.

A la gente que me acompaña de muchas maneras en este trabajo. Entran aquí un montón de personas con quienes tengo la suerte de haber compartido las jornadas diarias de trabajo, distracciones y aprendizajes.

## 14 REFERENCIAS

---

1. Maroteaux L, Campanelli J, Scheller R. Synuclein: a neuron-specific protein localized to the nucleus and presynaptic nerve terminal. *J Neurosci*. 1988 Aug 1;8(8):2804–15.
2. Iwai A, Masliah E, Yoshimoto M, Ge N, Flanagan L, Rohan de Silva HA, et al. The precursor protein of non-A $\beta$  component of Alzheimer's disease amyloid is a presynaptic protein of the central nervous system. *Neuron*. 1995 Feb 1;14(2):467–75.
3. George JM. The synucleins. *Genome Biol*. 2002;3(1):reviews3002.1-reviews3002.6.
4. Nakai M, Fujita M, Waragai M, Sugama S, Wei J, Akatsu H, et al. Expression of  $\alpha$ -synuclein, a presynaptic protein implicated in Parkinson's disease, in erythropoietic lineage. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007 Jun;358(1):104–10.
5. Jakes R, Spillantini MG, Goedert M. Identification of two distinct synucleins from human brain. *FEBS Lett*. 1994;345(1):27–32.
6. Uversky VN, Li J, Souillac P, Millett IS, Doniach S, Jakes R, et al. Biophysical Properties of the Synucleins and Their Propensities to Fibrillate: INHIBITION OF  $\alpha$ -SYNUCLEIN ASSEMBLY BY  $\beta$ - AND  $\gamma$ -SYNUCLEINS\*. *J Biol Chem*. 2002 Apr 5;277(14):11970–8.
7. Jain MK, Singh P, Roy S, Bhat R. Comparative Analysis of the Conformation, Aggregation, Interaction, and Fibril Morphologies of Human  $\alpha$ -,  $\beta$ -, and  $\gamma$ -Synuclein Proteins. *Biochemistry*. 2018 Jul 3;57(26):3830–48.
8. Brown JWP, Buell AK, Michaels TCT, Meisl G, Carozza J, Flagmeier P, et al.  $\beta$ -Synuclein suppresses both the initiation and amplification steps of  $\alpha$ -synuclein aggregation via competitive binding to surfaces. *Sci Rep*. 2016 Nov 3;6(1):36010.
9. Leitao A, Bhumkar A, Hunter DJB, Gambin Y, Sierecki E. Unveiling a Selective Mechanism for the Inhibition of  $\alpha$ -Synuclein Aggregation by  $\beta$ -Synuclein. *Int J Mol Sci*. 2018 Jan 24;19(2):334.
10. Buchman VL, Hunter HJA, Pin $\tilde{n}$  LGP, Thompson J, Privalova EM, Ninkina NN, et al. Persyn, a Member of the Synuclein Family, Has a Distinct Pattern of Expression in the Developing Nervous System. *J Neurosci*. 1998 Nov 15;18(22):9335–41.
11. Duda JE, Shah U, Arnold SE, Lee VMY, Trojanowski JQ. The Expression of  $\alpha$ -,  $\beta$ -, and  $\gamma$ -Synucleins in Olfactory Mucosa from Patients with and without Neurodegenerative Diseases. *Exp Neurol*. 1999 Dec 1;160(2):515–22.
12. Lavedan C, Leroy E, Dehejia A, Buchholtz S, Dutra A, Nussbaum RL, et al. Identification, localization and characterization of the human  $\gamma$ -synuclein gene. *Hum Genet*. 1998 Jul 1;103(1):106–12.
13. Ji H, Liu YE, Jia T, Wang M, Liu J, Xiao G, et al. Identification of a breast cancer-specific gene, BCSG1, by direct differential cDNA sequencing. *Cancer Res*. 1997 Feb 15;57(4):759–64.

14. Ahmad M, Attoub S, Singh MN, Martin FL, El-Agnaf OMA. Gamma-synuclein and the progression of cancer. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* 2007 Nov;21(13):3419–30.
15. Liu H, Liu W, Wu Y, Zhou Y, Xue R, Luo C, et al. Loss of Epigenetic Control of Synuclein- $\gamma$  Gene as a Molecular Indicator of Metastasis in a Wide Range of Human Cancers. *Cancer Res.* 2005 Sep 1;65(17):7635–43.
16. Fauvet B, Mbefo MK, Fares MB, Desobry C, Michael S, Ardah MT, et al.  $\alpha$ -Synuclein in Central Nervous System and from Erythrocytes, Mammalian Cells, and *Escherichia coli* Exists Predominantly as Disordered Monomer. *J Biol Chem.* 2012 May 4;287(19):15345–64.
17. Weinreb PH, Zhen W, Poon AW, Conway KA, Lansbury PT. NACP, A Protein Implicated in Alzheimer's Disease and Learning, Is Natively Unfolded. *Biochemistry.* 1996 Jan 1;35(43):13709–15.
18. Theillet FX, Binolfi A, Bekei B, Martorana A, Rose HM, Stuiver M, et al. Structural disorder of monomeric  $\alpha$ -synuclein persists in mammalian cells. *Nature.* 2016 Feb;530(7588):45–50.
19. Wang W, Perovic I, Chittuluru J, Kaganovich A, Nguyen LTT, Liao J, et al. A soluble  $\alpha$ -synuclein construct forms a dynamic tetramer. *Proc Natl Acad Sci.* 2011 Oct 25;108(43):17797–802.
20. Bartels T, Choi JG, Selkoe DJ.  $\alpha$ -Synuclein occurs physiologically as a helically folded tetramer that resists aggregation. *Nature.* 2011 Sep;477(7362):107–10.
21. Binolfi A, Theillet FX, Selenko P. Bacterial in-cell NMR of human  $\alpha$ -synuclein: a disordered monomer by nature? *Biochem Soc Trans.* 2012 Sep 19;40(5):950–4.
22. Waudby CA, Camilloni C, Fitzpatrick AWP, Cabrita LD, Dobson CM, Vendruscolo M, et al. In-Cell NMR Characterization of the Secondary Structure Populations of a Disordered Conformation of  $\alpha$ -Synuclein within *E. coli* Cells. *PLoS ONE.* 2013 Aug 26;8(8):e72286.
23. Chandra S, Chen X, Rizo J, Jahn R, Südhof TC. A Broken  $\alpha$ -Helix in Folded  $\alpha$ -Synuclein\*. *J Biol Chem.* 2003 Apr 25;278(17):15313–8.
24. Eliezer D, Kutluay E, Bussell R, Browne G. Conformational properties of  $\alpha$ -synuclein in its free and lipid-associated states1. *J Mol Biol.* 2001 Apr 6;307(4):1061–73.
25. Giasson BI, Murray IVJ, Trojanowski JQ, Lee VMY. A Hydrophobic Stretch of 12 Amino Acid Residues in the Middle of  $\alpha$ -Synuclein Is Essential for Filament Assembly\*. *J Biol Chem.* 2001 Jan 26;276(4):2380–6.
26. Uéda K, Fukushima H, Masliah E, Xia Y, Iwai A, Yoshimoto M, et al. Molecular cloning of cDNA encoding an unrecognized component of amyloid in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 Dec 1;90(23):11282–6.
27. Hoyer W, Antony T, Cherny D, Heim G, Jovin TM, Subramaniam V. Dependence of  $\alpha$ -Synuclein Aggregate Morphology on Solution Conditions. *J Mol Biol.* 2002 Sep 13;322(2):383–93.

28. Wu KP, Kim S, Fela DA, Baum J. Characterization of conformational and dynamic properties of natively unfolded human and mouse  $\alpha$ -synuclein ensembles by NMR: implication for aggregation. *J Mol Biol.* 2008 May 16;378(5):1104–15.
29. Bertini I, Gupta YK, Luchinat C, Parigi G, Peana M, Sgheri L, et al. Paramagnetism-Based NMR Restraints Provide Maximum Allowed Probabilities for the Different Conformations of Partially Independent Protein Domains. *J Am Chem Soc.* 2007 Oct 1;129(42):12786–94.
30. Burré J, Sharma M, Tsetsenis T, Buchman V, Etherton M, Südhof TC.  $\alpha$ -Synuclein Promotes SNARE-Complex Assembly in vivo and in vitro. *Science.* 2010 Sep 24;329(5999):1663–7.
31. Jensen PH, Hager H, Nielsen MS, Højrup P, Gliemann J, Jakes R.  $\alpha$ -Synuclein Binds to Tau and Stimulates the Protein Kinase A-catalyzed Tau Phosphorylation of Serine Residues 262 and 356\*. *J Biol Chem.* 1999 Sep 3;274(36):25481–9.
32. Lautenschläger J, Stephens AD, Fusco G, Ströhl F, Curry N, Zacharopoulou M, et al. C-terminal calcium binding of  $\alpha$ -synuclein modulates synaptic vesicle interaction. *Nat Commun.* 2018 Feb 19;9(1):712.
33. Nakamura T, Yamashita H, Takahashi T, Nakamura S. Activated Fyn Phosphorylates  $\alpha$ -Synuclein at Tyrosine Residue 125. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001 Feb 2;280(4):1085–92.
34. Okochi M, Walter J, Koyama A, Nakajo S, Baba M, Iwatsubo T, et al. Constitutive Phosphorylation of the Parkinson’s Disease Associated  $\alpha$ -Synuclein\*. *J Biol Chem.* 2000 Jan 7;275(1):390–7.
35. Fujiwara H, Hasegawa M, Dohmae N, Kawashima A, Masliah E, Goldberg MS, et al.  $\alpha$ -Synuclein is phosphorylated in synucleinopathy lesions. *Nat Cell Biol.* 2002 Feb;4(2):160–4.
36. Uversky VN, Yamin G, Souillac PO, Goers J, Glaser CB, Fink AL. Methionine oxidation inhibits fibrillation of human  $\alpha$ -synuclein in vitro. *FEBS Lett.* 2002;517(1–3):239–44.
37. Giasson BI, Duda JE, Murray JV, Chen Q, Souza JM, Hurtig HI, et al. Oxidative Damage Linked to Neurodegeneration by Selective  $\alpha$ -Synuclein Nitration in Synucleinopathy Lesions. *Science.* 2000 Nov 3;290(5493):985–9.
38. Dorval V, Fraser PE. Small Ubiquitin-like Modifier (SUMO) Modification of Natively Unfolded Proteins Tau and  $\alpha$ -Synuclein\*. *J Biol Chem.* 2006 Apr 14;281(15):9919–24.
39. 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 Aug 1;15(2):361–72.
40. Galvin JE, Schuck TM, Lee VMY, Trojanowski JQ. Differential Expression and Distribution of  $\alpha$ -,  $\beta$ -, and  $\gamma$ -Synuclein in the Developing Human Substantia Nigra. *Exp Neurol.* 2001 Apr 1;168(2):347–55.

41. Bayer TA, Jäkälä P, Hartmann T, Egensperger R, Buslei R, Falkai P, et al. Neural expression profile of  $\alpha$ -synuclein in developing human cortex. *NeuroReport*. 1999 Sep 9;10(13):2799.
42. Withers GS, George JM, Banker GA, Clayton DF. Delayed localization of synelfin ( $\alpha$ -synuclein, NACP) to presynaptic terminals in cultured rat hippocampal neurons. *Dev Brain Res*. 1997 Mar 17;99(1):87–94.
43. Shekoohi S, Rajasekaran S, Patel D, Yang S, Liu W, Huang S, et al. Knocking out alpha-synuclein in melanoma cells dysregulates cellular iron metabolism and suppresses tumor growth. *Sci Rep*. 2021 Mar 4;11(1):5267.
44. Gajendran N, Rajasekaran S, Witt SN. Knocking out alpha-synuclein in melanoma cells downregulates L1CAM and decreases motility. *Sci Rep*. 2023 Jun 7;13:9243.
45. Watson JB, Hatami A, David H, Masliah E, Roberts K, Evans CE, et al. Alterations in Corticostriatal Synaptic Plasticity in Mice Over-Expressing Human  $\alpha$ -Synuclein. *Neuroscience*. 2009 Mar 17;159(2):501–13.
46. Abeliovich A, Schmitz Y, Fariñas I, Choi-Lundberg D, Ho WH, Castillo PE, et al. Mice Lacking  $\alpha$ -Synuclein Display Functional Deficits in the Nigrostriatal Dopamine System. *Neuron*. 2000 Jan 1;25(1):239–52.
47. Murphy DD, Rueter SM, Trojanowski JQ, Lee VMY. Synucleins Are Developmentally Expressed, and  $\alpha$ -Synuclein Regulates the Size of the Presynaptic Vesicular Pool in Primary Hippocampal Neurons. *J Neurosci*. 2000 May 1;20(9):3214–20.
48. Nemani VM, Lu W, Berge V, Nakamura K, Onoa B, Lee MK, et al. Increased Expression of Alpha-Synuclein Reduces Neurotransmitter Release by Inhibiting Synaptic Vesicle Reclustering After Endocytosis. *Neuron*. 2010 Jan 14;65(1):66–79.
49. Steidl JV, Gomez-Isla T, Mariash A, Ashe KH, Boland LM. Altered short-term hippocampal synaptic plasticity in mutant  $\alpha$ -synuclein transgenic mice. *NeuroReport*. 2003 Feb 10;14(2):219.
50. Liu S, Ninan I, Antonova I, Battaglia F, Trinchese F, Narasanna A, et al.  $\alpha$ -Synuclein produces a long-lasting increase in neurotransmitter release. *EMBO J*. 2004 Oct 28;23(22):4506.
51. Greten-Harrison B, Polydoro M, Morimoto-Tomita M, Diao L, Williams AM, Nie EH, et al.  $\alpha\beta\gamma$ -Synuclein triple knockout mice reveal age-dependent neuronal dysfunction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Oct 25;107(45):19573.
52. Anwar S, Peters O, Millership S, Ninkina N, Doig N, Connor-Robson N, et al. Functional Alterations to the Nigrostriatal System in Mice Lacking All Three Members of the Synuclein Family. *J Neurosci*. 2011 May 18;31(20):7264–74.
53. Vargas KJ, Makani S, Davis T, Westphal CH, Castillo PE, Chandra SS. Synucleins Regulate the Kinetics of Synaptic Vesicle Endocytosis. *J Neurosci*. 2014 Jul 9;34(28):9364–76.
54. Gureviciene I, Gurevicius K, Tanila H. Role of  $\alpha$ -synuclein in synaptic glutamate release. *Neurobiol Dis*. 2007 Oct 1;28(1):83–9.

55. 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  $\alpha$ -Synuclein. *J Neurosci*. 2002 Oct 15;22(20):8797–807.
56. Yavich L, Tanila H, Vepsäläinen S, Jäkälä P. Role of  $\alpha$ -Synuclein in Presynaptic Dopamine Recruitment. *J Neurosci*. 2004 Dec 8;24(49):11165–70.
57. Larsen KE, Schmitz Y, Troyer MD, Mosharov E, Dietrich P, Quazi AZ, et al.  $\alpha$ -Synuclein Overexpression in PC12 and Chromaffin Cells Impairs Catecholamine Release by Interfering with a Late Step in Exocytosis. *J Neurosci*. 2006 Nov 15;26(46):11915–22.
58. Senior SL, Ninkina N, Deacon R, Bannerman D, Buchman VL, Cragg SJ, et al. Increased striatal dopamine release and hyperdopaminergic-like behaviour in mice lacking both alpha-synuclein and gamma-synuclein. *Eur J Neurosci*. 2008 Feb;27(4):947–57.
59. Wu N, Joshi PR, Cepeda C, Masliah E, Levine MS. Alpha-Synuclein overexpression in mice alters synaptic communication i the corticostriatal pathway. *J Neurosci Res*. 2010 Jun;88(8):1764–76.
60. Chandra S, Fornai F, Kwon HB, Yazdani U, Atasoy D, Liu X, et al. Double-knockout mice for  $\alpha$ - and  $\beta$ -synucleins: Effect on synaptic functions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Oct 12;101(41):14966–71.
61. Lai Y, Kim S, Varkey J, Lou X, Song JK, Diao J, et al. Nonaggregated  $\alpha$ -Synuclein Influences SNARE-Dependent Vesicle Docking via Membrane Binding. *Biochemistry*. 2014 Jun 24;53(24):3889–96.
62. Lashuel HA, Overk CR, Oueslati A, Masliah E. The many faces of  $\alpha$ -synuclein: from structure and toxicity to therapeutic target. *Nat Rev Neurosci*. 2013 Jan;14(1):38–48.
63. Sharma M, Burré J.  $\alpha$ -Synuclein in synaptic function and dysfunction. *Trends Neurosci*. 2023 Feb;46(2):153–66.
64. Mohite GM, Kumar R, Panigrahi R, Navalkar A, Singh N, Datta D, et al. Comparison of Kinetics, Toxicity, Oligomer Formation, and Membrane Binding Capacity of  $\alpha$ -Synuclein Familial Mutations at the A53 Site, Including the Newly Discovered A53V Mutation. *Biochemistry*. 2018 Sep 4;57(35):5183–7.
65. Jo E, Fuller N, Rand RP, St George-Hyslop P, Fraser PE. Defective membrane interactions of familial Parkinson’s disease mutant A30P alpha-synuclein. *J Mol Biol*. 2002 Jan 25;315(4):799–807.
66. Fares MB, Ait-Bouziad N, Dikiy I, Mbefo MK, Jovićić A, Kiely A, et al. The novel Parkinson’s disease linked mutation G51D attenuates in vitro aggregation and membrane binding of  $\alpha$ -synuclein, and enhances its secretion and nuclear localization in cells. *Hum Mol Genet*. 2014 Sep 1;23(17):4491–509.
67. Ghosh D, Sahay S, Ranjan P, Salot S, Mohite GM, Singh PK, et al. The Newly Discovered Parkinson’s Disease Associated Finnish Mutation (A53E) Attenuates  $\alpha$ -Synuclein Aggregation and Membrane Binding. *Biochemistry*. 2014 Oct 21;53(41):6419–21.

68. Limbocker R, Staats R, Chia S, Ruggeri FS, Mannini B, Xu CK, et al. Squalamine and Its Derivatives Modulate the Aggregation of Amyloid- $\beta$  and  $\alpha$ -Synuclein and Suppress the Toxicity of Their Oligomers. *Front Neurosci.* 2021;15:680026.
69. Lee HJ, Choi C, Lee SJ. Membrane-bound alpha-synuclein has a high aggregation propensity and the ability to seed the aggregation of the cytosolic form. *J Biol Chem.* 2002 Jan 4;277(1):671–8.
70. Perni M, Galvagnion C, Maltsev A, Meisl G, Müller MBD, Challa PK, et al. A natural product inhibits the initiation of  $\alpha$ -synuclein aggregation and suppresses its toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017 Feb 7;114(6):E1009–17.
71. Gao V, Briano JA, Komer LE, Burré J. Functional and Pathological Effects of  $\alpha$ -Synuclein on Synaptic SNARE Complexes. *J Mol Biol.* 2023 Jan 15;435(1):167714.
72. Gorbatyuk OS, Li S, Nha Nguyen F, Manfredsson FP, Kondrikova G, Sullivan LF, et al.  $\alpha$ -Synuclein Expression in Rat Substantia Nigra Suppresses Phospholipase D2 Toxicity and Nigral Neurodegeneration. *Mol Ther.* 2010 Oct;18(10):1758–68.
73. Jenco JM, Rawlingson A, Daniels B, Morris AJ. Regulation of Phospholipase D2: Selective Inhibition of Mammalian Phospholipase D Isoenzymes by  $\alpha$ - and  $\beta$ -Synucleins. *Biochemistry.* 1998 Apr 1;37(14):4901–9.
74. Rappley I, Gitler AD, Selvy PE, LaVoie MJ, Levy BD, Brown HA, et al. Evidence that  $\alpha$ -Synuclein Does Not Inhibit Phospholipase D. *Biochemistry.* 2009 Feb 10;48(5):1077–83.
75. Perez RG, Waymire JC, Lin E, Liu JJ, Guo F, Zigmond MJ. A Role for  $\alpha$ -Synuclein in the Regulation of Dopamine Biosynthesis. *J Neurosci.* 2002 Apr 15;22(8):3090–9.
76. Chadchankar H, Ihalainen J, Tanila H, Yavich L. Decreased reuptake of dopamine in the dorsal striatum in the absence of alpha-synuclein. *Brain Res.* 2011 Mar 25;1382:37–44.
77. Guo JT, Chen AQ, Kong Q, Zhu H, Ma CM, Qin C. Inhibition of Vesicular Monoamine Transporter-2 Activity in  $\alpha$ -Synuclein Stably Transfected SH-SY5Y Cells. *Cell Mol Neurobiol.* 2007 Nov 6;28(1):35–47.
78. Gorbatyuk OS, Li S, Sullivan LF, Chen W, Kondrikova G, Manfredsson FP, et al. The phosphorylation state of Ser-129 in human alpha-synuclein determines neurodegeneration in a rat model of Parkinson disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Jan 15;105(2):763–8.
79. Anderson JP, Walker DE, Goldstein JM, de Laat R, Banducci K, Caccavello RJ, et al. Phosphorylation of Ser-129 is the dominant pathological modification of alpha-synuclein in familial and sporadic Lewy body disease. *J Biol Chem.* 2006 Oct 6;281(40):29739–52.
80. Foulds PG, Mitchell JD, Parker A, Turner R, Green G, Diggle P, et al. Phosphorylated  $\alpha$ -synuclein can be detected in blood plasma and is potentially a useful biomarker for Parkinson's disease. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* 2011 Dec;25(12):4127–37.

81. Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A, et al. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science*. 1997 Jun 27;276(5321):2045–7.
82. Krüger R, Kuhn 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 Feb;18(2):106–8.
83. Zarzanz JJ, Alegre J, Gómez-Esteban JC, Lezcano E, Ros R, Ampuero I, et al. The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia. *Ann Neurol*. 2004 Feb;55(2):164–73.
84. 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 Off J Mov Disord Soc*. 2013 Jun;28(6):811–3.
85. Kiely AP, Asi YT, Kara E, Limousin P, Ling H, Lewis P, et al. α-Synucleinopathy associated with G51D SNCA mutation: a link between Parkinson's disease and multiple system atrophy? *Acta Neuropathol (Berl)*. 2013 May;125(5):753–69.
86. Pasanen P, Myllykangas L, Sijtonen M, Raunio A, Kaakkola S, Lyytinen J, et al. Novel α-synuclein mutation A53E associated with atypical multiple system atrophy and Parkinson's disease-type pathology. *Neurobiol Aging*. 2014 Sep;35(9):2180.e1–5.
87. Chartier-Harlin MC, Kachergus J, Roumier C, Mouroux V, Douay X, Lincoln S, et al. Alpha-synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease. *Lancet Lond Engl*. 2004 Oct 25;364(9440):1167–9.
88. Singleton AB, Farrer M, Johnson J, Singleton A, Hague S, Kachergus J, et al. alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science*. 2003 Oct 31;302(5646):841.
89. Paisán-Ruiz C, Jain S, Evans EW, Gilks WP, Simón J, van der Brug M, et al. Cloning of the gene containing mutations that cause PARK8-linked Parkinson's disease. *Neuron*. 2004 Nov 18;44(4):595–600.
90. Aasly JO, Vilariño-Güell C, Dachsel JC, Webber PJ, West AB, Haugarvoll K, et al. Novel pathogenic LRRK2 p.Asn1437His substitution in familial Parkinson's disease. *Mov Disord Off J Mov Disord Soc*. 2010 Oct 15;25(13):2156–63.
91. Ozelius LJ, Senthil G, Saunders-Pullman R, Ohmann E, Deligtisch A, Tagliati M, et al. LRRK2 G2019S as a cause of Parkinson's disease in Ashkenazi Jews. *N Engl J Med*. 2006 Jan 26;354(4):424–5.
92. Kitada T, Asakawa S, Hattori N, Matsumine H, Yamamura Y, Minoshima S, et al. Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature*. 1998 Apr 9;392(6676):605–8.
93. Bonifati V, Rizzu P, van Baren MJ, Schaap O, Breedveld GJ, Krieger E, et al. Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Science*. 2003 Jan 10;299(5604):256–9.

94. Valente EM, Abou-Sleiman PM, Caputo V, Muqit MMK, Harvey K, Gispert S, et al. Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science*. 2004 May 21;304(5674):1158–60.
95. McKeith I, Mintzer J, Aarsland D, Burn D, Chiu H, Cohen-Mansfield J, et al. Dementia with Lewy bodies. *Lancet Neurol*. 2004 Jan;3(1):19–28.
96. Suh YH, Checler F. Amyloid precursor protein, presenilins, and alpha-synuclein: molecular pathogenesis and pharmacological applications in Alzheimer's disease. *Pharmacol Rev*. 2002 Sep;54(3):469–525.
97. Burn DJ, Jaros E. Multiple system atrophy: cellular and molecular pathology. *Mol Pathol*. 2001 Dec;54(6):419–26.
98. Armstrong MJ, Okun MS. Diagnosis and Treatment of Parkinson Disease: A Review. *JAMA*. 2020 Feb 11;323(6):548–60.
99. Elbaz A, Carcaillon L, Kab S, Moisan F. Epidemiology of Parkinson's disease. *Rev Neurol (Paris)*. 2016 Jan 1;172(1):14–26.
100. Tysnes OB, Storstein A. Epidemiology of Parkinson's disease. *J Neural Transm Vienna Austria* 1996. 2017 Aug;124(8):901–5.
101. Hayes MT. Parkinson's Disease and Parkinsonism. *Am J Med*. 2019 Jul;132(7):802–7.
102. Ascherio A, Schwarzchild MA. The epidemiology of Parkinson's disease: risk factors and prevention. *Lancet Neurol*. 2016 Nov;15(12):1257–72.
103. Ben-Shlomo Y, Darweesh S, Llibre-Guerra J, Marras C, San Luciano M, Tanner C. The epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet Lond Engl*. 2024 Jan 20;403(10423):283–92.
104. Mehra S, Gadhe L, Bera R, Sawner AS, Maji SK. Structural and Functional Insights into α-Synuclein Fibril Polymorphism. *Biomolecules*. 2021 Sep 28;11(10):1419.
105. Mehra S, Sahay S, Maji SK. α-Synuclein misfolding and aggregation: Implications in Parkinson's disease pathogenesis. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteomics*. 2019 Oct;1867(10):890–908.
106. Fink AL. The aggregation and fibrillation of alpha-synuclein. *Acc Chem Res*. 2006 Sep;39(9):628–34.
107. Wood SJ, Wypych J, Steavenson S, Louis JC, Citron M, Biere AL. alpha-synuclein fibrillogenesis is nucleation-dependent. Implications for the pathogenesis of Parkinson's disease. *J Biol Chem*. 1999 Jul 9;274(28):19509–12.
108. 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 Mar 18;5:9228.

109. Sant V, Matthes D, Mazal H, Antonschmidt L, Wieser F, Movellan KT, et al. Lipidic folding pathway of  $\alpha$ -Synuclein via a toxic oligomer. *Nat Commun.* 2025 Jan 17;16(1):760.
110. Lau HHC, Martinez-Valbuena I, So RWL, Mehra S, Silver NRG, Mao A, et al. The G51D SNCA mutation generates a slowly progressive  $\alpha$ -synuclein strain in early-onset Parkinson's disease. *Acta Neuropathol Commun.* 2023 May 3;11:72.
111. Chartier S, Duyckaerts C. Is Lewy pathology in the human nervous system chiefly an indicator of neuronal protection or of toxicity? *Cell Tissue Res.* 2018 Jul;373(1):149–60.
112. Wakabayashi K, Tanji K, Mori F, Takahashi H. The Lewy body in Parkinson's disease: molecules implicated in the formation and degradation of alpha-synuclein aggregates. *Neuropathol Off J Jpn Soc Neuropathol.* 2007 Oct;27(5):494–506.
113. Espay AJ, Lees AJ. Loss of monomeric alpha-synuclein (synucleinopenia) and the origin of Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord.* 2024 May 1
114. Fjorback WA, Varming K, Jensen HP. Determination of  $\alpha$ -synuclein concentration in human plasma using ELISA. *Scand J Clin Lab Invest.* 2007 Jan;67(4):431–5.
115. Koehler NKU, Stransky E, Meyer M, Gaertner S, Shing M, Schnaidt M, et al. Alpha-Synuclein Levels in Blood Plasma Decline with Healthy Aging. *PLoS ONE.* 2015 Apr 6;10(4):e0123444.
116. Parnetti L, Gaetani L, Eusebi P, Paciotti S, Hansson O, El-Agnaf O, et al. CSF and blood biomarkers for Parkinson's disease. *Lancet Neurol.* 2019 Jun 1;18(6):573–86.
117. Atik A, Stewart T, Zhang J. Alpha-Synuclein as a Biomarker for Parkinson's Disease. *Brain Pathol Zurich Switz.* 2016 May;26(3):410–8.
118. Borghi R, Marchese R, Negro A, Marinelli L, Forloni G, Zaccheo D, et al. Full length alpha-synuclein is present in cerebrospinal fluid from Parkinson's disease and normal subjects. *Neurosci Lett.* 2000 Jun 16;287(1):65–7.
119. El-Agnaf OMA, Salem SA, Paleologou KE, Cooper LJ, Fullwood NJ, Gibson MJ, et al. Alpha-synuclein implicated in Parkinson's disease is present in extracellular biological fluids, including human plasma. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* 2003 Oct;17(13):1945–7.
120. Yi LX, Tan EK, Zhou ZD. The  $\alpha$ -Synuclein Seeding Amplification Assay for Parkinson's Disease. *Int J Mol Sci.* 2025 Jan 4;26(1):389.
121. Luk KC, Kehm VM, Zhang B, O'Brien P, Trojanowski JQ, Lee VMY. Intracerebral inoculation of pathological  $\alpha$ -synuclein initiates a rapidly progressive neurodegenerative  $\alpha$ -synucleinopathy in mice. *J Exp Med.* 2012 May 7;209(5):975–86.
122. Luk KC, Kehm V, Carroll J, Zhang B, O'Brien P, Trojanowski JQ, et al. Pathological  $\alpha$ -Synuclein Transmission Initiates Parkinson-like Neurodegeneration in Non-transgenic Mice. *Science.* 2012 Nov 16;338(6109):949–53.

123. Jellinger KA. A critical evaluation of current staging of alpha-synuclein pathology in Lewy body disorders. *Biochim Biophys Acta*. 2009 Jul;1792(7):730–40.
124. Jellinger KA. Is Braak staging valid for all types of Parkinson's disease? *J Neural Transm Vienna Austria* 1996. 2019 Apr;126(4):423–31.
125. Lindvall O, Sawle G, Widner H, Rothwell JC, Björklund A, Brooks D, et al. Evidence for long-term survival and function of dopaminergic grafts in progressive Parkinson's disease. *Ann Neurol*. 1994 Feb;35(2):172–80.
126. Kordower JH, Chu Y, Hauser RA, Olanow CW, Freeman TB. Transplanted dopaminergic neurons develop PD pathologic changes: a second case report. *Mov Disord Off J Mov Disord Soc*. 2008 Dec 15;23(16):2303–6.
127. Kordower JH, Chu Y, Hauser RA, Freeman TB, Olanow CW. Lewy body-like pathology in long-term embryonic nigral transplants in Parkinson's disease. *Nat Med*. 2008 May;14(5):504–6.
128. Li JY, Englund E, Holton JL, Soulet D, Hagell P, Lees AJ, et al. Lewy bodies in grafted neurons in subjects with Parkinson's disease suggest host-to-graft disease propagation. *Nat Med*. 2008 May;14(5):501–3.
129. Kurowska Z, Englund E, Widner H, Lindvall O, Li JY, Brundin P. Signs of degeneration in 12–22-year old grafts of mesencephalic dopamine neurons in patients with Parkinson's disease. *J Park Dis*. 2011;1(1):83–92.
130. Luk KC, Song C, O'Brien P, Stieber A, Branch JR, Brunden KR, et al. Exogenous alpha-synuclein fibrils seed the formation of Lewy body-like intracellular inclusions in cultured cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Nov 24;106(47):20051–6.
131. Volpicelli-Daley LA, Luk KC, Patel TP, Tanik SA, Riddle DM, Stieber A, et al. Exogenous  $\alpha$ -synuclein fibrils induce Lewy body pathology leading to synaptic dysfunction and neuron death. *Neuron*. 2011 Oct 6;72(1):57–71.
132. Rey NL, Steiner JA, Maroof N, Luk KC, Madaj Z, Trojanowski JQ, et al. Widespread transneuronal propagation of  $\alpha$ -synucleinopathy triggered in olfactory bulb mimics prodromal Parkinson's disease. *J Exp Med*. 2016 Aug 22;213(9):1759–78.
133. Rey NL, Petit GH, Bousset L, Melki R, Brundin P. Transfer of human  $\alpha$ -synuclein from the olfactory bulb to interconnected brain regions in mice. *Acta Neuropathol (Berl)*. 2013 Oct;126(4):555–73.
134. Peelaerts W, Bousset L, Van der Perren A, Moskalyuk A, Pulizzi R, Giugliano M, et al.  $\alpha$ -Synuclein strains cause distinct synucleinopathies after local and systemic administration. *Nature*. 2015 Jun 18;522(7556):340–4.
135. Holmqvist S, Chutna O, Bousset L, Aldrin-Kirk P, Li W, Björklund T, et al. Direct evidence of Parkinson pathology spread from the gastrointestinal tract to the brain in rats. *Acta Neuropathol (Berl)*. 2014 Dec;128(6):805–20.
136. Kim S, Kwon SH, Kam TI, Panicker N, Karuppagounder SS, Lee S, et al. Transneuronal Propagation of Pathologic  $\alpha$ -Synuclein from the Gut to the Brain Models Parkinson's Disease. *Neuron*. 2019 Aug 21;103(4):627–641.e7.

137. Yuan X, Nie S, Yang Y, Liu C, Xia D, Meng L, et al. Propagation of pathologic  $\alpha$ -synuclein from kidney to brain may contribute to Parkinson's disease. *Nat Neurosci.* 2025 Mar;28(3):577–88.
138. Masuda-Suzukake M, Nonaka T, Hosokawa M, Oikawa T, Arai T, Akiyama H, et al. Prion-like spreading of pathological  $\alpha$ -synuclein in brain. *Brain J Neurol.* 2013 Apr;136(Pt 4):1128–38.
139. Earls RH, Menees KB, Chung J, Barber J, Gutekunst CA, Hazim MG, et al. Intrastriatal injection of preformed alpha-synuclein fibrils alters central and peripheral immune cell profiles in non-transgenic mice. *J Neuroinflammation.* 2019 Dec 3;16(1):250.
140. Lee HJ, Patel S, Lee SJ. Intravesicular Localization and Exocytosis of  $\alpha$ -Synuclein and its Aggregates. *J Neurosci.* 2005 Jun 22;25(25):6016–24.
141. Recasens A, Dehay B. Alpha-synuclein spreading in Parkinson's disease. *Front Neuroanat.* 2014 Dec 18.
142. Xie YX, Naseri NN, Fels J, Kharel P, Na Y, Lane D, et al. Lysosomal exocytosis releases pathogenic  $\alpha$ -synuclein species from neurons in synucleinopathy models. *Nat Commun.* 2022 Aug 22;13:4918.
143. Danzer KM, Kranich LR, Ruf WP, Cagsal-Getkin O, Winslow AR, Zhu L, et al. Exosomal cell-to-cell transmission of alpha synuclein oligomers. *Mol Neurodegener.* 2012 Aug 24;7:42.
144. Abounit S, Bousset L, Loria F, Zhu S, de Chaumont F, Pieri L, et al. Tunneling nanotubes spread fibrillar  $\alpha$ -synuclein by intercellular trafficking of lysosomes. *EMBO J.* 2016 Oct 4;35(19):2120–38.
145. Dilsizoglu Senol A, Samarani M, Syan S, Guardia CM, Nonaka T, Liv N, et al.  $\alpha$ -Synuclein fibrils subvert lysosome structure and function for the propagation of protein misfolding between cells through tunneling nanotubes. *PLoS Biol.* 2021 Jul 20;19(7):e3001287.
146. Paillusson S, Clairembault T, Biraud M, Neunlist M, Derkinderen P. Activity-dependent secretion of alpha-synuclein by enteric neurons. *J Neurochem.* 2013 May;125(4):512–7.
147. Vargas JY, Grudina C, Zurzolo C. The prion-like spreading of  $\alpha$ -synuclein: From in vitro to in vivo models of Parkinson's disease. *Ageing Res Rev.* 2019 Mar;50:89–101.
148. Fortin DL, Troyer MD, Nakamura K, Kubo S ichiro, Anthony MD, Edwards RH. Lipid Rafts Mediate the Synaptic Localization of  $\alpha$ -Synuclein. *J Neurosci.* 2004 Jul 28;24(30):6715–23.
149. Lee HJ, Suk JE, Bae EJ, Lee JH, Paik SR, Lee SJ. Assembly-dependent endocytosis and clearance of extracellular  $\alpha$ -synuclein. *Int J Biochem Cell Biol.* 2008 Jan 1;40(9):1835–49.

150. Fauré J, Lachenal G, Court M, Hirrlinger J, Chatellard-Causse C, Blot B, et al. Exosomes are released by cultured cortical neurones. *Mol Cell Neurosci*. 2006 Apr 1;31(4):642–8.
151. Ejlerskov P, Rasmussen I, Nielsen TT, Bergström AL, Tohyama Y, Jensen PH, et al. Tubulin Polymerization-promoting Protein (TPPP/p25 $\alpha$ ) Promotes Unconventional Secretion of  $\alpha$ -Synuclein through Exophagy by Impairing Autophagosome-Lysosome Fusion. *J Biol Chem*. 2013 Jun;288(24):17313–35.
152. Tunneling nanotubes spread fibrillar  $\alpha$ -synuclein by intercellular trafficking of lysosomes | *The EMBO Journal*
153. Hansen C, Angot E, Bergström AL, Steiner JA, Pieri L, Paul G, et al.  $\alpha$ -Synuclein propagates from mouse brain to grafted dopaminergic neurons and seeds aggregation in cultured human cells. *J Clin Invest*. 2011 Feb 1;121(2):715–25.
154. Mao X, Ou MT, Karuppagounder SS, Kam TI, Yin X, Xiong Y, et al. Pathological  $\alpha$ -synuclein transmission initiated by binding lymphocyte-activation gene 3. *Science*. 2016 Sep 30;353(6307):aah3374.
155. Human Astrocytes Transfer Aggregated Alpha-Synuclein via Tunneling Nanotubes | *Journal of Neuroscience*
156. Schildknecht S, Gerding HR, Karreman C, Drescher M, Lashuel HA, Outeiro TF, et al. Oxidative and nitrative alpha-synuclein modifications and proteostatic stress: implications for disease mechanisms and interventions in synucleinopathies. *J Neurochem*. 2013 May;125(4):491–511.
157. Ischiropoulos H. Oxidative modifications of alpha-synuclein. *Ann N Y Acad Sci*. 2003 Jun;991:93–100.
158. 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 Off J Soc Neurosci*. 2008 Apr 16;28(16):4115–22.
159. Chinta SJ, Andersen JK. Redox imbalance in Parkinson’s disease. *Biochim Biophys Acta*. 2008 Nov;1780(11):1362–7.
160. Floyd RA, Hensley K. Oxidative stress in brain aging. Implications for therapeutics of neurodegenerative diseases. *Neurobiol Aging*. 2002;23(5):795–807.
161. Murakami K, Shimizu T. Cytoplasmic superoxide radical: a possible contributing factor to intracellular A $\beta$  oligomerization in Alzheimer disease. *Commun Integr Biol*. 2012 May 1;5(3):255–8.
162. Ramalingam M, Kim SJ. Reactive oxygen/nitrogen species and their functional correlations in neurodegenerative diseases. *J Neural Transm Vienna Austria* 1996. 2012 Aug;119(8):891–910.
163. Butterfield DA, Dalle-Donne I. Redox proteomics: from protein modifications to cellular dysfunction and disease. *Mass Spectrom Rev*. 2014 Jan;33(1):1–6.

164. Souza JM, Giasson BI, Chen Q, Lee VM, Ischiropoulos H. Dityrosine cross-linking promotes formation of stable alpha -synuclein polymers. Implication of nitrative and oxidative stress in the pathogenesis of neurodegenerative synucleinopathies. *J Biol Chem.* 2000 Jun 16;275(24):18344–9.
165. Souza JM, Peluffo G, Radi R. Protein tyrosine nitration--functional alteration or just a biomarker? *Free Radic Biol Med.* 2008 Aug 15;45(4):357–66.
166. 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 Feb 14;118(3):1338–408.
167. Reynolds MR, Berry RW, Binder LI. Site-specific nitration and oxidative dityrosine bridging of the tau protein by peroxynitrite: implications for Alzheimer's disease. *Biochemistry.* 2005 Feb 8;44(5):1690–700.
168. Danielson SR, Held JM, Schilling B, Oo M, Gibson BW, Andersen JK. Preferentially increased nitration of  $\alpha$ -synuclein at tyrosine-39 in a cellular oxidative model of Parkinson's disease. *Anal Chem.* 2009 Sep 15;81(18):7823–8.
169. 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 Jun 5;273(23):14085–9.
170. Moreno DM, Martí MA, De Biase PM, Estrin DA, Demichelis V, Radi R, et al. Exploring the molecular basis of human manganese superoxide dismutase inactivation mediated by tyrosine 34 nitration. *Arch Biochem Biophys.* 2011 Mar 15;507(2):304–9.
171. Cassina AM, Hodara R, Souza JM, Thomson L, Castro L, Ischiropoulos H, et al. Cytochrome c nitration by peroxynitrite. *J Biol Chem.* 2000 Jul 14;275(28):21409–15.
172. Monteiro HP, Arai RJ, Travassos LR. Protein tyrosine phosphorylation and protein tyrosine nitration in redox signaling. *Antioxid Redox Signal.* 2008 May;10(5):843–89.
173. Hodara R, Norris EH, Giasson BI, Mishizen-Eberz AJ, Lynch DR, Lee VMY, et al. Functional consequences of alpha-synuclein tyrosine nitration: diminished binding to lipid vesicles and increased fibril formation. *J Biol Chem.* 2004 Nov 12;279(46):47746–53.
174. Gauba V, Grünwald 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 Aug 1;108(31):12821–6.
175. 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 May 31;102(22):7928–33.
176. Allen Reish HE, Standaert DG. Role of  $\alpha$ -synuclein in inducing innate and adaptive immunity in Parkinson disease. *J Park Dis.* 2015;5(1):1–19.
177. Ferreira SA, Romero-Ramos M. Microglia Response During Parkinson's Disease: Alpha-Synuclein Intervention. *Front Cell Neurosci.* 2018;12:247.

178. Kannarkat GT, Boss JM, Tansey MG. The role of innate and adaptive immunity in Parkinson's disease. *J Park Dis.* 2013;3(4):493–514.
179. Uversky VN, Yamin G, Munishkina LA, Karymov MA, Millett IS, Doniach S, et al. Effects of nitration on the structure and aggregation of alpha-synuclein. *Brain Res Mol Brain Res.* 2005 Mar 24;134(1):84–102.
180. Sokolovsky M, Riordan JF, Vallee BL. Tetranitromethane. A reagent for the nitration of tyrosyl residues in proteins. *Biochemistry.* 1966 Nov;5(11):3582–9.
181. Rocha BS, Gago B, Barbosa RM, Lundberg JO, Mann GE, Radi R, et al. Pepsin is nitrated in the rat stomach, acquiring antiulcerogenic activity: A novel interaction between dietary nitrate and gut proteins. *Free Radic Biol Med.* 2013 May 1;58:26–34.
182. Yang T, Li X, Deng S, Qi X, Cong H, Cheng HG, et al. From N-H Nitration to Controllable Aromatic Mononitration and Dinitration-The Discovery of a Versatile and Powerful N-Nitropyrazole Nitrating Reagent. *JACS Au.* 2022 Sep 26;2(9):2152–61.
183. Long T, Liu L, Tao Y, Zhang W, Quan J, Zheng J, et al. Light-Controlled Tyrosine Nitration of Proteins. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2021 Jun 7;60(24):13414–22.
184. Rios N, Aicardo A, Chavarría C, Ivagnes R, Mastrogiovanni M, Radi R, et al. Photochemically-induced protein tyrosine nitration *in vitro* and *in cellula* by 5-methyl-1,4-dinitro-1*H*-imidazole (DNI): synthesis and biochemical characterization. *Free Radic Biol Med.* 2023 Nov 20;209:116–26.
185. Kim HY, Gladyshev VN. Methionine sulfoxide reductases: selenoprotein forms and roles in antioxidant protein repair in mammals. *Biochem J.* 2007 Nov 1;407(3):321–9.
186. Uceda AB, Frau J, Vilanova B, Adrover M. On the effect of methionine oxidation on the interplay between α-synuclein and synaptic-like vesicles. *Int J Biol Macromol.* 2023 Feb 28;229:92–104.
187. Wassef R, Haenold R, Hansel A, Brot N, Heinemann SH, Hoshi T. Methionine sulfoxide reductase A and a dietary supplement S-methyl-L-cysteine prevent Parkinson's-like symptoms. *J Neurosci Off J Soc Neurosci.* 2007 Nov 21;27(47):12808–16.
188. 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 Apr 21;281(16):10816–24.
189. McGeer PL, Itagaki S, Boyes BE, McGeer EG. Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. *Neurology.* 1988 Aug;38(8):1285–91.
190. Nalls MA, Blauwendaart C, Vallerga CL, Heilbron K, Bandres-Ciga S, Chang D, et al. Identification of novel risk loci, causal insights, and heritable risk for Parkinson's disease: a meta-genome wide association study. *Lancet Neurol.* 2019 Dec;18(12):1091–102.
191. Pierce S, Coetzee GA. Parkinson's disease-associated genetic variation is linked to quantitative expression of inflammatory genes. *PloS One.* 2017;12(4):e0175882.

192. Nagatsu T, Mogi M, Ichinose H, Togari A. Cytokines in Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl.* 2000;(58):143–51.
193. Harms AS, Ferreira SA, Romero-Ramos M. Periphery and brain, innate and adaptive immunity in Parkinson's disease. *Acta Neuropathol (Berl).* 2021 Apr;141(4):527–45.
194. Tansey MG, Wallings RL, Houser MC, Herrick MK, Keating CE, Joers V. Inflammation and immune dysfunction in Parkinson disease. *Nat Rev Immunol.* 2022 Nov;22(11):657–73.
195. Zhang Z, Niu K, Huang T, Guo J, Xarbat G, Gong X, et al. Microglia depletion reduces neurodegeneration and remodels extracellular matrix in a mouse Parkinson's disease model triggered by  $\alpha$ -synuclein overexpression. *NPJ Park Dis.* 2025 Jan 9;11(1):15.
196. Thi Lai T, Kim YE, Nguyen LTN, Thi Nguyen T, Kwak IH, Richter F, et al. Microglial inhibition alleviates alpha-synuclein propagation and neurodegeneration in Parkinson's disease mouse model. *NPJ Park Dis.* 2024 Feb 2;10(1):32.
197. Tu HY, Yuan BS, Hou XO, Zhang XJ, Pei CS, Ma YT, et al.  $\alpha$ -synuclein suppresses microglial autophagy and promotes neurodegeneration in a mouse model of Parkinson's disease. *Aging Cell.* 2021 Dec;20(12):e13522.
198. Kim C, Ho DH, Suk JE, You S, Michael S, Kang J, et al. Neuron-released oligomeric  $\alpha$ -synuclein is an endogenous agonist of TLR2 for paracrine activation of microglia. *Nat Commun.* 2013;4:1562.
199. Brochard V, Combadière B, Prigent A, Laouar Y, Perrin A, Beray-Berthat V, et al. Infiltration of CD4+ lymphocytes into the brain contributes to neurodegeneration in a mouse model of Parkinson disease. *J Clin Invest.* 2009 Jan;119(1):182–92.
200. Horvath I, Iashchishyn IA, Forsgren L, Morozova-Roche LA. Immunochemical Detection of  $\alpha$ -Synuclein Autoantibodies in Parkinson's Disease: Correlation between Plasma and Cerebrospinal Fluid Levels. *ACS Chem Neurosci.* 2017 Jun 21;8(6):1170–6.
201. Sulzer D, Alcalay RN, Garretti F, Cote L, Kanter E, Agin-Liebes J, et al. T cells from patients with Parkinson's disease recognize  $\alpha$ -synuclein peptides. *Nature.* 2017 Jun 29;546(7660):656–61.
202. Scheiblitz H, Eikens F, Wischhof L, Opitz S, Jüngling K, Cserép C, et al. Microglia rescue neurons from aggregate-induced neuronal dysfunction and death through tunneling nanotubes. *Neuron.* 2024 Sep 25;112(18):3106-3125.e8.
203. Chavarría C, Ivagnes R, Souza JM. Extracellular Alpha-Synuclein: Mechanisms for Glial Cell Internalization and Activation. *Biomolecules.* 2022 Apr 30;12(5):655.
204. Triebel F, Jitsukawa S, Baixeras E, Roman-Roman S, Genevee C, Viegas-Pequignot E, et al. LAG-3, a novel lymphocyte activation gene closely related to CD4. *J Exp Med.* 1990 May 1;171(5):1393–405.

205. Baixeras E, Huard B, Miossec C, Jitsukawa S, Martin M, Hercend T, et al. Characterization of the lymphocyte activation gene 3-encoded protein. A new ligand for human leukocyte antigen class II antigens. *J Exp Med.* 1992 Aug 1;176(2):327–37.
206. Galatro TF, Holtman IR, Lerario AM, Vainchtein ID, Brouwer N, Sola PR, et al. Transcriptomic analysis of purified human cortical microglia reveals age-associated changes. *Nat Neurosci.* 2017 Aug;20(8):1162–71.
207. Gu H, Yang X, Mao X, Xu E, Qi C, Wang H, et al. Lymphocyte Activation Gene 3 (Lag3) Contributes to  $\alpha$ -Synucleinopathy in  $\alpha$ -Synuclein Transgenic Mice. *Front Cell Neurosci.* 2021;15:656426.
208. Yang X, Jeong D, Madeo G, Kumbhar R, Wang N, Niu L, et al. Neuronal LAG3 facilitates pathogenic  $\alpha$ -synuclein neuron-to-neuron propagation. *bioRxiv.* 2025 Jan 3;2025.01.03.631221.
209. Freeze B, Acosta D, Pandya S, Zhao Y, Raj A. Regional expression of genes mediating trans-synaptic alpha-synuclein transfer predicts regional atrophy in Parkinson disease. *NeuroImage Clin.* 2018;18:456–66.
210. García-Martín E, Pastor P, Gómez-Tabales J, Alonso-Navarro H, Alvarez I, Buongiorno M, et al. Association between LAG3/CD4 gene variants and risk of Parkinson's disease. *Eur J Clin Invest.* 2022 Nov;52(11):e13847.
211. Guo W, Zhou M, Qiu J, Lin Y, Chen X, Huang S, et al. Association of LAG3 genetic variation with an increased risk of PD in Chinese female population. *J Neuroinflammation.* 2019 Dec 17;16(1):270.
212. Zhang S, Liu YQ, Jia C, Lim YJ, Feng G, Xu E, et al. Mechanistic basis for receptor-mediated pathological  $\alpha$ -synuclein fibril cell-to-cell transmission in Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2021 Jun 29;118(26):e2011196118.
213. Dedmon MM, Lindorff-Larsen K, Christodoulou J, Vendruscolo M, Dobson CM. Mapping long-range interactions in alpha-synuclein using spin-label NMR and ensemble molecular dynamics simulations. *J Am Chem Soc.* 2005 Jan 19;127(2):476–7.
214. Emmenegger M, De Cecco E, Hruska-Plochan M, Eninger T, Schneider MM, Barth M, et al. LAG3 is not expressed in human and murine neurons and does not modulate  $\alpha$ -synucleinopathies. *EMBO Mol Med.* 2021 Sep 7;13(9):e14745.
215. Mao X, Gu H, Kim D, Kimura Y, Wang N, Xu E, et al. Aplp1 interacts with Lag3 to facilitate transmission of pathologic  $\alpha$ -synuclein. *Nat Commun.* 2024 May 31;15:4663.
216. Liu Y, Sorce S, Nuvolone M, Domange J, Aguzzi A. Lymphocyte activation gene 3 (Lag3) expression is increased in prion infections but does not modify disease progression. *Sci Rep.* 2018 Oct 2;8(1):14600.
217. Zhang Q, Duan Q, Gao Y, He P, Huang R, Huang H, et al. Cerebral Microvascular Injury Induced by Lag3-Dependent  $\alpha$ -Synuclein Fibril Endocytosis Exacerbates Cognitive Impairment in a Mouse Model of  $\alpha$ -Synucleinopathies. *Adv Sci Wein Baden-Wurtt Ger.* 2023 Sep;10(25):e2301903.

218. Zhang Y, Chen K, Sloan SA, Bennett ML, Scholze AR, O'Keeffe S, et al. An RNA-sequencing transcriptome and splicing database of glia, neurons, and vascular cells of the cerebral cortex. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 2014 Sep 3;34(36):11929–47.
219. Zhang S, Xiang H, Tao Y, Li J, Zeng S, Xu Q, et al. Inhibitor Development for  $\alpha$ -Synuclein Fibril's Disordered Region to Alleviate Parkinson's Disease Pathology. *J Am Chem Soc*. 2024 Oct 16;146(41):28282–95.
220. Gay NJ, Gangloff M. Structure and function of Toll receptors and their ligands. *Annu Rev Biochem*. 2007;76:141–65.
221. Anthoney N, Foldi I, Hidalgo A. Toll and Toll-like receptor signalling in development. *Dev Camb Engl*. 2018 Apr 25;145(9):dev156018.
222. Lim KH, Staudt LM. Toll-like receptor signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013 Jan 1;5(1):a011247.
223. Bsibsi M, Ravid R, Gveric D, van Noort JM. Broad expression of Toll-like receptors in the human central nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2002 Nov;61(11):1013–21.
224. Jack CS, Arbour N, Manusow J, Montgrain V, Blain M, McCrea E, et al. TLR signaling tailors innate immune responses in human microglia and astrocytes. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2005 Oct 1;175(7):4320–30.
225. Zhou Y, Ye L, Wan Q, Zhou L, Wang X, Li J, et al. Activation of Toll-like receptors inhibits herpes simplex virus-1 infection of human neuronal cells. *J Neurosci Res*. 2009 Oct;87(13):2916–25.
226. Kim Y, Zhou P, Qian L, Chuang JZ, Lee J, Li C, et al. MyD88-5 links mitochondria, microtubules, and JNK3 in neurons and regulates neuronal survival. *J Exp Med*. 2007 Sep 3;204(9):2063–74.
227. Blum-Degen D, Müller T, Kuhn W, Gerlach M, Przuntek H, Riederer P. Interleukin-1 beta and interleukin-6 are elevated in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's and de novo Parkinson's disease patients. *Neurosci Lett*. 1995 Dec 29;202(1–2):17–20.
228. Mogi M, Harada M, Narabayashi H, Inagaki H, Minami M, Nagatsu T. Interleukin (IL)-1 beta, IL-2, IL-4, IL-6 and transforming growth factor-alpha levels are elevated in ventricular cerebrospinal fluid in juvenile parkinsonism and Parkinson's disease. *Neurosci Lett*. 1996 Jun 14;211(1):13–6.
229. Qin XY, Zhang SP, Cao C, Loh YP, Cheng Y. Aberrations in Peripheral Inflammatory Cytokine Levels in Parkinson Disease: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Neurol*. 2016 Nov 1;73(11):1316–24.
230. Nagatsu T, Mogi M, Ichinose H, Togari A. Changes in cytokines and neurotrophins in Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl*. 2000;(60):277–90.
231. Drouin-Ouellet J, St-Amour I, Saint-Pierre M, Lamontagne-Proulx J, Kriz J, Barker RA, et al. Toll-like receptor expression in the blood and brain of patients and a mouse model of Parkinson's disease. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2014 Dec 7;18(6):pyu103.

232. Doorn KJ, Moors T, Drukarch B, van de Berg WD, Lucassen PJ, van Dam AM. Microglial phenotypes and toll-like receptor 2 in the substantia nigra and hippocampus of incidental Lewy body disease cases and Parkinson's disease patients. *Acta Neuropathol Commun.* 2014 Aug 7;2:90.
233. Dzamko N, Gysbers A, Perera G, Bahar A, Shankar A, Gao J, et al. Toll-like receptor 2 is increased in neurons in Parkinson's disease brain and may contribute to alpha-synuclein pathology. *Acta Neuropathol (Berl).* 2017 Feb;133(2):303–19.
234. Béraud D, Twomey M, Bloom B, Mittereder A, Ton V, Neitzke K, et al. α-Synuclein Alters Toll-Like Receptor Expression. *Front Neurosci.* 2011;5:80.
235. Li X, Xue L, Sun J, Sun Y, Xie A. Single nucleotide polymorphisms in the toll-like receptor 2 (TLR2) gene are associated with sporadic Parkinson's disease in the North-eastern Han Chinese population. *Neurosci Lett.* 2017 Aug 24;656:72–6.
236. Codolo G, Plotegher N, Pozzobon T, Brucale M, Tessari I, Bubacco L, et al. Triggering of inflammasome by aggregated α-synuclein, an inflammatory response in synucleinopathies. *PloS One.* 2013;8(1):e55375.
237. Gustot A, Gallea JI, Sarroukh R, Celej MS, Ruysschaert JM, Raussens V. Amyloid fibrils are the molecular trigger of inflammation in Parkinson's disease. *Biochem J.* 2015 Nov 1;471(3):323–33.
238. Dutta D, Jana M, Majumder M, Mondal S, Roy A, Pahan K. Selective targeting of the TLR2/MyD88/NF-κB pathway reduces α-synuclein spreading in vitro and in vivo. *Nat Commun.* 2021 Sep 10;12(1):5382.
239. Daniele SG, Béraud D, Davenport C, Cheng K, Yin H, Maguire-Zeiss KA. Activation of MyD88-dependent TLR1/2 signaling by misfolded α-synuclein, a protein linked to neurodegenerative disorders. *Sci Signal.* 2015 May 12;8(376):ra45.
240. Kim C, Rockenstein E, Spencer B, Kim HK, Adame A, Trejo M, et al. Antagonizing Neuronal Toll-like Receptor 2 Prevents Synucleinopathy by Activating Autophagy. *Cell Rep.* 2015 Oct 27;13(4):771–82.
241. Kim C, Spencer B, Rockenstein E, Yamakado H, Mante M, Adame A, et al. Immunotherapy targeting toll-like receptor 2 alleviates neurodegeneration in models of synucleinopathy by modulating α-synuclein transmission and neuroinflammation. *Mol Neurodegener.* 2018 Aug 9;13(1):43.
242. Chedid J, Labrador-Garrido A, Zhong S, Gao J, Zhao Y, Perera G, et al. A small molecule toll-like receptor antagonist rescues α-synuclein fibril pathology. *J Biol Chem.* 2022 Aug;298(8):102260.
243. Xia Y, Zhang G, Kou L, Yin S, Han C, Hu J, et al. Reactive microglia enhance the transmission of exosomal α-synuclein via toll-like receptor 2. *Brain J Neurol.* 2021 Aug 17;144(7):2024–37.
244. Kim C, Kwon S, Iba M, Spencer B, Rockenstein E, Mante M, et al. Effects of innate immune receptor stimulation on extracellular α-synuclein uptake and degradation by brain resident cells. *Exp Mol Med.* 2021 Feb;53(2):281–90.

245. Hughes CD, Choi ML, Ryten M, Hopkins L, Drews A, Botía JA, et al. Picomolar concentrations of oligomeric alpha-synuclein sensitizes TLR4 to play an initiating role in Parkinson's disease pathogenesis. *Acta Neuropathol (Berl)*. 2019 Jan;137(1):103–20.
246. Shin WH, Jeon MT, Leem E, Won SY, Jeong KH, Park SJ, et al. Induction of microglial toll-like receptor 4 by prothrombin kringle-2: a potential pathogenic mechanism in Parkinson's disease. *Sci Rep*. 2015 Oct 6;5:14764.
247. Conte C, Ingrassia A, Breve J, Bol JJ, Timmermans-Huisman E, van Dam AM, et al. Toll-like Receptor 4 Is Upregulated in Parkinson's Disease Patients and Co-Localizes with pSer129aSyn: A Possible Link with the Pathology. *Cells*. 2023 May 11;12(10):1368.
248. Mariucci G, Pagiotti R, Galli F, Romani L, Conte C. The Potential Role of Toll-Like Receptor 4 in Mediating Dopaminergic Cell Loss and Alpha-Synuclein Expression in the Acute MPTP Mouse Model of Parkinson's Disease. *J Mol Neurosci MN*. 2018 Apr;64(4):611–8.
249. Perez-Pardo P, Dodiya HB, Engen PA, Forsyth CB, Huschens AM, Shaikh M, et al. Role of TLR4 in the gut-brain axis in Parkinson's disease: a translational study from men to mice. *Gut*. 2019 May;68(5):829–43.
250. Noelker C, Morel L, Lescot T, Osterloh A, Alvarez-Fischer D, Breloer M, et al. Toll like receptor 4 mediates cell death in a mouse MPTP model of Parkinson disease. *Sci Rep*. 2013;3:1393.
251. Stefanova N, Fellner L, Reindl M, Masliah E, Poewe W, Wenning GK. Toll-like receptor 4 promotes  $\alpha$ -synuclein clearance and survival of nigral dopaminergic neurons. *Am J Pathol*. 2011 Aug;179(2):954–63.
252. Venezia S, Kaufmann WA, Wenning GK, Stefanova N. Toll-like receptor 4 deficiency facilitates  $\alpha$ -synuclein propagation and neurodegeneration in a mouse model of prodromal Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*. 2021 Oct;91:59–65.
253. Rannikko EH, Weber SS, Kahle PJ. Exogenous  $\alpha$ -synuclein induces toll-like receptor 4 dependent inflammatory responses in astrocytes. *BMC Neurosci*. 2015 Sep 7;16:57.
254. Fellner L, Irschick R, Schanda K, Reindl M, Klimaschewski L, Poewe W, et al. Toll-like receptor 4 is required for  $\alpha$ -synuclein dependent activation of microglia and astroglia. *Glia*. 2013 Mar;61(3):349–60.
255. Chung LYR, Lin YT, Liu C, Tai YC, Lin HY, Lin CH, et al. Neuroinflammation Upregulated Neuronal Toll-Like Receptors 2 and 4 to Drive Synucleinopathy in Neurodegeneration. *Front Pharmacol*. 2022;13:845930.
256. Maatouk L, Compagnion AC, Sauvage MAC de, Bemelmans AP, Leclere-Turbant S, Cirotteau V, et al. TLR9 activation via microglial glucocorticoid receptors contributes to degeneration of midbrain dopamine neurons. *Nat Commun*. 2018 Jun 22;9(1):2450.

257. Ros-Bernal F, Hunot S, Herrero MT, Parnadeau S, Corvol JC, Lu L, et al. Microglial glucocorticoid receptors play a pivotal role in regulating dopaminergic neurodegeneration in parkinsonism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Apr 19;108(16):6632–7.
258. McCabe K, Concannon RM, McKernan DP, Dowd E. Time-course of striatal Toll-like receptor expression in neurotoxic, environmental and inflammatory rat models of Parkinson's disease. *J Neuroimmunol.* 2017 Sep 15;310:103–6.
259. Anania JC, Chenoweth AM, Wines BD, Hogarth PM. The Human Fc $\gamma$ RII (CD32) Family of Leukocyte FcR in Health and Disease. *Front Immunol.* 2019;10:464.
260. Tridandapani S, Anderson CL. Regulation of Phagocytosis by Fc $\gamma$ RIIb and Phosphatases. In: Rosales C, editor. *Molecular Mechanisms of Phagocytosis.* Boston, MA: Springer US; 2005.
261. Nimmerjahn F, Ravetch JV. Fc $\gamma$  receptors as regulators of immune responses. *Nat Rev Immunol.* 2008 Jan;8(1):34–47.
262. Choi YR, Cha SH, Kang SJ, Kim JB, Jou I, Park SM. Prion-like Propagation of  $\alpha$ -Synuclein Is Regulated by the Fc $\gamma$ RIIB-SHP-1/2 Signaling Pathway in Neurons. *Cell Rep.* 2018 Jan 2;22(1):136–48.
263. Choi YR, Kang SJ, Kim JM, Lee SJ, Jou I, Joe EH, et al. Fc $\gamma$ RIIB mediates the inhibitory effect of aggregated  $\alpha$ -synuclein on microglial phagocytosis. *Neurobiol Dis.* 2015 Nov 1;83:90–9.
264. Langston JW, Ballard P, Tetrud JW, Irwin I. Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science.* 1983 Feb 25;219(4587):979–80.
265. Langston JW. The MPTP Story. *J Park Dis.* 2017;7(s1):S11–9.
266. Borsche M, Pereira SL, Klein C, Grünewald A. Mitochondria and Parkinson's Disease: Clinical, Molecular, and Translational Aspects. *J Park Dis.* 2021 Feb 2;11(1):45–60.
267. Schapira AH, Cooper JM, Dexter D, Clark JB, Jenner P, Marsden CD. Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *J Neurochem.* 1990 Mar;54(3):823–7.
268. Blesa J, Trigo-Damas I, Quiroga-Varela A, Jackson-Lewis VR. Oxidative stress and Parkinson's disease. *Front Neuroanat.* 2015;9:91.
269. Chavarría C, Rodríguez-Botero 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 Oct 11;475(19):3153–69.
270. Shavali S, Brown-Borg HM, Ebadi M, Porter J. Mitochondrial localization of alpha-synuclein protein in alpha-synuclein overexpressing cells. *Neurosci Lett.* 2008 Jul 11;439(2):125–8.
271. Devi L, Raghavendran V, Prabhu BM, Avadhani NG, Anandatheerthavarada HK. Mitochondrial import and accumulation of alpha-synuclein impair complex I in human

- dopaminergic neuronal cultures and Parkinson disease brain. *J Biol Chem.* 2008 Apr 4;283(14):9089–100.
272. Cole NB, Dieulie D, Leo P, Mitchell DC, Nussbaum RL. Mitochondrial translocation of alpha-synuclein is promoted by intracellular acidification. *Exp Cell Res.* 2008 Jun 10;314(10):2076–89.
273. Li WW, Yang R, Guo JC, Ren HM, Zha XL, Cheng JS, et al. Localization of alpha-synuclein to mitochondria within midbrain of mice. *Neuroreport.* 2007 Oct 8;18(15):1543–6.
274. Serdiuk T, Fleischmann Y, Ghosh D, Delparente A, Reber V, Frey L, et al. Alpha-synuclein interacts with regulators of ATP homeostasis in mitochondria. *Nat Commun.* 2025 Aug 16;16(1):7651.
275. Kasten M, Hartmann C, Hampf J, Schaake S, Westenberger A, Vollstedt EJ, et al. Genotype-Phenotype Relations for the Parkinson’s Disease Genes Parkin, PINK1, DJ1: MDSGene Systematic Review. *Mov Disord Off J Mov Disord Soc.* 2018 May;33(5):730–41.
276. Kazlauskaitė A, Kondapalli C, Gourlay R, Campbell DG, Ritorto MS, Hofmann K, et al. Parkin is activated by PINK1-dependent phosphorylation of ubiquitin at Ser65. *Biochem J.* 2014 May 15;460(1):127–39.
277. Vives-Bauza C, Zhou C, Huang Y, Cui M, de Vries RLA, Kim J, et al. PINK1-dependent recruitment of Parkin to mitochondria in mitophagy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 Jan 5;107(1):378–83.
278. Narendra D, Tanaka A, Suen DF, Youle RJ. Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *J Cell Biol.* 2008 Dec 1;183(5):795–803.
279. Dawson TM, Dawson VL. Molecular pathways of neurodegeneration in Parkinson’s disease. *Science.* 2003 Oct 31;302(5646):819–22.
280. Lin KJ, Lin KL, Chen SD, Liou CW, Chuang YC, Lin HY, et al. The Overcrowded Crossroads: Mitochondria, Alpha-Synuclein, and the Endo-Lysosomal System Interaction in Parkinson’s Disease. *Int J Mol Sci.* 2019 Oct 25;20(21):5312.
281. Sidransky E, Lopez G. The link between the GBA gene and parkinsonism. *Lancet Neurol.* 2012 Nov;11(11):986–98.
282. Asselta R, Rimoldi V, Siri C, Cilia R, Guella I, Tesei S, et al. Glucocerebrosidase mutations in primary parkinsonism. *Parkinsonism Relat Disord.* 2014 Nov;20(11):1215–20.
283. Moors T, Paciotti S, Chiasserini D, Calabresi P, Parnetti L, Beccari T, et al. Lysosomal Dysfunction and α-Synuclein Aggregation in Parkinson’s Disease: Diagnostic Links. *Mov Disord Off J Mov Disord Soc.* 2016 Jun;31(6):791–801.
284. Lesage S, Condroyer C, Hecham N, Anheim M, Belarbi S, Lohman E, et al. Mutations in the glucocerebrosidase gene confer a risk for Parkinson disease in North Africa. *Neurology.* 2011 Jan 18;76(3):301–3.

285. Paillusson S, Gomez-Suaga P, Stoica R, Little D, Gissen P, Devine MJ, et al.  $\alpha$ -Synuclein binds to the ER-mitochondria tethering protein VAPB to disrupt Ca<sup>2+</sup> homeostasis and mitochondrial ATP production. *Acta Neuropathol (Berl)*. 2017 Jul;134(1):129–49.
286. Przedborski S, Chen Q, Vila M, Giasson BI, Djaldatti R, Vukosavic S, et al. Oxidative post-translational modifications of alpha-synuclein in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) mouse model of Parkinson's disease. *J Neurochem*. 2001 Jan;76(2):637–40.
287. Binolfi A, Lamberto GR, Duran R, Quintanar L, Bertoncini CW, Souza JM, et al. Site-specific interactions of Cu(II) with alpha and beta-synuclein: bridging the molecular gap between metal binding and aggregation. *J Am Chem Soc*. 2008 Sep 3;130(35):11801–12.
288. Chavarría C, Ivagnes R, Zeida A, Piñeyro MD, Souza JM. Revisiting the role of 3-nitrotyrosine residues in the formation of alpha-synuclein oligomers and fibrils. *Arch Biochem Biophys*. 2024 Feb 1;752:109858.
289. Burai R, Ait-Bouziad N, Chiki A, Lashuel HA. Elucidating the Role of Site-Specific Nitration of  $\alpha$ -Synuclein in the Pathogenesis of Parkinson's Disease via Protein Semisynthesis and Mutagenesis. *J Am Chem Soc*. 2015 Apr 22;137(15):5041–52.
290. Fujita K, Homma H, Jin M, Yoshioka Y, Jin X, Saito Y, et al. Mutant  $\alpha$ -synuclein propagates via the lymphatic system of the brain in the monomeric state. *Cell Rep*. 2023 Aug;42(8):112962.
291. Chen K, Martens YA, Meneses A, Ryu DH, Lu W, Raulin AC, et al. LRP1 is a neuronal receptor for  $\alpha$ -synuclein uptake and spread. *Mol Neurodegener*. 2022 Sep 2;17:57.
292. Pan SH, Malcolm BA. Reduced background expression and improved plasmid stability with pET vectors in BL21 (DE3). *BioTechniques*. 2000 Dec;29(6):1234–8.
293. Tcherkasskaya O, Ptitsyn OB. Direct energy transfer to study the 3D structure of non-native proteins: AGH complex in molten globule state of apomyoglobin. *Protein Eng*. 1999 Jun;12(6):485–90.
294. De Filippis V, Frasson R, Fontana A. 3-Nitrotyrosine as a spectroscopic probe for investigating protein-protein interactions. *Protein Sci Publ Protein Soc*. 2006 May;15(5):976–86.
295. Sahin C, Österlund EC, Österlund N, Costeira-Paulo J, Pedersen JN, Christiansen G, et al. Structural Basis for Dityrosine-Mediated Inhibition of  $\alpha$ -Synuclein Fibrillization. *J Am Chem Soc*. 2022 Jul 13;144(27):11949–54.
296. Kyriukha YA, Afitska K, Kurochka AS, Sachan S, Galkin M, Yushchenko DA, et al.  $\alpha$ -Synuclein Dimers as Potent Inhibitors of Fibrillization. *J Med Chem*. 2019 Nov 27;62(22):10342–51.
297. Tiwari MK, Leinisch F, Sahin C, Møller IM, Otzen DE, Davies MJ, et al. Early events in copper-ion catalyzed oxidation of  $\alpha$ -synuclein. *Free Radic Biol Med*. 2018 Jun;121:38–50.

298. Norris EH, Giasson BI, Ischiropoulos H, Lee VMY. Effects of Oxidative and Nitritative Challenges on  $\alpha$ -Synuclein Fibrillogenesis Involve Distinct Mechanisms of Protein Modifications\*. *J Biol Chem.* 2003 Jul 18;278(29):27230–40.
299. Lee E, Lee S, Lee D, Kim J, Paik SR. Lipid interaction of  $\alpha$ -synuclein during the metal-catalyzed oxidation in the presence of  $Cu^{2+}$  and  $H_2O_2$ . *J Neurochem.* 2003 Mar;84(5):1128–42.
300. The involvement of dityrosine crosslinking in  $\alpha$ -synuclein assembly and deposition in Lewy Bodies in Parkinson's disease. *Scientific Reports.*
301. Michon T, Chenu M, Kellershon N, Desmadril M, Guéguen J. Horseradish Peroxidase Oxidation of Tyrosine-Containing Peptides and Their Subsequent Polymerization: A Kinetic Study. *Biochemistry.* 1997 Jul 1;36(28):8504–13.
302. Campolo N, Mastrogiovanni M, Mariotti M, Issoglio FM, Estrin D, Hägglund P, et al. Multiple oxidative post-translational modifications of human glutamine synthetase mediate peroxynitrite-dependent enzyme inactivation and aggregation. *J Biol Chem.* 2023 Jan 23;299(3):102941.
303. Pennathur S, Jackson-Lewis V, Przedborski S, Heinecke JW. Mass spectrometric quantification of 3-nitrotyrosine, ortho-tyrosine, and o,o'-dityrosine in brain tissue of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated mice, a model of oxidative stress in Parkinson's disease. *J Biol Chem.* 1999 Dec 3;274(49):34621–8.
304. Pajares M, I. Rojo A, Manda G, Boscá L, Cuadrado A. Inflammation in Parkinson's Disease: Mechanisms and Therapeutic Implications. *Cells.* 2020 Jul 14;9(7):1687.
305. Hoffmann A, Ette B, Bruno A, Kulinich A, Hoffmann AC, von Wittgenstein J, et al. Alpha-synuclein activates BV2 microglia dependent on its aggregation state. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016 Oct 28;479(4):881–6.
306. Bussi C, Ramos JMP, Arroyo DS, Gaviglio EA, Gallea JI, Wang JM, et al. Autophagy down regulates pro-inflammatory mediators in BV2 microglial cells and rescues both LPS and alpha-synuclein induced neuronal cell death. *Sci Rep.* 2017 Mar 3;7:43153.
307. Park JY, Kim KS, Lee SB, Ryu JS, Chung KC, Choo YK, et al. On the mechanism of internalization of alpha-synuclein into microglia: roles of ganglioside GM1 and lipid raft. *J Neurochem.* 2009 Jul;110(1):400–11.
308. Boza-Serrano A, Reyes JF, Rey NL, Leffler H, Bousset L, Nilsson U, et al. The role of Galectin-3 in  $\alpha$ -synuclein-induced microglial activation. *Acta Neuropathol Commun.* 2014 Nov 12;2:156.
309. Shearer LJ, Petersen NO, Woodside MT. Internalization of  $\alpha$ -synuclein oligomers into SH-SY5Y cells. *Biophys J.* 2021 Mar 2;120(5):877–85.
310. Lundqvist H, Follin P, Khalfan L, Dahlgren C. Phorbol myristate acetate-induced NADPH oxidase activity in human neutrophils: only half the story has been told. *J Leukoc Biol.* 1996 Feb;59(2):270–9.

311. Karlsson A, Nixon JB, McPhail LC. Phorbol myristate acetate induces neutrophil NADPH-oxidase activity by two separate signal transduction pathways: dependent or independent of phosphatidylinositol 3-kinase. *J Leukoc Biol.* 2000 Mar;67(3):396–404.
312. Hansen C, Angot E, Bergström AL, Steiner JA, Pieri L, Paul G, et al.  $\alpha$ -Synuclein propagates from mouse brain to grafted dopaminergic neurons and seeds aggregation in cultured human cells. *J Clin Invest.* 2011 Feb 1;121(2):715–25.
313. Freundt EC, Maynard N, Clancy EK, Roy S, Bousset L, Sourigues Y, et al. Neuron-to-neuron transmission of  $\alpha$ -synuclein fibrils through axonal transport. *Ann Neurol.* 2012 Oct;72(4):517–24.
314. Robinson EC, Gorecki AM, Pesce SR, Bagda V, Anderton RS, Meloni BP. Novel Poly-Arginine Peptide R18D Reduces  $\alpha$ -Synuclein Aggregation and Uptake of  $\alpha$ -Synuclein Seeds in Cortical Neurons. *Biomedicines.* 2025 Jan 7;13(1):122.
315. Chen J, Mao K, Yu H, Wen Y, She H, Zhang H, et al. p38-TFEB pathways promote microglia activation through inhibiting CMA-mediated NLRP3 degradation in Parkinson's disease. *J Neuroinflammation.* 2021 Dec 20;18(1):295.