

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**EVALUACIÓN DE LA INTERACCIÓN DEL SEGMENTO N-TERMINAL DE
LA PROTEÍNA NEURONAL ALFA-SINUCLÉINA CON MODELOS DE
MEMBRANA MITOCONDRIAL**

POR

EXIQUIO MALDONADO VIDAURRI

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA**

NOVIEMBRE, 2019

**EVALUACIÓN DE LA INTERACCIÓN DEL SEGMENTO N-TERMINAL DE
LA PROTEÍNA NEURONAL ALFA-SINUCLEÍNA CON MODELOS DE
MEMBRANA MITOCONDRIAL**

Comité de tesis

Dra. Azucena del Carmen González Horta

Presidente

Dr. Hugo Alberto Luna Olvera

Secretario

Dr. Abelardo Chávez Montes

Vocal 1

Dr. Ezequiel Viveros García

Vocal 2

Dra. Dvorak Montiel Condado

Vocal 3

**EVALUACIÓN DE LA INTERACCIÓN DEL SEGMENTO N-TERMINAL DE
LA PROTEÍNA NEURONAL ALFA-SINUCLEÍNA CON MODELOS DE
MEMBRANA MITOCONDRIAL**

Dirección de tesis

Dra. Azucena del Carmen González Horta

Director

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la UANL por su apoyo para la realización del proyecto, por tener laboratorios disponibles para la realización del proyecto de investigación doctoral.

De la misma forma, a la FCB de la UANL por el apoyo dado a la investigación y a la educación de posgrado.

Gracias al comité doctoral por lo que hicieron por mí y por el apoyo prestado durante la realización del proyecto de investigación. Por el tiempo que le dedicaron y los fondos dedicados a la compra de reactivos. A los tutores del proceso por la facilitación del trabajo.

Finalmente, al CONACYT y al estado mexicano por los fondos aportados, que son la principal fuente de recursos para la investigación en este país.

DEDICATORIAS

Una vez se termina cualquier proceso, cualquier viaje, es correcto agradecer a aquellos que nos apoyaron, que nos acompañaron en el viaje, sea todo o una parte.

En primer lugar y como católico creyente, a Dios, por permitirme empezar este camino, continuarlo y darme la fuerza para concluirlo. No fue fácil, hubo momentos complejos y la confianza en Él, siempre da el aliento para seguir. Con Dios todo, sin Él, nada.

En segundo lugar, mi familia, no pudiendo ser de otra manera, mis padres Silvia y Exiquio, así como mis hermanos Ángel y Domenica. En ellos encontré apoyo y respaldo, pasase lo que pasase, se mostraron a mi lado y receptivos con lo que pensaba en cada momento del camino. Siempre apoyaron y escucharon, no siempre era capaz de expresarme de forma coherente, pero ellos siempre escucharon, sin desesperar. No puedo dejar de lado a mi abuela Gloria, apoyo familiar mediato, siempre dando palabras de apoyo y, como todos los abuelos, consintiéndome en la medida de lo posible y de lo apropiado. Gracias a todos ellos por estar aquí y por escucharme. A mi prima Lupita y su esposo Manuel, por recibirme cuando llegué a esta ciudad a estudiar, hace ya nueve años, por abrirme las puertas de su hogar y enseñarme cómo es la vida aquí; para ustedes solo tengo agradecimiento. A mis tíos Héctor y Juan Edmundo, por la ayuda que me han brindado, son un ejemplo de vida, de dedicación y esfuerzo. Gracias por mostrarme lo lejos que se puede llegar con pasión por lo que se hace.

A los señores Mario y Manolo Molina, por su apoyo en estos años que he estado fuera del hogar, por lo que han hecho por mí. No tengo palabras que puedan describir apropiadamente el agradecimiento que tengo con ustedes, simpleza es camino: GRACIAS, espero esa palabra alcance a describirlo.

Al alcalde de ciudad Anáhuac, Desiderio Urteaga, por el apoyo prestado, por no olvidar su compromiso con la educación.

A mis amigos Edwin y Juan Carlos, por estar aquí conmigo, a pesar de tantos años y de tantas vivencias. Porque las diferencias que hemos tenido siempre han sido superadas y la amistad que nos une, perdura y se mantiene. Gracias a ustedes he encontrado formas de superar retos y consejos para mantenerme estable. Ha sido un placer, espero así siga.

A los compañeros del laboratorio, particularmente Lupita y Arely, por su orientación y apoyo en los momentos más complejos en estos cuatro años. Los días de laboratorio no habrían sido lo mismo sin ustedes.

A Arely, que en el camino de estos años, la relación que teníamos se convirtió en noviazgo y encontré en ti un apoyo y una serenidad sin límites. Te convertiste en mi apoyo, en alguien que me ama y a quien amo, en quien encontré la fuerza necesaria para poder cumplir con las metas. Gracias por todo hasta ahora.

A mi asesora, por aceptarme en su laboratorio, por la paciencia en estos cuatro años.

Al doctor Abelardo, por su escucha y por su disposición a ayudar siempre que estaba en su mano. Le agradezco haberme abierto las puertas de su laboratorio hace ya siete años, ese primer contacto con la ciencia, se convirtió en el impulso que me ha llevado hasta donde estoy. Gracias doctor.

A mi comité de tesis, por lo que han hecho. El camino de la ciencia no es algo que se recorra solo, siempre se trabaja en equipo y me mostraron que así se hace.

A todos los que me han apoyado de alguna manera o de otra, sin ustedes, nada de esto habría sido posible.

ÍNDICE

Introducción	1
1. Antecedentes	2
1.1.1 Generalidades	2
1.1.2 Causas	4
1.1.2.1 Causas genéticas	5
1.1.2.2 Causas ambientales	6
1.2. Papel de la alfa-sinucleína en la enfermedad de Parkinson	7
1.2.1 Estructura de la alfa-sinucleína	7
1.2.2 Función de la proteína nativa	9
1.2.3 Oligómeros de alfa-sinucleína	12
1.3. Interacción de la alfa-sinucleína con membranas mitocondriales	14
1.3.1 Composición de las membranas mitocondriales: importancia de la cardiolipina	14
1.3.2 Alfa-sinucleína y disfunción mitocondrial	16
1.3.3 Ensayos con modelos de membrana	20
2. Justificación	24
3. Hipótesis	24
4. Objetivos	25
4.1 Objetivo General	25
4.2 Objetivos particulares	25
5. Metodología científica	26
5.1 Materiales y Reactivos	26
5.2 Preparación de liposomas	26
5.3 Caracterización de estructura secundaria por dicroísmo circular	27
5.4 Fluorescencia intrínseca de los péptidos	27
5.5 Apagamiento de triptófano por fosfatidilcolinas bromadas	27
5.6 Adsorción interfacial de los péptidos	28
5.7 Inserción de péptidos en monocapas preformadas	29
6. Resultados	30

7. Discusión	41
8. Conclusión	43
9. Bibliografía	44
10. Resumen Biográfico	55
11. Anexos	56

Índice de figuras

Figura 1. Causas de la enfermedad de Parkinson	6
Figura 2. Características estructurales de la alfa-sinucleína	8
Figura 3. Función propuesta de la alfa-sinucleína en la sinapsis	11
Figura 4. Formación de fibrillas amiloides y papel de los oligómeros tóxicos en la formación de las mismas y la formación de los cuerpos de Lewy en la sustancia negra.	14
Figura 5. Efectos propuestos de la alfa-sinucleína sobre las mitocondrias	19
Figura 6. Estructura secundaria de los péptidos sintéticos derivados de la secuencia de la alfa-sinucleína	31
Figura 7. Espectros de emisión de fluorescencia de los péptidos sintéticos derivados de la alfa-sinucleína al interactuar con liposomas	32
Figura 8. Variación de la longitud de onda de máxima emisión de los péptidos derivados de la alfa-sinucleína	33
Figura 9. Apagamiento de la fluorescencia de P1 y P3 por lípidos bromados	35
Figura 10. Isotermas de presión de monocapas de los péptidos derivados de la alfa-sinucleína	37
Figura 11. Isotherma de presión del péptido correspondiente al segmento N-terminal de la alfa-sinucleína.	38
Figura 12. Inserción de los péptidos derivados de la alfa-sinucleína en monocapas de composición similar a la membrana mitocondrial interna	39
Figura 13. Determinación de la presión crítica de inserción de los péptidos derivados de la alfa-sinucleína en monocapas	40

ABREVIATURAS

LUV-	Vesículas unilamelares grandes
DOPC-	1,2-dioleil-sn-3-glicero-fosfocolina
DOPE-	1,2-dioleil-sn-3-glicero-fosfoetanolamina
CL-	Cardiolipina
EP-	Enfermedad de Parkinson
α -syn-	Alfa sinucleína
NAC-	Componente no amiloide
SUV-	Vesículas unilamelares pequeñas
LUV-	Vesículas unilamelares grandes
MMI-	Membrana mitocondrial interna
UA-	Unidades arbitrarias

RESUMEN

La alfa-sinucleína es una proteína intrínsecamente desordenada que ha sido asociada con el desarrollo de la enfermedad de Parkinson, a través de su asociación y deposición como fibrillas amiloides que forman cuerpos de Lewy, el factor histológico principal para la identificación de la enfermedad de Parkinson. Varias líneas de investigación han sugerido que la asociación de la proteína alfa-sinucleína con membranas mitocondriales puede causar daño en la membrana mitocondrial y desempeña papel importante en la progresión de la enfermedad. A pesar de que hay fuerte evidencia de que el segmento amino terminal de la alfa-sinucleína es esencial por la afinidad de membrana, la formación cooperativa de dominios helicoidales y regulación de la permeabilidad mitocondrial, los residuos de amino ácidos involucrados en la unión a membranas aún no se han identificado del todo y hay controversia en ese sentido. La espectroscopía de fluorescencia, el dicroísmo circular y la técnica de monocapa de Langmuir fueron empleadas para elucidar el proceso de reconocimiento entre la membrana mitocondrial y péptidos sintéticos derivados de la estructura del segmento amino terminal de la alfa-sinucleína. Los resultados obtenidos en este trabajo mostraron que los primeros 15 residuos de aminoácidos del segmento amino terminal de la proteína desempeñan un rol principal en el anclaje y la perturbación de la parte hidrofóbica de la membrana, mientras que los residuos 16-30 interactúan solamente con la región polar de los fosfolípidos, esto es, con los grupos polares de la cabeza de cada fosfolípido. Con esto, se confirma que la afinidad de unión del segmento amino terminal no es uniforme en toda su estructura.

ABSTRACT

Alpha-synuclein (α -syn) is an intrinsically-disordered protein that has been associated with Parkinson's disease through its deposition in an amyloid fibril form within Lewy Body. Several lines of evidence suggest that the physical association of α -syn with the mitochondrial membranes may cause membrane damage and mitochondrial dysfunction, playing an important role in disease progression. Although there is strong evidence that the N-terminus part of α -syn is essential for membrane affinity, cooperative formation of helical domains and regulation of mitochondria membrane permeability, the amino acids involved in this membrane binding is still controversial.

Fluorescence spectroscopy, circular dichroism and Langmuir monolayer technique were used to elucidate this recognition process of mitochondrial membrane system by synthetic peptides derived from α -syn N-terminal segment. The results obtained in this work show that the first 15 amino acid of the α -syn N-terminal segment mainly participate in the anchoring, perturbing the membrane hydrophobic region, while the peptide corresponding to 16–30 residues interacts only with the phospholipid polar head group, confirming that the binding affinity of the N-terminus is non uniform.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Parkinson (EP) es una enfermedad que deteriora el sistema nervioso central y se manifiesta principalmente por alteraciones en los movimientos y el control motor. La incidencia de la EP es del 1 al 2% entre las edades de 60 a 69 años y de un 5% en la población mayor a 85 años (Agrawal y Biswas, 2015). A nivel fisiológico, la causa de la enfermedad es la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la *substancia nigra pars compacta*. El origen de la muerte de las células dopaminérgicas se desconoce, sin embargo, estudios bioquímicos, histológicos y genéticos han implicado a una proteína neural, la alfa-sinucleína, en la patogénesis de esta enfermedad ya que es el componente principal de los agregados intracelulares proteicos conocidos como cuerpos de Lewy característicos en los pacientes con Parkinson (Moore et al. 2005). Descubrimientos genéticos relacionan el padecimiento temprano de esta enfermedad con la triplicación del gen que codifica para la alfa-sinucleína y a mutaciones puntuales del mismo gen (A30P, E46K, A53T) (Conway et al. 2000). Ya sea de origen esporádico o genético, la enfermedad de Parkinson no solo se asocia a la presencia de alfa-sinucleína, también a su estado conformacional. Mientras que la proteína soluble se caracteriza por tener una estructura aleatoria *in vitro*, en los cuerpos de Lewy se encuentran las fibras amiloides que corresponden a la forma agregada de la proteína, lo que sugiere que el desarrollo de la enfermedad está asociada con la formación de especies mal plegadas de alfa-sinucleína que disparan la formación de fibras amiloides y originan, depósitos fibrilares que interfieren con el funcionamiento de estructuras membranosas y procesos celulares (Stockl et al, 2011). Los mecanismos implicados aún se desconocen pero, se plantean dos hipótesis para la permeabilización: o bien a través de un mecanismo parecido al poro que causan las toxinas bacterianas o mediante la desestabilización de la bicapa lipídica (Van Roijen et al, 2009). Reportes recientes muestran además que la alfa-sinucleína humana se localiza en las mitocondrias de la *substancia nigra* evaluada postmortem de pacientes con Parkinson. Esta interacción con la membrana mitocondrial es de gran interés porque ofrece una nueva hipótesis del inicio de la enfermedad de Parkinson, donde no se necesitarían las fibrillas ni los cuerpos de Lewy, sino los monómeros de la alfa-sinucleína que al interactuar con la mitocondria provocarían un mal funcionamiento y posteriormente el daño neuronal (Lorenzen et al. 2014).

1. ANTECEDENTES

1.1 Enfermedad de Parkinson

1.1.1- Generalidades

La enfermedad de Parkinson es una enfermedad degenerativa del sistema nervioso central, caracterizada por la pérdida de control de los movimientos corporales. La enfermedad tiene una edad media de inicio de 55 años, con una supervivencia media de 10 a 13 años. El Parkinson tiene como característica histológica la pérdida neuronal en un área del cerebro denominada sustancia negra. Esta pérdida neuronal ocasiona la disminución en la disponibilidad cerebral del neurotransmisor dopamina, encargada de modular los movimientos voluntarios del cuerpo, lo que provoca una desregulación de los movimientos del paciente, con aparición de los síntomas típicos: temblor y bradicinesia. Estos síntomas se denominan motores, pues afectan los movimientos corporales. También se desarrollan síntomas no motores, relacionadas con el desequilibrio de los neurotransmisores.

Químicamente la dopamina es una catecolamina sintetizada a partir de la hidroxilación del aminoácido tirosina, teniendo funciones variadas a nivel neuronal, que implican el control de movimientos voluntarios o la respuesta afectiva. (Hurtado, Cardenas, Cardenas, & León, 2016)

La dopamina, como se mencionó, es un neurotransmisor que se produce en la zona del cerebro conocida como sustancia negra, situada en el mesencéfalo, comprende dos porciones, una de ellas es la sustancia negra reticulada, que contiene en su mayoría neuronas GABA (ácido gamma aminobutírico), inhibitorias. Su segunda porción se denomina sustancia negra compacta, compuesta por neuronas dopaminérgicas que envían el neurotransmisor dopamina hacia el cuerpo estriado, zona del cerebro que controla los movimientos voluntarios del cuerpo. En esta porción del cerebro se da la causa de la Enfermedad de Parkinson.

Por tanto, los síntomas más evidentes e incapacitantes de la enfermedad, son los motores, empleados, además, para medir la progresión de la enfermedad, incluyen: temblor de reposo, bradicinesia o movimientos lentos, rigidez postural y una alteración

de los reflejos posturales o dificultad para cambiar de postura rápidamente. Además de estos síntomas los pacientes con pueden presentar: sialorrea o salivación excesiva, disartria o problemas de pronunciación, sudoración excesiva, molestias visuales, molestias genitourinarias, alteraciones del sueño como insomnio, seborrea, edema, constipación, parestesias y disminución del olfato. Las alteraciones gastrointestinales consisten en constipación por enlentecimiento del peristaltismo, disfagia y reflujo(Chávez-León, Ontiveros-Urbe, & Carrillo-Ruiz, 2013).

Diagnóstico

El diagnóstico de la enfermedad de Parkinson se basa principalmente en los síntomas motores, aunque también en una buena respuesta al tratamiento con levodopa, además de descartar algún evento específico que provoque síntomas similares, denominados parkinsonismos.

También se puede recurrir al diagnóstico por imágenes, como TAC (tomografía axial computarizada), pero por las dificultades para encontrar los daños específicos y para dar certeza, así como por el alto costo, se prefiere el diagnóstico por síntomas.

En cuanto a la progresión de la enfermedad, según la Secretaría de Salud, se utilizala clasificación de Hoehn-Yahr, que se basa en el avance de la enfermedad, medido por la progresiva incapacidad física del paciente, desde los problemas de equilibrio leves hasta los problemas más graves(Hoehn, Yahr, 1967).

Tratamiento

El tratamiento se basa en la progresión de los síntomas, entonces en pacientes iniciales, particularmente si son menores de 65 años, y con poca discapacidad (estadios I y II de Hoehn y Yahr), se puede iniciar un periodo de tratamiento en monoterapia con agonistas dopaminérgicos, aquellos que estimulan los receptores de la dopamina. En pacientes iniciales mayores de 65 años y en todos aquellos que por una u otra razón, se desee conseguir la mejoría sintomática en un tiempo breve y/o que esta mejoría sea rápida, podrá comenzarse el tratamiento con levodopa.

La levodopa o L-dopa, es un precursor natural de la dopamina, que se transforma en dopamina en el sistema nervioso central por medio del enzima dopadescarboxilasa. La

levodopa es el fármaco antiparkinsoniano por vía oral más potente. La asociación de la levodopa a un inhibidor de la dopadescarboxilasa periférica (carbidopa o benserazida) aumenta la biodisponibilidad de dopamina cerebral y mejora sustancialmente la tolerancia de los pacientes al tratamiento con la levodopa.

Existen así mismo alternativas quirúrgicas, donde se somete al paciente a una estimulación cerebral profunda, el cerebro se ve sometido a cargas de 2-3 volts de potencia con una frecuencia de al menos, 100 Hz (Blumenfeld & Brontë-Stewart, 2015), normalmente estos tratamientos se recomiendan para pacientes mayores de 60 años y que han dejado de responder positivamente al tratamiento farmacológico. Se han probado terapias alternas, donde la ablación de ciertas áreas del cerebro, sobre todo las relacionadas a la motilidad, como el globo pálido, parece tener un efecto positivo en los pacientes. Estos tratamientos muestran una eficacia de larga duración, mostrando una mejoría de los síntomas tras 5-10 años después de la intervención.

A finales del siglo pasado se intentó emplear terapia celular de reemplazo, mediante el empleo de células madre en el área dañada del cerebro, pero no se encontraron grandes avances (Sawle et al., 1992), además, los impedimentos éticos descartaron la línea de investigación. Es hasta este siglo, con el potencial de las células madre, donde se reinició el campo de estudio de estas células, con menores riesgos y menos dilemas éticos (O'Keeffe et al., 2008). La investigación actual en este tipo de células hace pensar que en un futuro, podrían servir de base a una cura definitiva de la enfermedad.

1.1.2-Causas

En la enfermedad de Parkinson se produce una desaparición progresiva de las neuronas dopaminérgicas del sistema nigroestriado, con despigmentación y consecuente gliosis, mientras que en las neuronas supervivientes se observan acúmulos proteicos denominados cuerpos de Lewy (CL). Los cuerpos de Lewy se observan en las neuronas supervivientes en el cerebro de los individuos que murieron padeciendo la enfermedad. Estos cuerpos de Lewy se componen, principalmente, de la proteína alfa-sinucleína, además de otras proteínas, como ubiquitina, subunidades de la proteína NF (involucrada en la memoria) que juegan un rol importante en el desarrollo de los cuerpos de Lewy (Spillantini, et al. 1998; Trojanowski & Lee, 1998). Esta atención se vio reforzada,

cuando se descubrió que anomalías en los genes que producen la alfa-sinucleína, se ven relacionadas con las variantes familiares de la EP. Se han postulado diversas explicaciones para la muerte de las neuronas productoras de dopamina y el consecuente desarrollo de la enfermedad de Parkinson, estas causas implican desde factores genéticos hasta ambientales (Drolet, et al. 2009; Kumudini et al., 2014; Singleton, et al. 2013; Zarranz et al., 2004).

1.1.2.1-Causas genéticas

La sobreproducción de alfa-sinucleína causada por la presencia de muchas copias de su gen productor (Singleton et al. 2013), así como la alteración estructural de la misma (Kruger et al. 1998; Zarranz et al. 2004), se han postulado como causas para la enfermedad de Parkinson. En últimas fechas, el estudio de la alfa-sinucleína, de su función y de sus anomalías, han primado en la investigación sobre la enfermedad de Parkinson. El sistema nigroestriado tiene como función el mantenimiento de la postura del cuerpo y de las extremidades, la producción de movimientos espontáneos (como parpadeo) y automáticos que acompañan a un acto motor voluntario (como el balanceo de brazos al andar) (Lotharius & Brundin, 2002).

Se sabe de genes cuya presencia y expresión llevan a la aparición de la enfermedad, existiendo familias donde estos genes son más comunes y un alto porcentaje de sus miembros padecen la enfermedad.

Entre estos genes están DRD2, ND3, BDNF, SNCA, UCHL1 y NURR-1, también conocidos como la familia PARK, siendo los únicos seis genes que han demostrado una correlación evidente e incuestionable con el desarrollo de la enfermedad de Parkinson (Elizondo et al. 2011).

Aún así, estos casos no representan más de un 10% de todos los casos diagnosticados, siendo el restante de origen desconocido, para ese universo de enfermos, se han postulado diferentes causas (Chávez-León et al., 2013).

1.1.2.2-Causas ambientales

Las causas ambientales se deben a la exposición a elementos cuya presencia en el organismo en una frecuencia prolongada o una cantidad elevada, generen la enfermedad de Parkinson. Entre estas causas, se encuentra la exposición a pesticidas (Drolet et al., 2009), a drogas como las anfetaminas, y a metales pesados como el plomo (Kumudini et al., 2014). Además si las neuronas dopaminérgicas se ven expuestas a presiones oxidativas altas, pues parece que su requerimiento energético es superior por la misma morfología que presentan (Pacelli et al., 2015). Además, el metabolismo normal de la dopamina produce un alto riesgo de estrés oxidativo. En circunstancias normales, la dopamina se guarda en vesículas que impiden el estrés oxidativo en las neuronas; pero en condiciones patológicas, posiblemente por fallos en los sistemas de vesículas o en los sistemas antioxidantes, el estrés aumenta y las neuronas al ser sometidas a esa presión oxidativa elevada terminan muriendo. Estas causas, además de las genéticas, se resumen en la figura 1.

La alfa-sinucleína es una proteína presente normalmente en el cuerpo, su identificación en los 50's en los cuerpos de Lewy en neuronas supervivientes del sistema nigroestriado, llevó a su estudio en detalle y a investigar una relación con la enfermedad de Parkinson.



Figura 1. Esquema que resume las posibles causas a las que se atribuye la muerte de las neuronas dopaminérgicas y la causa de la Enfermedad de Parkinson. Tomado de: Gómez Chavarín, et al. 2012.

Ahora bien, todos los hallazgos hasta ahora, apuntan a que la muerte de neuronas dopaminérgicas en el sistema nigroestriatal es producida por exposición continua durante años a agentes tóxicos y no sólo por la exposición a un único agente en ocasiones esporádicas. Pero también señalan como principal causante, a una disfunción en la regulación de la proteína alfa-sinucleína, la exposición prolongada a los factores antes mencionados tendrían un efecto sobre condiciones celulares que generarían que la alfa-sinucleína se saliera del equilibrio normal en el que existe(Hurtado et al. 2016).

1.2 Papel de la alfa-sinucleína en la enfermedad de Parkinson

1.2.1 Estructura de la alfa-sinucleína

La alfa-sinucleína es una proteína filogenéticamente conservada de 146 aminoácidos y 14.5kDa de masa molecular que se expresa abundantemente en el sistema nervioso central, principalmente en las terminales presináptica (Maroteaux et al. 1988). Los análisis de la estructura primaria de esta proteína muestran tres diferentes regiones(Villegas et al., 2014):

1.- Un segmento N-terminal anfipático (comprende de los residuos 1-65) que contiene dominios de secuencias repetidas (KTKEGV) muy similar al dominio α -helicoidal de unión a membrana de las apolipoproteínas(Sreeganga et al. 2003). La unión a membranas es una función clave en los roles propuestos para la alfa-sinucleína, tanto a nivel fisiológico, como patológico.

2.- Una región central hidrofóbica (residuos 66-95) también conocida como “componente no amiloide de las placas A β amiloides” (NAC por sus siglas en inglés), que ha sido identificada por numerosos grupos como la región implicada en la agregación y toxicidad de la alfa-sinucleína(Bonini & Giasson, 2005).

3.- Una región C-terminal de carácter ácido por la presencia de residuos de ácido glutámico (residuos 96-140) con 3 residuos de tirosina que se encuentran nitrificados

cuando se presentan las inclusiones lipoproteicas, de posible implicación en la interacción con otras proteínas(Bonini & Giasson, 2005).

La alfa sinucleína carece de estructura secundaria en solución y por tanto existe en una conformación aleatoria con predisposición a adoptar una configuración alfa-helicoidal al interactuar con membranas lipídicas(Sreeganga et al. 2003; Dikiy & Eliezer, 2012). Puede sufrir cambios estructurales adoptando una conformación de lámina beta cuando se expone a cambios de pH, a un incremento en la concentración de proteína o al interactuar con moléculas altamente reactivas como la dopamina. Este cambio estructural puede llevar a la formación de oligómeros tóxicos, protofibrillas y fibras amiloides que son los que se encuentran presentes en las sinucleopatías(Fink, 2006; Rochet et al., 2004). En la figura 2 se muestra la estructura primaria y secundaria de la alfa-sinucleína, así como las tres regiones de la proteína.

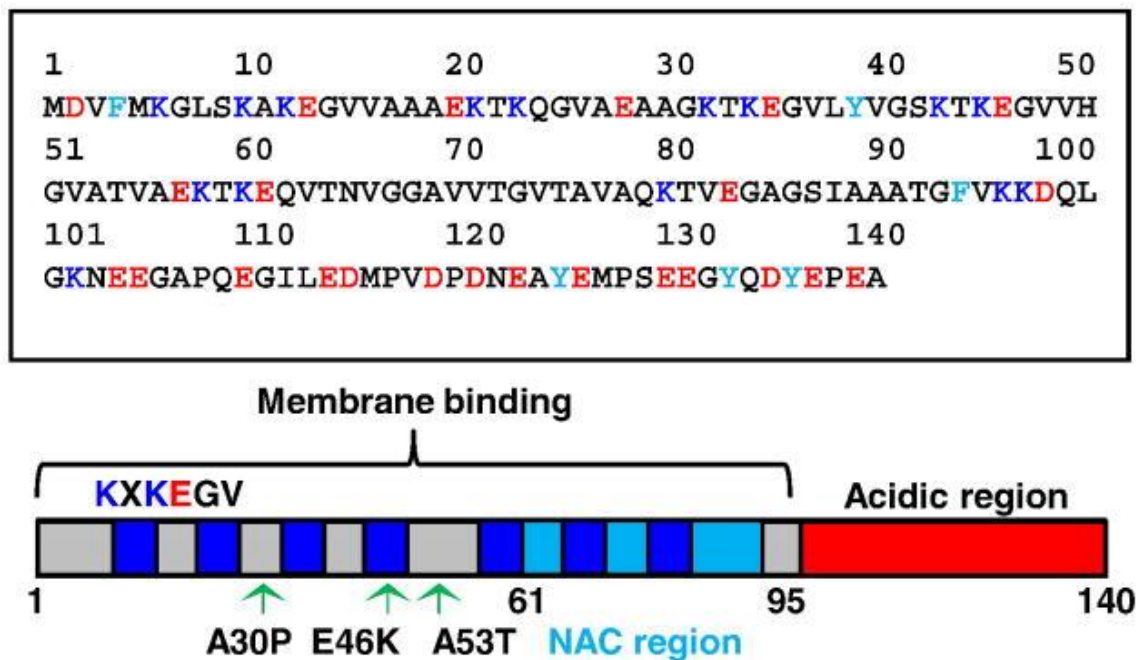


Figura 2. Características estructurales de la alfa-sinucleína. En la imagen superior se muestra la estructura primaria de la alfa-sinucleína. En celeste se muestran los aminoácidos aromáticos, en rojo los ácidos y en azul los residuos de lisina. En la imagen inferior se observan las tres regiones de la proteína. El dominio de unión a membranas se presenta en color gris, la región NAC en azul y celeste y en rojo el segmento C-termina. Tomado de Pfefferkorn, et al. 2012.

Aunque la función normal de esta proteína todavía se desconoce, es posible que esté involucrada con el metabolismo normal de lípidos, pues ciertos trabajos han puesto de manifiesto que una alteración en el contenido de alfa-sinucleína en la célula, conlleva a decrementos en los niveles de lípidos como el palmitato, el fosfatidilglicerol y la cardiolipina (Castagnet et al. 2005). Además, su alta concentración en las terminales presinápticas y su asociación con las vesículas sinápticas sugiere que está implicada en el reciclaje de dichas vesículas y en la regulación de las transmisiones sinápticas (Cheng et al. 2011). Así como en cada paso del reciclaje de vesículas sinápticas incluyendo el transporte, acoplamiento, fusión y reciclaje después de la exocitosis (Nemani et al. 2010).

El papel patológico de la alfa-sinucleína es el que más atención ha recibido, por ser tan alta su relación con la enfermedad de Parkinson. Es así que se tiene conocimiento desde hace tiempo, que su agregación en fibrillas y oligómeros, tiene efectos perjudiciales para el organismo (Volles & Lansbury, 2002), desde formación de poros y desregulación en la permeabilidad de la membrana (Tosatto et al. 2012; Tsigelny et al. 2012), hasta inhibición de la fusión de membranas, como las vesículas sinápticas, así como la promoción de la fusión de membranas (en el caso de mitocondrias).

1.2.2 Función de la proteína nativa

La proteína se encuentra principalmente en el citoplasma de las células neuronales. De forma particular, en el citoplasma de los axones, donde parece interactuar con proteínas ahí presentes, participando, en la liberación del contenido de las vesículas sinápticas al espacio sináptico (Burre et al., 2010). Esta función se lleva a cabo, porque la proteína es capaz de asociarse a membranas, de unirse a ellas, cambiando su estructura secundaria, de una desordenada, a una con predominio de alfa hélice. Esta preferencia por los lípidos, sobre todo los aniónicos, la obtiene por medio del segmento N-terminal, que al poseer varios residuos del aminoácido lisina, es capaz de generar interacciones electrostáticas con las membranas (Bartels et al. 2010).

Es así que el principal papel de la alfa-sinucleína en la liberación de dopamina, papel que se ha demostrado en investigaciones que suprimen la expresión de la proteína en

modelos animales, roedores principalmente, donde su ausencia impide la liberación de dopamina en el espacio sináptico (Zaltieri et al. 2015). A pesar de esto, los hallazgos solo permiten decir que a lo largo del tiempo, la cantidad de dopamina liberada en las sinapsis, bajaba en un 20% respecto al control (Chandra et al. 2004). Esta función se ha visto reforzada en experimentos que encontraron una relación funcional entre la alfa-sinucleína y la actina. En este caso, la alfa-sinucleína acarrearía a las vesículas sinápticas por medio de su interacción con los microfilamentos de actina (Bellani et al., 2010).

Aunque este papel propuesto es una acción conjunta con otras proteínas, se empieza a tener una idea más clara del rol de la alfa-sinucleína en las neuronas.

También es cierto que se ha encontrado una relación entre la ausencia de alfa-sinucleína y una baja disponibilidad de vesículas con dopamina para la activación de las neuronas. Esto es más evidente cuando se realizan estimulaciones repetitivas que precisan la movilización de vesículas cargadas de dopamina. Reafirmando que la alfa-sinucleína está involucrada, precisamente, en la movilización de las vesículas y, posteriormente, en la liberación del neurotransmisor dopamina (Cabin et al., 2002).

Otra función que se ha propuesto para la alfa-sinucleína, aunque relacionada a la anterior es que impide la recaptación del neurotransmisor serotonina (relacionada con la plasticidad neuronal a largo plazo) en condiciones de sobreestimulación neuronal, permitiendo que el neurotransmisor se mantenga activo más tiempo, para no impactar negativamente la función nerviosa. Esta función solo se presenta en condiciones de alta exigencia neural, no en condiciones normales de actividad celular (Busch et al., 2014), dando a entender que juega un rol en la actividad cerebral de largo plazo.

En síntesis, el rol de la alfa-sinucleína parece encontrarse en el movimiento de vesículas sinápticas y en la liberación de dopamina en el espacio sináptico. De todas maneras, existe una aparente desproporción entre su papel patológico y su discreto rol en el funcionamiento normal de las neuronas. Las funciones propuestas a nivel sináptico se resumen en la figura 3.

La relación entre la alfa-sinucleína y las vesículas sinápticas ha sido más estudiada en el contexto de los eventos que causan la enfermedad de Parkinson, en ese ámbito si se han encontrado evidencias de la función que juega la proteína en el desarrollo de la enfermedad. Particularmente cuando la proteína se encuentra en exceso.

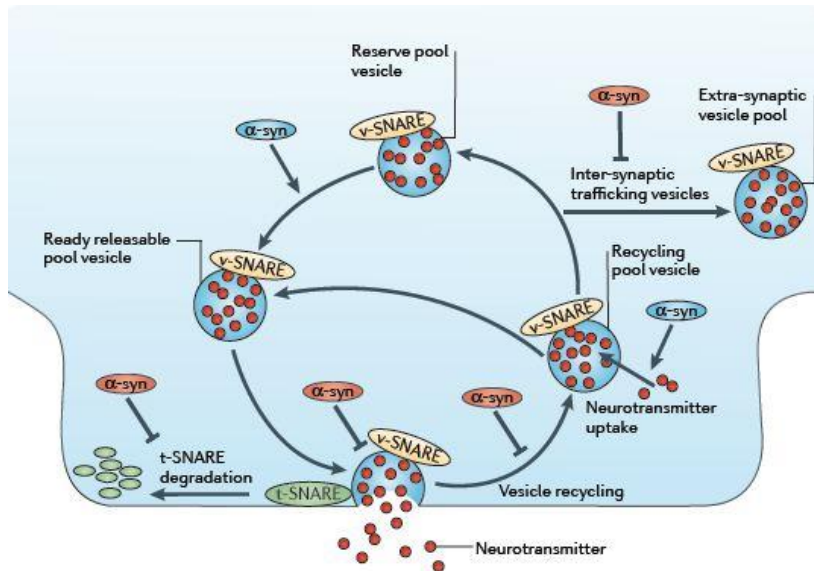


Figura 3. Función propuesta para la alfa-sinucleína en la sinapsis. Se muestran las funciones propuestas para la alfa-sinucleína en las sinapsis. Se incluye su interacción con las proteínas SNARE y su papel en la formación de vesículas, en la regulación de la cantidad de vesículas, así como en la fusión de las vesículas con la membrana sináptica, la liberación de dopamina y el reciclaje vesicular. Tomado de Lashuel et al (2013).

En ratones trasfectados para producir un exceso de alfa-sinucleína en el mesencéfalo, se ha visto que cuando incrementa la cantidad de la proteína en las neuronas, se producen alteraciones en la funcionalidad motora, esto se presenta incluso antes de que se detecte muerte neuronal en la zona nigroestriada. Se encontró, vía tomografía de emisión de positrones, que el exceso de proteína alteró el correcto funcionamiento en las vías de liberación de dopamina, esta alteración se produjo vía unión con el transportador vesicular para monoaminas. Así mismo, se encontraron acúmulos axonales de la proteína que incluían restos de membranas de organelos, como la mitocondria. Mediante técnicas histológicas se encontró que no hubo pérdida de células dopaminérgicas (Phan et al. 2017).

Un incremento en las cantidades celulares de alfa-sinucleína impide la liberación de dopamina en el espacio sináptico, vía inhibición de transportadores del neurotransmisor. Esta inhibición, además del efecto directo de reducir la dopamina disponible, hace que los niveles intracelulares del neurotransmisor se incrementen, lo que produce estrés oxidativo en la célula.

Otro estudio ha encontrado que la alfa-sinucleína en altas concentraciones, parece inhibir el anclaje de las vesículas sinápticas, esto al interactuar con los fosfolípidos ácidos de la vesícula. Esta interacción, bloquea la unión de la vesícula con las proteínas del complejo SNARE, el paso en donde la vesícula se ancla a la membrana, siendo el primer paso para la liberación del neurotransmisor de las vesículas al espacio sináptico(Lai et al., 2014).

1.2.3 Oligómeros de alfa-sinucleína

La proteína existe en las neuronas como monómero y, normalmente, así lleva a cabo sus funciones. Pero se puede encontrar también en forma de dímero, tetramero, así como oligómeros (de longitud variable), fibrillas, fibras y al final los cuerpos o neuritas de Lewy (van Rooijen et al. 2010). En general, se ha postulado que la proteína existe en un equilibrio dinámico entre su forma de monómero, dímero y tetramero, siendo que algunas de estas formas no producen alteraciones patológicas. Entre las que si producen alteraciones, se encuentran los oligómeros, agregados proteicos de más de cuatro unidades de proteína (Burré et al. 2014).

Estos oligómeros se forman cuando existe un exceso en la síntesis de la alfa-sinucleína o cuando hay un déficit en la eliminación en la misma, es decir, cuando la regulación entre síntesis y eliminación se ve alterada, pues la proteína tiene la tendencia a asociarse con ella misma de forma espontánea, sobre todo tras unirse a membranas biológicas. Se ha encontrado que los oligómeros inhiben la fusión de las vesículas sinápticas con la membrana sináptica. Pero esto se produce por la interacción de los oligómeros con una proteína del complejo SNARE, la sinaptobrevina 2, esta interacción impide la liberación del neurotransmisor y por ende causa efectos perjudiciales (Choi et al., 2013). En este caso, no se detectaron interacciones entre los oligómeros y los fosfolípidos de las vesículas.

Esa interacción de oligómeros con membranas sinápticas parece desembocar en una disfunción de las neuronas encargadas de producir dopamina. Señal de esta evidencia se ha visto en modelos *in vivo* con expresión alterada de alfa-sinucleína, donde por medio de inmunohistoquímica se ha podido apreciar la formación de oligómeros, los cuales se

asocian con el mal funcionamiento neural a nivel sináptico, con una baja liberación de dopamina y con la muerte celular (Rockenstein et al., 2014).

Aunado a esto, parece posible que los oligómeros de alfa-sinucleína se unan a otros complejos proteínicos celulares, entre los que destacan los reguladores del ión calcio celular vía retículo endoplásmico. Esta interacción lleva a un mal funcionamiento de las vías excitatorias de la célula (disminuyendo con esto la liberación de dopamina en el espacio sináptico) con la consiguiente desregulación de la exocitosis de neurotransmisores, que podría traer estrés a la célula y provocarle la muerte (Betzer et al., 2015).

Modelos *in vitro* también fueron probados en busca de esclarecer la relación de la proteína con la enfermedad de Parkinson. El efecto de los oligómeros sobre las células suele ser más drástico que el de los monómeros. En todos los casos hay una perturbación del empaquetamiento lipídico, incluso se puede hablar de un secuestro lipídico por parte de los oligómeros. Al estarse formando los agregados de alfa-sinucleína, se extraen lípidos de la membrana, que se van sumando al agregado, provocando, como se puede suponer, un daño en la integridad de la membrana que puede desembocar en su rompimiento desordenado. Un efecto adicional de esta extracción lipídica es la restricción del movimiento lipídico, una baja fluidez de la membrana, situación que alteraría el equilibrio dinámico de la misma (Reynolds et al., 2011). Se ha visto, además que causan una baja en la viabilidad celular asociada a disfunción en las membranas y flujo atípico de iones calcio (Winner, et al. 2011), se les ha asociado también a un rompimiento de las membranas (Lorenzen, et al. 2014; van Rooijen, et al. 2008), formación de poro (Schmid, et al. 2013), inhibición de la fusión vesicular o al contrario, una promoción de la fusión que alteraría el funcionamiento de los compartimentos membranosos de la célula. Los oligómeros, al igual que los monómeros, tienen un efecto más evidente cuando las vesículas poseen lípidos aniónicos, como la cardiolipina (van Rooijen, et al. 2009), prefiriéndolos sobre los lípidos neutros o catiónicos. La presencia de los oligómeros tóxicos, puede llevar a la formación de fibrillas de proteína y a la posterior formación de los cuerpos de Lewy, típicos de la enfermedad de Parkinson, como se muestra en la figura 4.

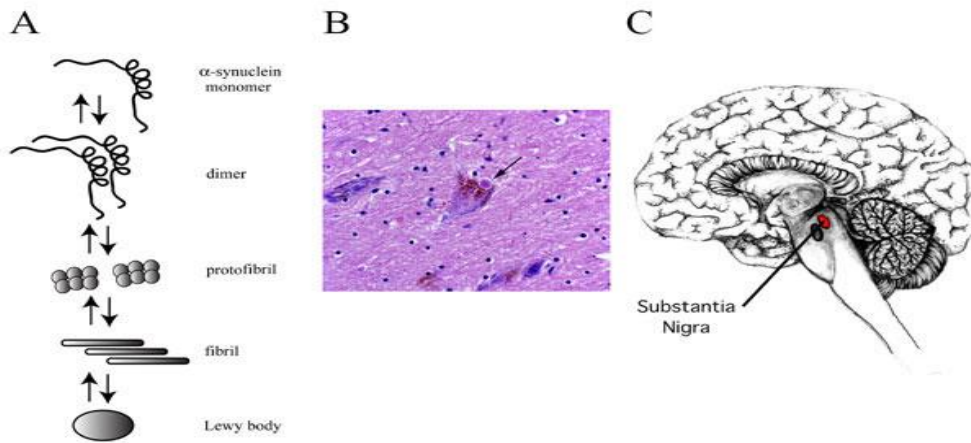


Figura 4. Formación de fibrillas amiloides y papel de los oligómeros tóxicos en la formación de las mismas y la formación de cuerpos de Lewy en la substantia nigra. En la imagen se ve la formación de los cuerpos de Lewy desde los monómeros hasta los cuerpos de Lewy, pasando por los dímeros, protofibrillas, fibrillas (A). Se aprecia además un corte y tinción histológico de los cuerpos de Lewy (B) y el lugar del cerebro donde se encuentran localizados los cuerpos de Lewy (C). Tomado de Proteínas desordenadas y su incidencia en la salud: una contribución clave de la bioinformática. Muñoz, 2012.

La alfa-sinucleína no se asocia solamente con las vesículas sinápticas, se ha encontrado evidencia suficiente sobre una función de la proteína en el metabolismo de otros compuestos membranosos de la célula. Se ha propuesto un rol en la formación y funcionamiento del retículo endoplásmico y del aparato de Golgi (Cooper et al., 2006). Aún así, es la interacción de la alfa-sinucleína con la mitocondria la que ha atraído más investigaciones y esfuerzos en los últimos años, pues parece existir una relación causal entre la interacción de la alfa-sinucleína-mitocondria y el desarrollo de la Enfermedad de Parkinson (Devi, et al. 2008).

1.3 Interacción de la alfa-sinucleína con membranas mitocondriales

1.3.1 Composición de las membranas mitocondriales: importancia de la cardiolipina

La cardiolipina es un lípido divalente que tiene dos moléculas de PG conectadas y cuatro cadenas de acilo. Esta estructura química da como resultado una pequeña cabeza polar aniónica y una gran cola hidrofóbica. A su vez, la estructura de CL imparte propiedades

biofísicas distintivas a la membrana de fosfolípidos. En primer lugar, es probable que la CL perturbe el empaquetamiento lipídico y por lo tanto la estabilidad mecánica de la membrana. En segundo lugar, las cadenas de acilo inducen una curvatura negativa lo que origina microdominios de CL como ocurre en las crestas de la membrana mitocondrial interna (Mileykovskaya & Dowhan, 2014). En tercer lugar, la cardiolipina presenta dos cargas negativas. La inferencia biológica de estas tres características biofísicas de este lípido es decir, defectos en el empaquetamiento lipídico, alta curvatura en la membrana y carga aniónica divalente, hace que los sitios ricos en cardiolipina representen un blanco principal para la permeabilización de las membranas mitocondriales por los oligómeros de alfa-sinucleína, es entonces que el papel de la cardiolipina es clave para explicar la interacción proteína-mitocondria (Ghio et al., 2016a).

Además, la cardiolipina se caracteriza por estar presente en las crestas mitocondriales y que incrementan el área total de la superficie interna mitocondrial, con una función bionérgica. La cardiolipina es tan importante que su presencia en la membrana mitocondrial externa es un mediador de daño mitocondrial, es decir, de que existen condiciones de estrés para la mitocondria. Además, es en estos lugares de alta concentración de cardiolipina, donde se da la unión de la proteína alfa-sinucleína, que aunque el método de internalización aún no ha sido descrito, estas evidencias hacen pensar que se realiza un movimiento de flip-flop entre las membranas interna y externa, lugar en donde luego se ancla la proteína alfa-sinucleína, y de donde es posteriormente interiorizada hacia la membrana interna, donde se realizarían los eventos patológicos asociados a la alfa-sinucleína (Ryan et al., 2018).

Es así como se ha observado la unión de la alfa-sinucleína con la membrana mitocondrial en algunos experimentos. Se empleó la proteína completa y se agregó a un cultivo celular neuronal, entonces se observó que la viabilidad del cultivo celular caía. Se realizaron experimentos para observar la razón de esa caída en la viabilidad celular y se observó que la proteína se había unido con las mitocondrias de forma preferencial. Estas observaciones se repitieron, pero ahora con modelos de membrana, es decir, liposomas. Se prepararon liposomas con composición lipídica similar a la membrana mitocondrial interna, poniendo énfasis en la presencia de cardiolipina, y se encontró que la proteína se unía de forma particular a estos liposomas; caso contrario al de los liposomas de la

membrana mitocondrial externa (carentes de cardiolipina), donde no se encontró unión de la proteína(Klingenberg, 2009). Además, se probó que quitando varias partes de la proteína, con el afán de observar si había unión a los liposomas si faltaban algunas partes, se encontró que al retirar algunos residuos del segmento N-terminal, sobre todo los correspondientes a los residuos 1-15, la unión con los liposomas no se realizaba(Robotta et al., 2014).

1.3.2. Alfa-sinucleína y disfunción mitocondrial

Establecida la relación de decaimiento de líneas neuronales debida a la presencia de alfa-sinucleína y profundizada al establecer una relación entre la interacción de la mitocondria y la proteína, siguió establecer mecanismos de acción. Para este caso, se tuvo que el tratamiento de mitocondrias aisladas de cerebro de rata o de líneas de células neuronales con oligómeros de alfa-sinucleína que originaron la pérdida del potencial de membrana mitocondrial, la liberación de la proteína citocromo *c* respiratoria, elevados niveles de especies reactivas de oxígeno y un aumento de calcio mitocondrial (Camilleri et al., 2013; Luth, et al. 2014). Por tanto el deterioro mitocondrial se asoció con una insuficiencia bioenergética que produjo una disminución en la viabilidad celular(Banerjee et al., 2010; Shen et al., 2014).

También se ha asociado la presencia de la proteína con una disrupción de las membranas mitocondriales, esto quiere decir, que al agregarse la proteína y generarse un mal plegamiento, se asocia fuertemente con membranas mitocondriales, alterando la estructura de la mitocondria, por medio de un mecanismo que aún permanece poco claro, pero se estima que se genera una especie de poro o, en casos menos extremos, la desestabilización de la membrana mitocondrial (Ghio, et al. 2016).

Otro efecto que se produce en las membranas es que se genera estrés oxidativo en la célula por vía de la liberación de especies reactivas de oxígeno (OH⁻, nitritos, iónsuperóxido) presentes en la matriz mitocondrial, este efecto de estrés oxidativo se ha medido en cultivos celulares, dando como resultado una viabilidad celular disminuida en cultivos de células neuronales. Aunque, por su propia naturaleza, es posible que este efecto sea sinérgico con el anterior, pues a una disrupción membranal puede

perfectamente, seguirle una liberación de lo que estaba dentro de las membranas que sufrieron daño (Parihar, et al. 2009).

La alfa-sinucleína en forma de oligómero favorece la oxidación de los lípidos, que puede producir una apertura del poro de transición mitocondrial sensible a la presencia de iones calcio, cuya apertura se midió por el aumento de conductividad eléctrica. Esta apertura del poro de transición induce oxidación en la ATP sintasa, específicamente en la subunidad beta de la misma, disminuyendo la síntesis de energía en la neurona. Esta apertura del poro de transición, aumenta la cantidad de radicales libres en la célula, lo que provoca, una peroxidación lipídica en la mitocondria (Devi et al., 2008)

En general, se dio una caída en la síntesis de energía en las neuronas que produciría muerte celular. Por otra parte, el monómero no tuvo influencia significativa sobre el funcionamiento de las proteínas mitocondriales y no activaba el poro de transición mitocondrial hasta que las concentraciones de calcio probadas eran más elevadas. (Ludtmann et al., 2018)

Una caída en la síntesis de ATP y la consiguiente baja en la obtención de energía en las células se han propuesto como un rol importante en la generación de estrés para las neuronas. Aunque este efecto no se puede apreciar solo, por lo general va ligado al incremento, ya mencionado, de la cantidad de especies reactivas de oxígeno. Aún así, vale la pena destacar la baja en la producción de energía como un efecto importante de la interacción proteína-mitocondria.

Para rematar, la alteración de funciones normales de la mitocondria también pasa por un desajuste en la maquinaria de importación de proteínas, a nivel de la membrana mitocondrial externa también se ven alteraciones pues la proteína TOM40 que es una traslocasa de la citada membrana externa, ve afectada su concentración y su funcionamiento (Bender et al., 2013).

La presencia de la proteína altera la forma de la mitocondria, teniendo una serie de efectos nocivos sobre su forma y función, estando estas dos entrelazadas. La proteína influye en la mitocondria al generar vacuolización, encogimiento y fusión del organelo. Además, se han encontrado inclusiones celulares formadas por mitocondrias degeneradas, como se determinó por estudios de histoquímica y se comprobó por medio de la acción de la proteína Cox-1, que se encontraba deprimida en las células que

expresaron la alfa-sinucleína (Lee, et al. 2006). Este daño mitocondrial se asocia, además, como ya se mencionó a la presencia aumentada de radicales libres en la célula y a una baja en la síntesis de energía, factores ambos que llevan a la muerte celular.

La proteína tiene efectos proapoptóticos sobre la célula, estos efectos se han demostrado cuando al interactuar con membranas mitocondriales, la alfa-sinucleína produce la liberación del citocromo *c*, el citocromo *c*, ya mencionado, es además, una de las proteínas integrantes de la cadena de transporte de electrones, que se encargan de la síntesis de energía en la célula. El citocromo *c* es el encargado de desencadenar la vía de efectos que lleva a la muerte celular. No es una interacción directa de la proteína con el citocromo, es más bien un efecto colateral desencadenado cuando la proteína se ancla a las membranas, desajustando su empaquetamiento lipídico y produciendo liberación de aquello que está sujeto por los lípidos, sobre todo porque el citocromo *c* se asocia con la cardiolipina, el fosfolípido al que se une de forma preferencial la alfa-sinucleína. En ese caso, aquello que ya no tiene un anclaje correcto se libera al citosol. Se observó una baja en la viabilidad celular (Firsov, et al. 2015). El efecto es sinérgico, es decir, una baja en la síntesis de energía y la liberación de mediadores apoptóticos llevan a la degeneración neural y a la muerte de las células.

La interacción de la alfa-sinucleína con la mitocondria, podría llevar a una fusión de las membranas externa e interna, desajustando la permeabilidad de la misma. La preferencia de la proteína por la cardiolipina y su capacidad para perturbar el empaquetamiento lipídico, de la que ya hemos hecho mención, permiten suponer un rol en la fusión de las membranas. Pues es precisamente en los microdominios membranosos ricos en cardiolipina donde se dan los contactos entre ambas membranas. La alteración de la fusión podría desencadenar un paso de sustancias a ambos lados de las membranas, sin olvidar que desde la matriz mitocondrial se podría dar la liberación de sustancias hacia el citosol, con el consiguiente aumento de la presión oxidativa (Ardail et al., 1990).

Un último efecto, indirecto quizá de la proteína sobre la mitocondria se refiere a su capacidad de dañar el ADN mitocondrial, la liberación de radicales libres, la desregulación de los poros de transición y el paso de moléculas que normalmente no deberían entrar a la mitocondria, desemboca en un daño al material genético del organelo. Este daño produce un malfuncionamiento de todo el mecanismo mitocondrial,

acelerando la degradación de la mitocondria y de su función primordial en la síntesis de energía (Bender et al., 2013).

En general, la interacción de la proteína con la mitocondria tiene un efecto perjudicial para el organelo, la proteína no parece tener una función nativa al interactuar con ella, como en el caso de las vesículas sinápticas. Además, su internalización hacia la membrana mitocondrial interna produce una serie de desajustes a nivel lipídico y proteínico que alteran toda la maquinaria bionérgica de la célula. Produciendo en el proceso un aumento de la cantidad de radicales libres que están en el citosol, estos radicales libres tendrían un efecto de retroalimentación positivo, pues favorecerían que mas alfa-sinucleína se saliera de control, como ya se mencionó. Además, para terminar el cuadro, una liberación de las proteínas de la membrana de la mitocondria, activaría las vías apoptóticas de la célula, desencadenando una muerte neuronal. Los efectos de la alfa-sinucleína sobre la mitocondria se resumen en la figura 5.

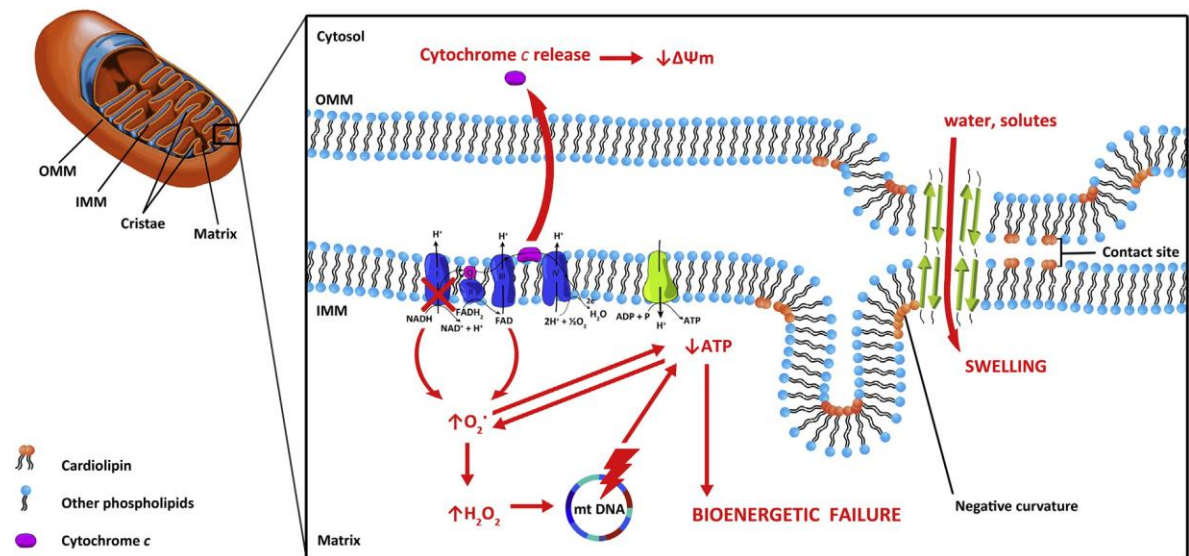


Figura 5. Efectos propuestos de la alfa-sinucleína sobre las mitocondrias. Se observa que la alfa-sinucleína tiene la capacidad de interactuar con la cardiolipina, predominante en la membrana mitocondrial interna, donde puede favorecer la fusión (swelling) de las membranas. Así mismo, afecta la capacidad de síntesis de energía de las células al interactuar con las proteínas del transporte de electrones. Y como punto final, es capaz de liberar el citocromo c, que desencadena la vía de apoptosis en la neurona. Además, estos efectos traen consigo el daño al ADN mitocondrial. Tomado de Ghio et al. 2016

Con el fin de demostrar que el efecto de fragmentación es responsabilidad directa de la proteína, se hicieron experimentos en membranas artificiales, liposomas, que tenían el lípido particular de las mitocondrias, la cardiolipina. Aunque el efecto fue observado para los oligómeros de la proteína, el efecto es indudable y la relación causal también. La interacción de la alfa-sinucleína con mitocondrias, es capaz de perturbar el empaquetamiento lipídico mitocondrial, generando una baja en la producción de energía, estrés oxidativo y muerte neuronal. Aunque parece ser que el monómero solo no es capaz de fragmentar a la mitocondria, pero su interacción con la mitocondria sí es primordial para que la agregación de la proteína ocurra (Nakamura et al., 2011).

1.3.3 Ensayos con modelos de membrana

Muchas hipótesis y modelos de acción de la alfa-sinucleína se basan en su acción frente a modelos de membrana, es decir, liposomas. Son modelos sencillos y al alcance de la mano, en ellos se ha probado la preferencia de la proteína por lípidos con diferente carga y empaquetamiento (van Rooijen et al., 2009; Stefanovic, et al. 2014).

Lo primero era conocer las preferencias de la alfa-sinucleína por los componentes de las membranas, es decir, por los lípidos que la componen, en este caso, se probó con diferentes composiciones lipídicas, encontrándose que la carga neta de los lípidos es importante para la interacción de la proteína. Los lípidos aniónicos fueron los preferidos de la proteína, tanto monómeros como oligómeros y fibrillas mostraron una tendencia clara a unirse a lípidos cargados negativamente en su grupo fosfato, como el fosfatidilglicerol (PG), el ácido fosfórico (PA), y la cardiolipina (CL). Porcentajes diferentes de lípidos aniónicos producían diferente interacción de la proteína, variando desde una unión muy fuerte, con efectos muy visibles sobre los liposomas formados, hasta una interacción débil, con pocos efectos o incluso ninguno sobre la integridad de la bicapa (van Rooijen et al. 2008).

La carga se demostró como un factor importante, aunque no el único que influía en la unión de la proteína. Pero no era el único, el grado de orden del lípido, es decir, sus insaturaciones en la cadena de carbono también se mostraron importantes. La proteína mostró preferencia por aquellos lípidos que poseían un cierto grado de desorden, estado

denominado líquido desordenado (ld), donde había presencia de insaturaciones en la cadena carbonada lipídica, pero se limitaba a una o dos insaturaciones(Zigoneanu, et al. 2012). En el caso de ser un lípido con alto grado de orden, como aquellos que poseen ácido palmítico, la interacción se demostró menos intensa, con menos efectos negativos sobre el empaquetamiento de la membrana del liposoma(van Rooijen et al., 2008). En este orden de ideas, si el modelo de membrana empleado poseía colesterol en su estructura (3-5%), aunque fuera un porcentaje relativamente bajo, la interacción era menor, casi inexistente. La presencia de colesterol provee orden a la membrana, haciendo que la interacción de agentes externos a ella, sea más difícil, por tanto, dificulta el anclaje inicial de la proteína, en comparación con las poblaciones de liposomas que carecían de él en su estructura(Zigoneanu et al., 2012).

En un primer momento, era necesario saber si la proteína era capaz de interactuar con los liposomas de diferente composición. Se había observado que la proteína cambia su estructura secundaria al interactuar con las membranas, pasando de una estructura aleatoria a una en alfa hélice. En este caso, se diseñaron experimentos basados en esa propiedad para comprobar la interacción. El ensayo elegido fue el de dicroísmo circular, un ensayo simple donde se obtienen espectros que dan información sobre la estructura secundaria de las proteínas, entre otras cosas.

Los ensayos de dicroísmo verificaron que la proteína siempre prefería unirse a los liposomas que tenían lípidos aniónicos en su estructura, pues al interactuar con esas membranas, la proteína cambiaba su espectro a uno característico de proteínas con estructura secundaria en alfa hélice(van Rooijen, et al. 2009).

Cuando se determinó que la proteína prefería membranas con lípidos aniónicos en su composición y con un cierto grado de desorden en ella, fue necesario verificar si esta interacción, por sí sola, era capaz de alterar la estructura de la membrana, es decir, de perturbar el empaquetamiento lipídico(Stefanovic et al., 2014).

Los experimentos se guiaron en la dirección de conocer si había un efecto negativo sobre la integridad de las membranas. En este caso, los ensayos de liberación de contenidos del interior de los liposomas proporcionan un buen modelo de aproximación para conocer los efectos de la proteína, tanto monomérica, como oligomérica.

Se vio que la presencia de la proteína era capaz de vaciar el contenido de liposomas, contenido que estaba compuesto por sondas fluorescentes para hacer el seguimiento del daño en los liposomas. Se encontró que, en general, los oligómeros y las fibrillas eran capaces de vaciar el contenido de los liposomas de forma más acusada que los monómeros, en comparación con el control, un detergente, se lograban porcentajes de vaciamiento por encima de 50% con la proteína agregada. Para el monómero se encontraron porcentajes variables en su capacidad de dañar las membranas y liberar su contenido al medio externo, variando desde 6%, hasta un 35%. En general, estos estudios demostraron que la presencia del monómero era suficiente para causar algún tipo de daño en la membrana, pero no era un daño tan extenso como el provocado por las especies agregadas de la alfa-sinucleína(Lorenzen et al., 2014).

En estos ensayos se llegaron a proponer diferentes modelos de acción de la alfa-sinucleína sobre las membranas, como la formación de poro amiloide(Tosatto et al., 2012) o la simple perturbación del empaquetamiento de los lípidos. En general, se han presentado pruebas a favor de ambos modelos, aunque la alteración del empaquetamiento lipídico es el efecto más encontrado en los resultados y por tanto, con mas evidencia en su favor. A favor de esto se ha demostrado que la liberación de contenidos acuosas del interior de los liposomas, no es un evento rápido y total, sino gradual, concordando con el modelo de perturbación de membrana.

Así mismo, se han presentado modelos de extracción de lípidos por parte de la proteína sobre los modelos de membrana, como ya se mencionó, es prueba de que el modelo de acción de la alfa-sinucleína sobre las membranas, aún no es conocido del todo, aún se sigue avanzando en ese sentido.

Prueba de este desconocimiento en la interacción lípido-proteína es el hecho que, tras conocer que la alfa-sinucleína interactúa con las membranas por medio de su segmento N-terminal, se procedió a probar si alguna parte de ese segmento era más importante que las demás a la hora de anclar la proteína a la membrana. Se han hecho pruebas de péptidos derivados de la alfa-sinucleína, desde la fragmentación en dos partes, para que una incluya solo el segmento N-terminal (1-60) y la otra parte a los residuos restantes (61-140), donde se demostró que, efectivamente, es el segmento N-terminal de la proteína el responsable de la unión a membranas(Shen et al., 2014). Además, en otros

estudios se ha progresado más, retirando de la proteína partes específicas más pequeñas, de tamaño variable, 10-25 residuos, en un intento por demostrar si alguno de estos segmentos era más importante a la hora de la interacción.

Se encontró que en caso de retirar los primeros residuos de la proteína, esta no interactuaba con las membranas, o lo hacía débilmente, comparada con el segmento extraído al ser probado por separado. En estos casos, se han probado péptidos que componen los residuos 2-11(Robotta et al., 2014), residuos 1-14(Lorenzen et al., 2014). En todos estos casos, se observó que estos residuos jugaban un rol importante en la interacción con membranas, así como en el daño que podía ejercer sobre las mismas. Aunque el daño que se ejercía sobre las membranas por estos residuos era menor que el provocado por el monómero completo o por los oligómeros, es de resaltar que sin estos residuos, la unión a la membrana no sería posible, con lo que se evitaría la serie de evento que llevan, por un lado al daño membranoso como tal, y por otro lado, a la formación de agregados de la proteína. Esto es importante, porque estos residuos podrían ser vistos como una alternativa terapéutica para las enfermedades en que se ha involucrado a la alfa-sinucleína, como la enfermedad de Parkinson.

Es así que la alfa-sinucleína juega un papel importante en el desarrollo de la enfermedad de Parkinson, desempeñando varios papeles en el camino hacia la enfermedad, desde su papel en la sinapsis, impidiendo la liberación de dopamina al espacio sináptico, hasta su interacción con organelos de la célula, lo que produciría un malfuncionamiento neuronal, desembocando en un fallo celular y en la muerte de la misma. Su interacción con las mitocondrias se ha demostrado como perjudicial para la célula en muchos sentidos, careciendo de los roles fisiológicos normales que tiene en la sinapsis. Aunque se ha avanzado en el conocimiento del papel de la proteína en el Parkinson, aún queda por determinar un modelo de acción específico para la proteína, un modelo que detalle la afectación celular causada por la alfa-sinucleína. Es este campo el que se ha estado detallando, en la esperanza de encontrar una alternativa terapéutica para el enfermedad, que provea mayores esperanzas a los enfermos de una vida productiva y más larga, o quizá, de una curación total. La explicación de las enfermedades y de su modo de acción, es el primer paso en ese largo camino para vencerlas, por eso se desarrolló el presente trabajo.

2. JUSTIFICACIÓN

El daño mitocondrial por la alfa-sinucleína se ha implicado en la patogénesis de la EP, sin embargo aún se desconoce el mecanismo por el cual la proteína induce este daño mitocondrial. Por lo anterior el análisis detallado de las interacciones lípido-proteína de la alfa-sinucleína con las membranas mitocondriales pueden proporcionar bases para conocer el mecanismo implicado en la disfunción mitocondrial y la relación de esto con la enfermedad de Parkinson.

3. HIPÓTESIS

La región del segmento N-terminal de la alfa-sinucleína es capaz de interactuar y perturbar la membrana mitocondrial interna.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Caracterizar la interacción del segmento N-terminal de la proteína alfa-sinucleína con modelos de membrana mitocondrial.

4.2. Objetivos Específicos

- 4.2.1. Obtener la estructura secundaria de los diferentes péptidos a emplear en ausencia y presencia de bicapas fosfolipídicas mediante dicroísmo circular.
- 4.2.2. Caracterizar la unión y el grado de inserción de los péptidos sintéticos con bicapas fosfolipídicas que simulan la membrana mitocondrial interna por espectroscopía de fluorescencia.
- 4.2.3. Evaluar la interacción de los péptidos sintéticos con monocapasfosfolipídicas que simulen la membrana mitocondrial interna.
- 4.2.4. Proponer un mecanismo de la participación del segmento N-terminal de la alfa-sinucleína en la disfunción mitocondrial y su relación con la Enfermedad de Parkinson.

5. METODOLOGÍA CIENTÍFICA

5.1 Materiales y Reactivos

Una vez realizado el diseño de las secuencias pequeñas peptídicas correspondientes a la región N-terminal de la alfa-sinucleína (residuos 1-60), en los experimentos se trabajó con los residuos 1-15 y 16-30 del citado segmento y éstas secuencias se mandaron sintetizar a Sigma-Aldrich. La alfa-sinucleína nativa se obtuvo de Sigma-Aldrich. Los lípidos 1,2-dioleil-sn-glicero-3-fosfolina (DOPC), 1,2-dioleil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE) y cardiolipina (CL), así como la versión con bromo del DOPC, DOPC-Br con el bromo en las cadenas de acilo en los carbonos 6,7 y 11,12, se obtuvieron de Sigma-Aldrich (St.Louis, MO,USA). Los disolventes orgánicos, cloroformo (Clf) y metanol (MetOH) de calidad HPLC procedentes de J.T. Baker. El resto de los reactivos empleados fueron de calidad analítica y se compraron a J.T. Baker.

5.2 Preparación de liposomas

Para representar de la mejor forma la membrana mitocondrial interna, se empleó una mezcla de los lípidos DOPC:DOPE:CL en una proporción molar de 45:28:22. Esta mezcla lipídica se disolvió en una solución de cloroformo:metanol (2:1 v/v) a 10 mg/mL como concentración final. Posteriormente, el solvente orgánico se removió bajo un flujo suave de nitrógeno, para emplear luego un desecador de vacío por dos horas. Para el experimento de dicroísmo circular, las suspensiones de lípido-peptido fueron preparadas mediante la hidratación de la película desecada con buffer Hepes 5 mM por dos horas a 25°C con dos minutos de agitación a 1400 rpm cada diez minutos en un termomixer. Después de esto, la suspensión se sonicó en un sonicador de punta Branson UP 200S para así obtener las vesículas unilamelares pequeñas (SUVs). La preparación de liposomas para el experimento de unión a vesículas, se prepararon vesículas unilamelares grandes (LUVs), mediante la extrusión de la suspensión ya mencionada de lípidos, utilizando una membrana de policarbonato con un tamaño de poro de 0.1 μm a una temperatura de 25°C, usando un miniextruder (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL, USA). Para el análisis del apagamiento de la fluorescencia por lípidos bromados, los

liposomas se hicieron incluyendo diferentes porcentajes de fosfolípidos bromados (m/m) Br_(6,7)-PC o Br_(11,12)-PC.

5.3 Caracterización de la estructura secundaria por dicroísmo circular

Los espectros de dicroísmo circular en el ultravioleta lejano (200 nm-250nm) del segmento N-terminal de la alfa-sinucleína y los péptidos sintéticos se obtuvieron en un espectropolarímetro JASCO 1100, equipado con una lámpara de Xenón de 150W, utilizando una cubeta de cuarzo de 0.1cm de paso óptico y 200µL de capacidad. Los espectros se recogieron a una velocidad de barrido de 50nm/min. Para mejorar la relación señal/ruido se promediaron 4 espectros diferentes. Para estos experimentos los péptidos se reconstituyeron en diversos fosfolípidos a una concentración final de 0.1 mg/mL utilizando una relación péptido/lípido 1:5 (peso/peso) en 0.5mL de buffer Hepes 5mM, NaCl 10mM pH 7.4 utilizando el método de evaporación-hidratación y posterior sonicación. Para el cálculo de la elipticidad molar se considerará una masa molecular promedio por residuo de 110 Da.

5.4 Fluorescencia intrínseca de los péptidos

Los espectros de emisión de fluorescencia de los diferentes péptidos fueron obtenidos usando una longitud de onda de excitación de 280 nm en un espectrómetro de fluorescencia LS 45 (Perkin-Elmer Inc.). Los espectros de emisión se obtuvieron realizando un barrido entre las longitudes de onda de 300-500 nm a 25 °C con celdas de 1 cm empleando una velocidad de 1 nm/s, con un ancho de lectura de 10 nm para las medidas de excitación y emisión.

5.5 Apagamiento de la fluorescencia del triptófano por fosfatidilcolinas bromadas

El apagamiento del triptófano por la proximidad del átomo de bromo de las fosfatidilcolinas bromadas se realizó con el fin de conocer la localización del residuo en los liposomas. Para este fin se prepararon liposomas que tuvieron diferentes

porcentajes de Br_(6,7)-PC y Br_(11,12)-PC. Los espectros se tomaron a 25°C, agregando el péptido a una cantidad de liposomas, manteniendo una proporción de 1:45 (mol/mol), para tener un volumen de trabajo de 0.5 mL. Las diferencias en el apagamiento de la fluorescencia que se obtuvieron entre los espectros las dos variantes de lípido bromado se usaron para determinar la localización del fluoróforo en la membrana, empleando el método de paralaje. La profundidad del residuo triptófano se calculó con la siguiente ecuación:

$$Z_{cf} = L_{cl} + [(-\ln(F1/F2)/\pi C - L_{21})/2L_{21}]$$

Donde Z_{cf} representa la distancia del fluoróforo del centro de la bicapa, L_{cl} es la distancia del apagador superficial al centro de la bicapa, L_{21} es la distancia entre los dos apagadores, $F1$ es la intensidad de fluorescencia en presencia del apagador superficial, $F2$ es la intensidad de fluorescencia en presencia del apagador más profundo y C es la concentración de apagador en moléculas/A².

5.6 Adsorción interfacial de los péptidos

La capacidad de un péptido para alcanzar la interface aire-líquido y formar una monocapa se analizó monitorizando los cambios en la presión superficial después de inyectar pequeños volúmenes de una solución metanólica de péptido a una concentración de 1mg/mL en la subfase acuosa. Para estos ensayos se utilizó una microcubeta de acero inoxidable de 1.3mL en la balanza de superficies de tipo Langmuir-Wilhelmy (μ TROUGH SX, Kibron Inc. Helsinki, Finlandia), rellena con buffer Tris 5mM pH 7.4 NaCl 100mM en agua bidestilada y con agitación continua para evitar que la difusión fuera la etapa limitante del proceso. La medida de la variación de la presión superficial se registró en función del tiempo. En los ensayos, se inyectaron entre 2 y 10 μ L de solución peptídica y la temperatura se mantuvo constante a 25°C. La inyección de volúmenes equivalentes de metanol no arrojó cambios en las mediciones de presión superficial.

5.7 Inserción de péptidos en monocapas preformadas.

La inserción de los péptidos derivados de la alfa-sinucleína en monocapas de composición similar a membrana mitocondrial interna se realizó usando la microbalanza del ensayo anterior, monitorizando los cambios en la presión superficial ($\Delta\pi$) de monocapas lipídicas preformadas tras la inyección de soluciones peptídicas en la subfase acuosa sobre la que se formó una capa monomolecular de MMI a diferentes presiones iniciales (π_i). El incremento observado en la presión superficial tras la inyección de cada uno de los péptidos se interpreta como una consecuencia de cambios en el empaquetamiento lateral debido a la interacción y posible posterior inserción de éste en la monocapa. La presión crítica de inserción (π_c) corresponde a la máxima presión inicial (π_i) de la monocapa que permite la interacción y eventual inserción del péptido. Los experimentos de inserción se realizaron en la misma microcubeta de teflón utilizada para los experimentos de adsorción. La monocapa se formó colocando pequeños volúmenes de soluciones concentradas de MMI en cloroformo/metanol 3:1 (v/v) sobre 1.3mL de hipofase acuosa. Tras la evaporación del solvente, 10 μ L de la solución metanólica de proteína o de los péptidos sintéticos (1 mg/mL de concentración final) se inyectaron en la subfase de 1.3 mL, registrándose los cambios en la presión superficial en función del tiempo. La inyección de cantidades equivalentes de metanol en ausencia de péptido permitió comprobar que el volumen utilizado de metanol no tenía efecto alguno en la presión lateral de las monocapas.

6. RESULTADOS

La estructura secundaria del segmento N-terminal de la alfa-sinucleína y de los péptidos derivados de este se analizaron por dicroísmo circular en el espectro UV lejano (190-240 nm). En solución acuosa los tres péptidos adoptaron una conformación aleatoria, revelada por la presencia de un pico de elipticidad molar negativa a 202 nm. Al obtenerse los espectros en presencia de bicapas de composición similar a la membrana mitocondrial interna (MMI), los tres péptidos mostraron dos picos de elipticidad molar negativa a 208 nm y a 222 nm, característicos de una conformación α -helicoidal (Fig. 6). Los porcentajes de alfa-hélice obtenidos para cada péptido fueron de 63% para N-term, 72% para P1 y 73% para P3, esto de acuerdo a la ecuación descrita en material y métodos.

La espectroscopía de fluorescencia del triptófano de los péptidos derivados de la alfa-sinucleína, en presencia y ausencia de liposomas, se muestra en la figura 7. En solución acuosa los espectros de emisión de fluorescencia de los tres péptidos presentan un máximo de emisión de fluorescencia en torno a 353 nm, típica del triptófano en un entorno polar (Bustad, Underhaug, Halskau, & Martinez, 2011). En presencia de cantidades crecientes de liposomas de composición similar a MMI se observa un ligero desplazamiento en el pico de emisión hacia longitudes de onda menores para los tres péptidos, de 353 a ~330 nm para P1 y P3, 353 a ~340 nm para N-term. Este comportamiento es indicativo de un cambio de entorno para el residuo de triptófano de los péptidos, de un ambiente polar a uno no polar. El péptido P3, muestra una disminución en la intensidad de fluorescencia, esto se explica por una interacción a nivel de cabezas polares de los fosfolípidos, donde habría mayor interacción con el medio en que se lleva a cabo la interacción, el agua del medio, tiene la propiedad de apagar la fluorescencia de los péptidos, por eso se ve una disminución en P3, caso que no se observa con el segmento completo y solo brevemente para P1.

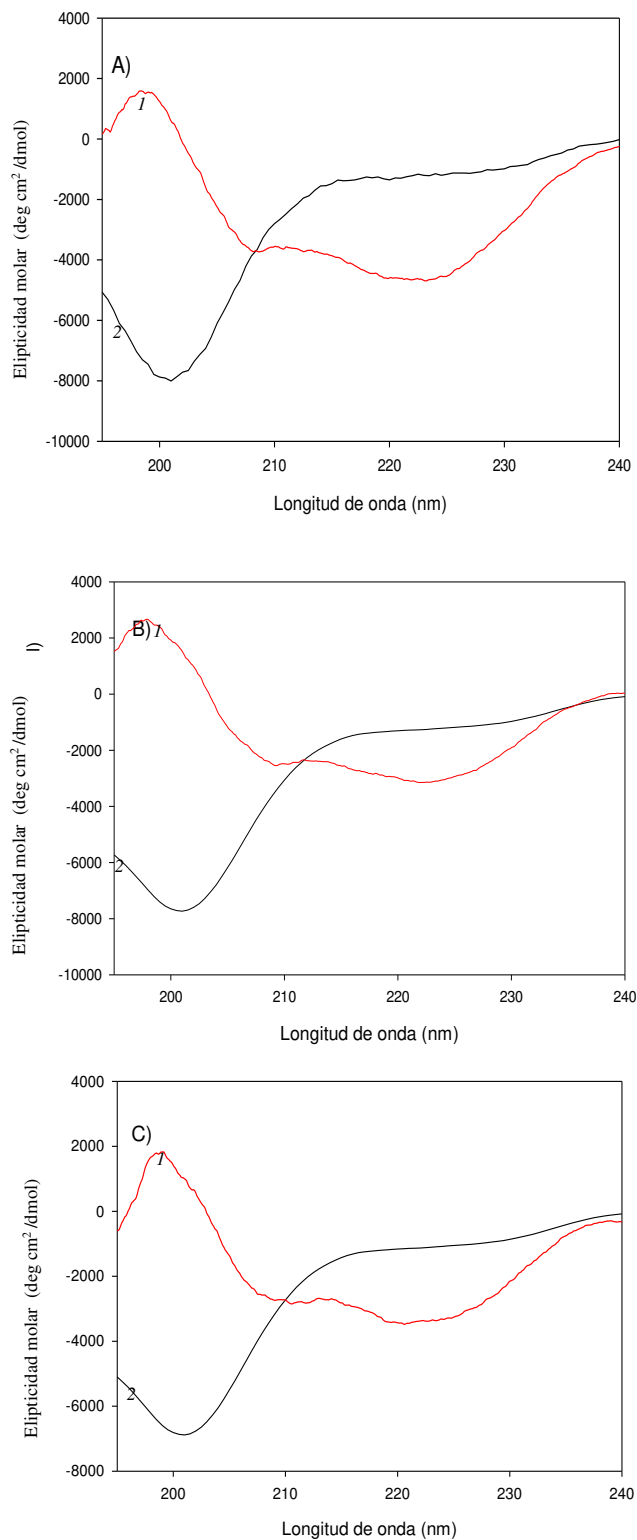


Figura 6. Estructura secundaria de los péptidos sintéticos derivados de la secuencia de la α -sinucleína. Espectros de dicroísmo circular en el UV-lejano del péptido N-term (A), P1 (B) y P3 (C) en buffer Hepes 5mM pH 7.4 (1) y en presencia de 2 mM de bicapas DOPC:DOPE:CL (45:28:22 p/p) (2).

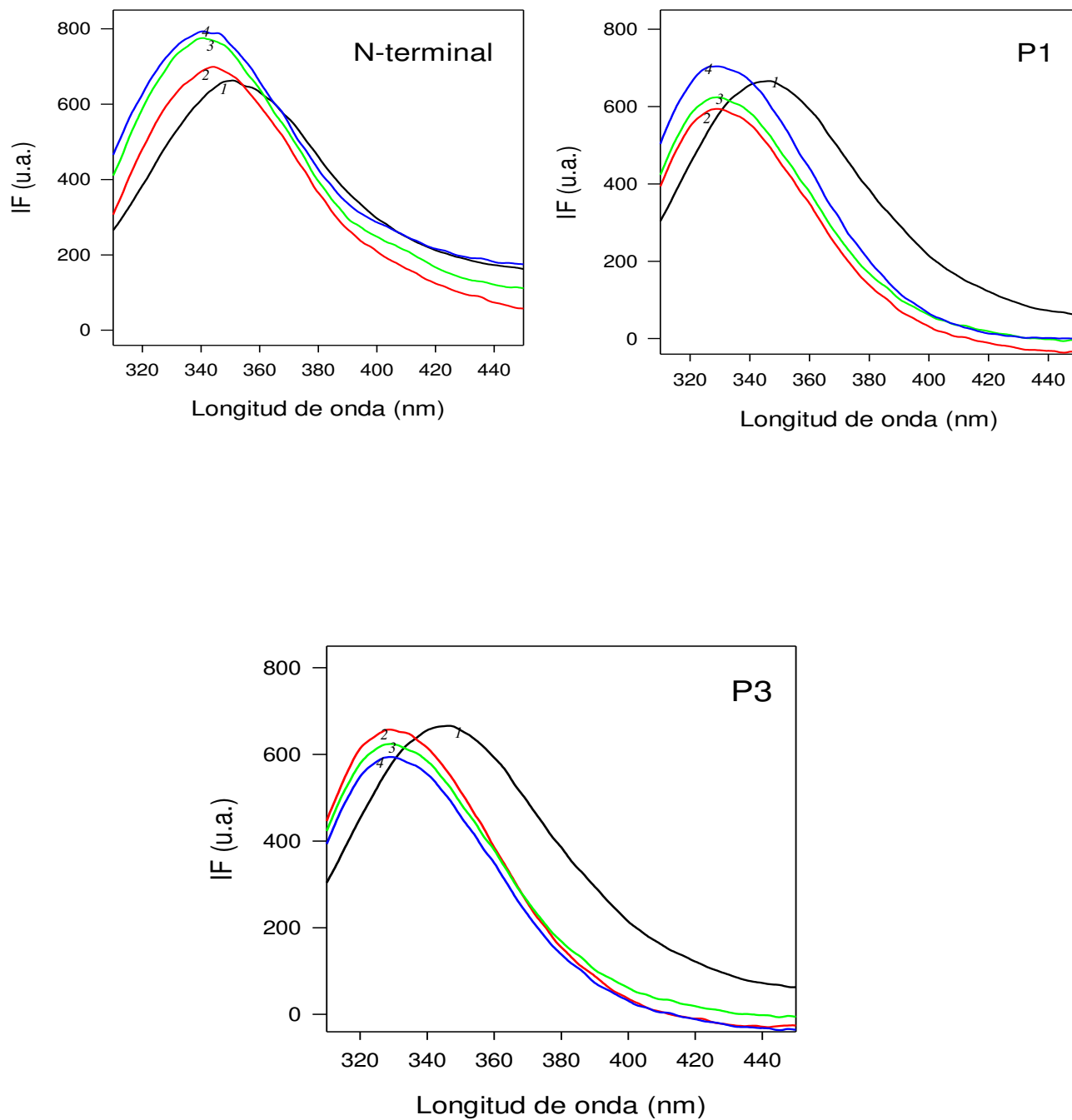


Figura 7. Espectros de emisión de fluorescencia de los péptidos sintéticos derivados de la α -sinucleína al interactuar con liposomas. Emisión de fluorescencia de los péptidos N-term, P1 y P3 en buffer Hepes 50 mM pH 7.4 y 150mM NaCl (1) y en presencia de liposomas compuestos de DOPC:DOPE:CL (45:28:22 p/p) a 1 mM (2), 2mM (3) y 4 mM (4). La concentración de péptido fue de 10 μ M. La longitud de onda de excitación fue de 280 nm.

En la figura 8 se representa la variación de la longitud de onda del máximo de emisión frente a la concentración de liposomas utilizados en el ensayo. N-term muestra un desplazamiento hacia el azul de una magnitud total de 13 nm, alcanzada en su mayor parte al emplear la concentración de liposomas más baja, con las demás concentraciones, el desplazamiento hacia el azul fue de menor magnitud, siendo casi estable. P1 mostró un desplazamiento total hacia el azul de 23 nm, alcanzada también con la primera concentración empleada, siendo después estable con las demás. P3 se desplazó hacia el azul en total 21 nm, observada al usar la concentración de liposomas más baja, mostrando una estabilidad posterior con las concentraciones crecientes de liposomas empleadas. Estos resultados señalan que el desplazamiento de la longitud de onda de máxima de emisión hacia el azul, aumenta rápidamente, para luego moderarse, pues no aumenta de forma apreciable aunque se aumente la relación lípido/péptido. Esto implicaría un equilibrio que se alcanza de forma rápida, por lo que, posteriormente, no se observan cambios importantes en la longitud de onda de emisión de fluorescencia del triptófano (Christiaens et al., 2002).

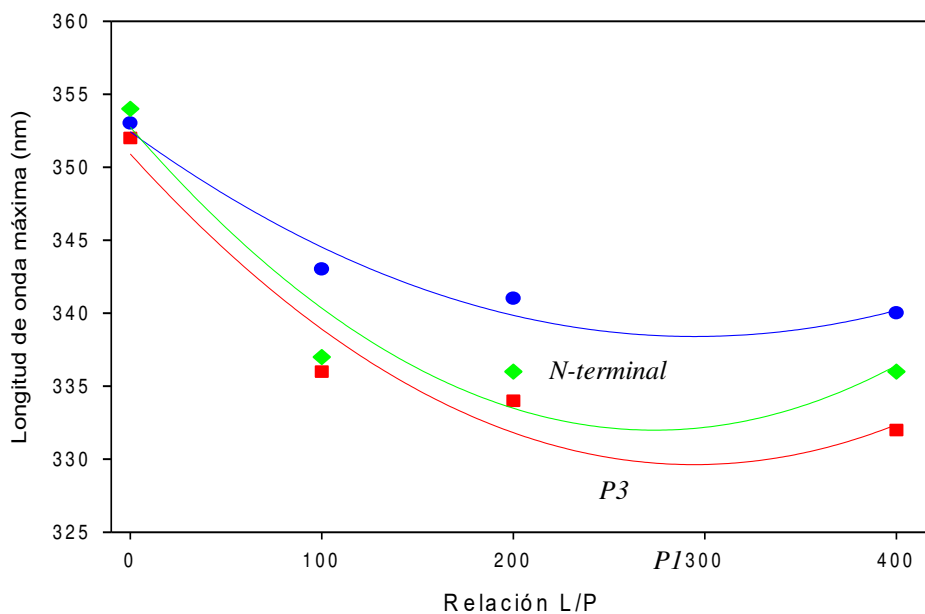


Figura 8. Variación de la longitud de onda del máximo de emisión de los péptidos derivados de la alfa-sinucleína. N-term, P1, P3. A una concentración de péptido de 10 μ M. Buffer Hepes 50mM, NaCl 150 mM, pH 7.4

Para analizar el comportamiento de los péptidos en detalle, se evaluó el apagamiento de la fluorescencia del triptófano de los péptidos, por medio de lípidos bromados. En la fig. En la figura 9 se muestran los espectros de emisión de fluorescencia de P1 y P3 al interactuar con vesículas que contienen diferentes porcentajes de Br-DOPC en diferentes posiciones de la cadena carbonada, ya sea en los carbonos (6,7) o en las posiciones (11,12) de la cadena de acilo. Al incrementar el porcentaje de lípido bromado se produce un apagamiento progresivo de la emisión de fluorescencia del residuo triptófano de los péptidos como resultado de la asociación de estos con las membranas que poseen átomos de bromo en sus cadenas de acilo. La comparación del apagamiento por lípidos con bromo en diferente posición de la cadena de acilo permite estimar la localización relativa del triptófano de los péptidos en la bicapa, esta localización se logra porque se conocen las localizaciones relativas de los sustituyentes de bromo. Puede observarse que el apagamiento de la fluorescencia de P1 por el isómero Br(11,12) es mayor que la provocada por el isómero Br(6,7) (Fig. 10A,B). Mientras que la disminución de la fluorescencia para P3 fue mayor con el isómero Br(6,7) que con el isómero Br(11,12) (Fig. 4C,D). Aplicando la ecuación de paralaje a estos datos, es posible dar un estimado de donde se encuentran localizados los triptófanos de cada péptido. Dando una localización de $\sim 10 \pm 1$ Å desde el centro de la bicapa para P1 y de $\sim 15 \pm 1$ Å desde el centro de la bicapa para P3. Estos resultados sugieren que P1 se inserta más profundo en la membrana, mientras que P3 se asocia más a la superficie de la membrana. Todos estos resultados muestran la capacidad de los péptidos estudiados en este trabajo para interactuar e insertarse en bicapas compuestas de DOPC/DOPE/CL, adoptando, en distinta medida, una conformación de alfa-hélice. Se ha sugerido que la alfa sinucleína en presencia de vesículas unilamelares pequeñas adopta un arreglo conformado por dos hélices anti paralelas (Drescher et al., 2008) y adopta una conformación más extendida cuando entra en contacto con vesículas con menor curvatura (Georgieva, et al. 2008), también se ha reportado que la alfa sinucleína tiene una conformación alfa helicoidal donde las hélices se arreglan de forma paralela al eje de la interfase aire-agua (Wang, et al. 2010).

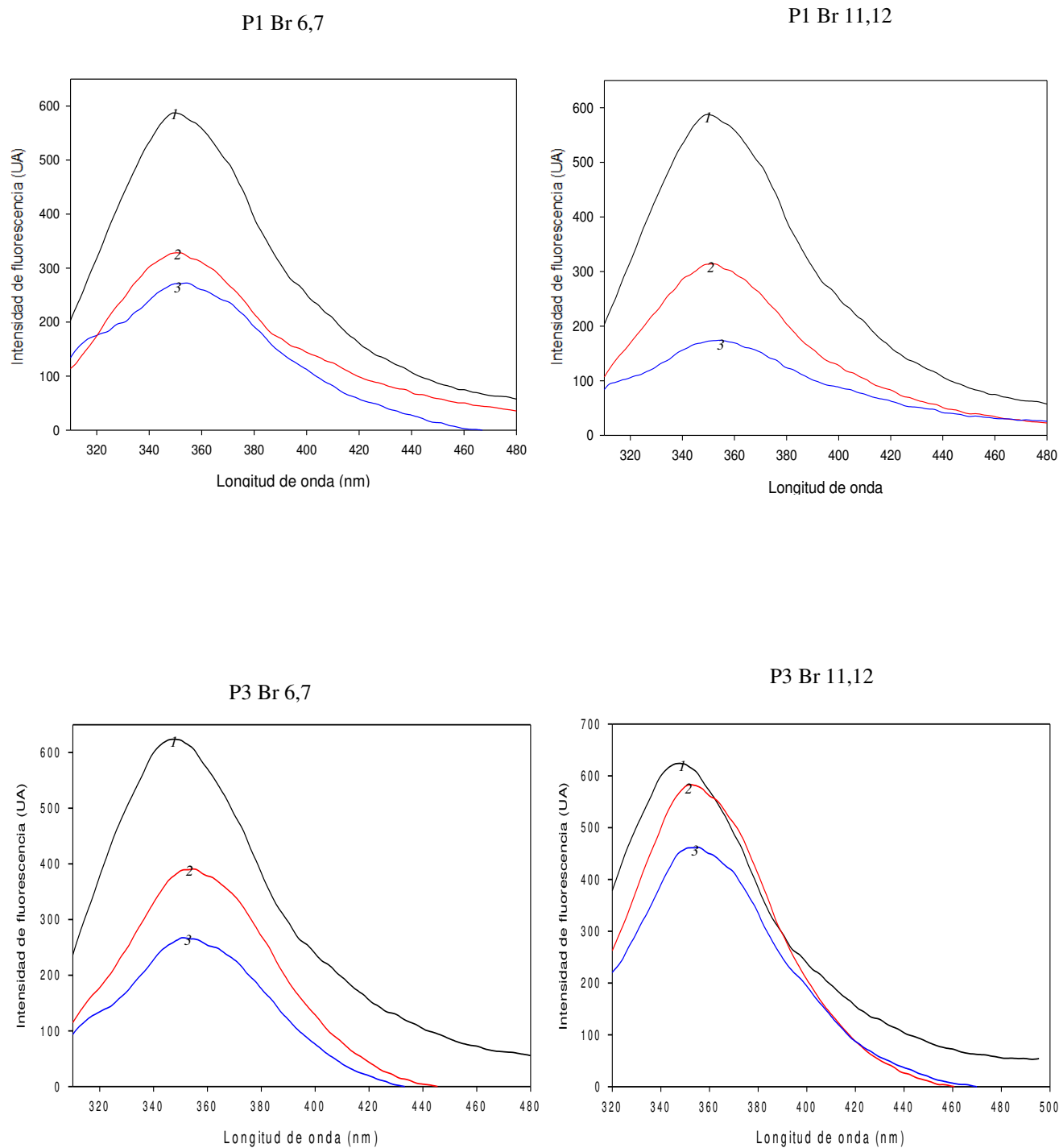


Figura 9. Apagamiento de la fluorescencia de P1 y P3 por lípidos bromados. Espectro de emisión de fluorescencia a 25° de P1 y P3 al interactuar con liposomas de DOPC:DOPE:CL (45:28:22 w/w). Los porcentajes empleados de lípidos bromados: 0 (1), 20 (2) y 40% (3) w/w. Se empleó el lípido Br_(6,7)-DOPC y Br_(11,12)-DOPC para llegar a los porcentajes de lípido bromado empleado. La longitud de onda de excitación fue de 280 nm y la intensidad de fluorescencia está dada en unidades arbitrarias.

Para analizar la conformación interfacial de estos péptidos estudiados, usamos la técnica de la balanza de Lagmuir, esto porque es un modelo de relativa simpleza a la hora de simular las interfaces que se encuentran en la membrana mitocondrial, sin dejar de recordar que las propiedades fisicoquímicas de la balanza son diferentes a las encontradas en el citoplasma celular. Se tiene reportado que la alfa-sinucleína adopta una conformación alfa-helicoidal con el eje de la hélice siendo paralelo a la interfase aire-agua, (Beyer, 2007; Fusco et al., 2014). Las isotermas de compresión de monocapas de cada péptido puro pueden proporcionar información sobre las tendencias conformacionales de cada péptido en función de la presión superficial. Dos datos importantes se obtuvieron de estas gráficas. Primero, el área por residuo al iniciar la compresión induce un incremento en la presión superficial, dando una idea del espacio ocupado por cada molécula de péptido al momento de estar en la conformación más extendida en la interfase aire-líquido. Más aún, el grado de compresión que resiste cada película de péptido indica la estabilidad de los péptidos en un estado comprimido. La figura 10 muestra el comportamiento superficial de las monocapas de cada péptido cuando fueron sometidas a compresión. Ambos péptidos, P1 y P3, son capaces de formar monocapas estables en subfases salinas, debido a su carácter anfipático. El área ocupada por cada péptido de P1 fue de 350 \AA^2 (Fig. 10A), mientras que para el péptido P3 fue de cerca de 40 \AA^2 por molécula (Fig. 10B). Por tanto, P3 puede adoptar una conformación más perpendicular.

Las monocapas de P3 colapsaron a una presión de 15 mN/m , mientras que las de P1 soportaron una presión mayor, de cerca de 30 mN/m . La isoterma del péptido N-terminal de la alfa-sinucleína mostró una meseta a 15 mN/m antes de alcanzar presiones más altas (Fig. 11). Esta meseta indica que el péptido experimenta un cambio en su conformación interfacial. Es muy probable que la meseta se deba a la expulsión de la interfase del segmento correspondiente a los residuos 16-30, como se observa en la isoterma del péptido P3, el cual no resiste presiones superiores a 15 mN/m .

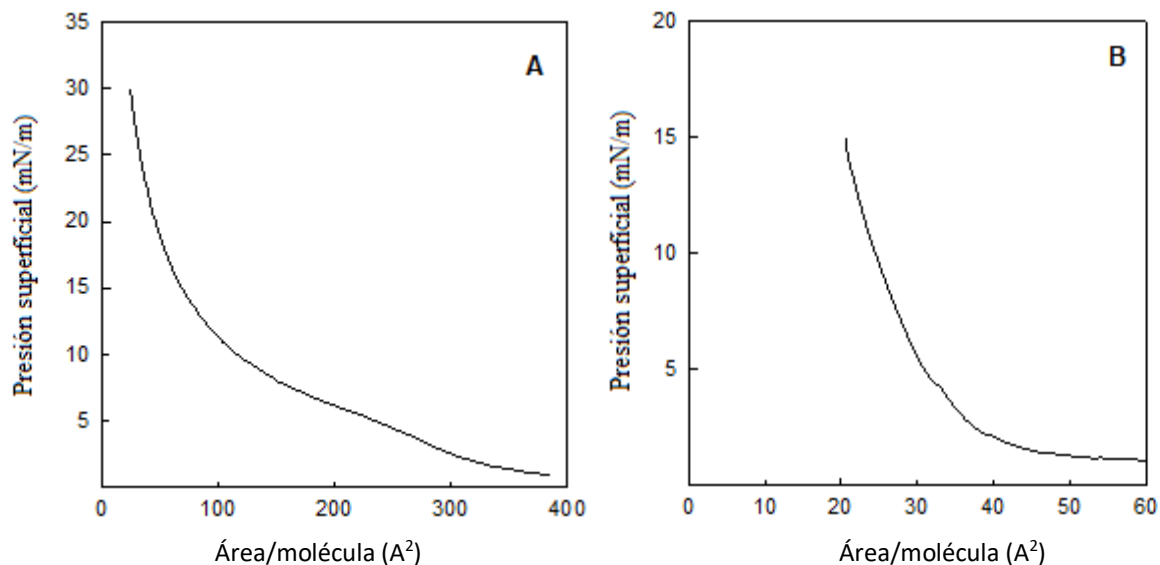


Figura 10. Isothermas de presión de monocapas de los péptidos derivados de la alfa-sinucleína P1 (A) y P3 (B). La subfase se componía de Tris 5 mM, pH 7.4 NaCl 100 mM, a una temperatura de 25 °C, con una concentración de péptido en la interfase de 4 μ M.

El resultado sugiere que solo los primeros 15 aminoácidos de la alfa-sinucleína se mantiene asociado a la interfase a altas presiones superficiales, como aquellas que se encuentran donde hay más cardiolipina, como las crestas mitocondriales. El modelo actual para explicar la estructura y disposición de la alfa-sinucleína en monocapas de fosfolípidos implica que el segmento N-terminal de la proteína es responsable por la asociación con fosfolípidos (Alderson y Markley, 2013; Bartels et al., 2010), de la misma manera se demostró que este segmento es esencial para la regulación de la permeabilidad de la membrana mitocondrial (Shen et al., 2014), entonces, al investigar la capacidad de cada péptido para interactuar con la membrana mitocondrial interna (MMI), se formaron monocapas compuestas de forma similar a la MMI (DOPC:DOPE:CL 45:28:22 m/m) en la interfase aire-agua, para después inyectar los péptidos de la alfa-sinucleína (4 μ M) en la subfase.

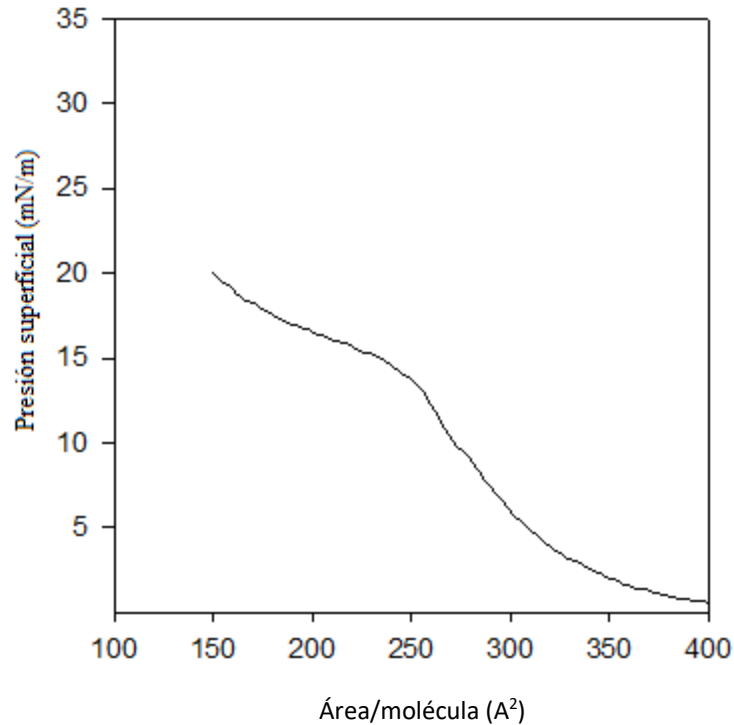


Figura 11. Isoterma de presión del péptido correspondiente al segmento N-terminal de la alfa-sinucleína. La subfase se componía de Tris 5 mM, pH 7.4 NaCl 100 mM, a una temperatura de 25 °C, con una concentración de péptido en la interfase de 4 μ M.

Los péptidos P1 y P3, mostraron capacidad para perturbar e insertarse en la monocapa a diferentes presiones superficiales (π_i). La Fig. 12A muestra que la inyección de P1 en la subfase, debajo de la monocapa de los fosfolípidos ya mencionados produce un incremento instantáneo en la presión ($\Delta\pi$) como consecuencia de la asociación del péptido con la monocapa. Un comportamiento similar se observó para el péptido P3 (Fig. 12B), la asociación interfacial del péptido P1 con la monocapa, produce un mayor incremento de la presión superficial que el péptido P3. Esto se podría deber a la ausencia de un residuo de lisina en P3, sugiriendo esto que la asociación y estabilización del péptido en la película interfacial, tiene un importante componente electrostático. Devi et al., 2008, reportaron resultados similares, mostrando que el segmento N-terminal de la alfa-sinucleína, que posee varios aminoácidos cargados positivamente, tiene un rol crítico al momento de interactuar con la mitocondria.

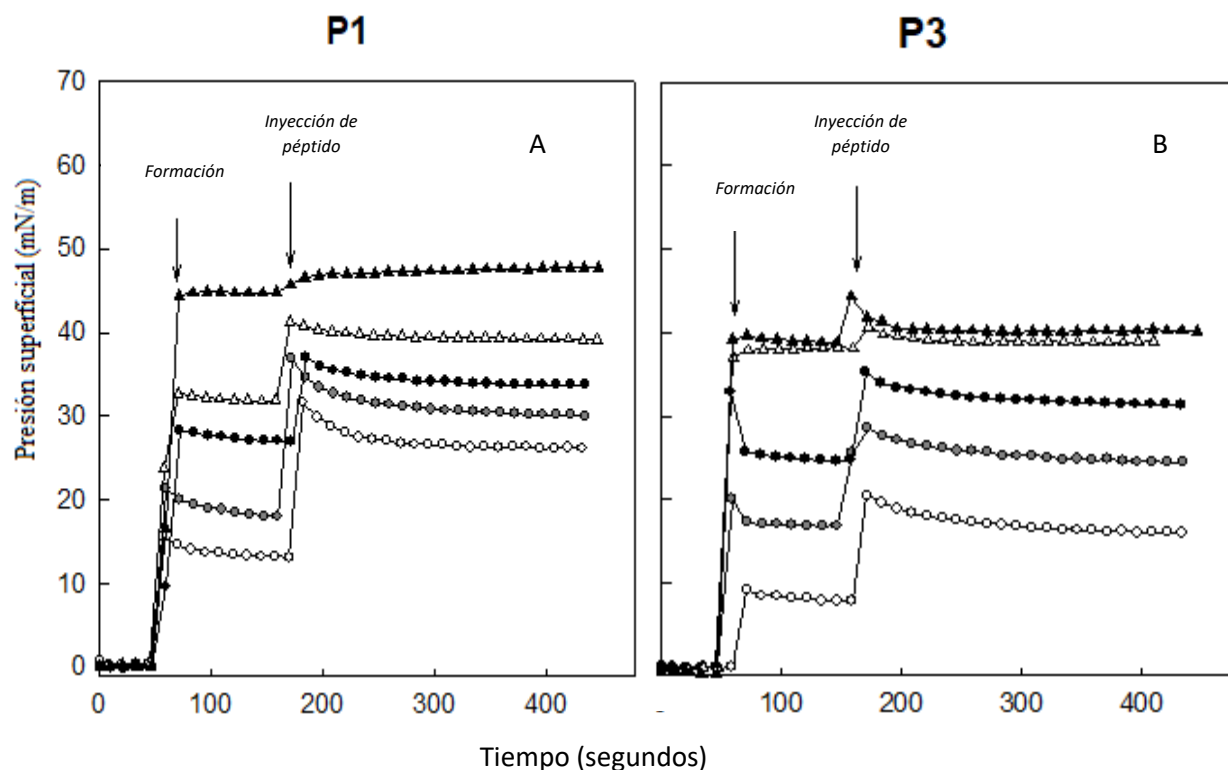


Figura 12. Inserción de los péptidos derivados de la alfa-sinucleína en monocapas de composición similar a la membrana mitocondrial interna DOPC:DOPE:CL (45:28:22 p/p). Cinética de inserción de 4 μ M de los péptidos P1 y P3 inyectados en la subfase de monocapas preformadas a diferentes presiones. Las presiones iniciales (π_i) fueron 10 (○) 20 (●) 27 (●) 38 (●) y 40 mN/m (▲). El ensayo se mantuvo a 25 °C, con una subfase compuesta de Tris 5mM, pH 7.4 y NaCl 100 mM.

En la Fig. 13 se representó el incremento en la presión superficial ($\Delta\pi$) frente a la presión superficial inicial de la monocapa fosfolipídica original (π_i), tras la inyección de una cantidad dada de cada péptido. Para ambos péptidos, el valor ($\Delta\pi$) siempre baja cuando π_i aumenta, como se esperaría si las moléculas de lípidos estuvieran densamente empaquetadas, impidiendo la inserción de los péptidos. De estas gráficas se puede calcular la presión crítica de inserción (π_c), la cual representa la máxima presión superficial a la cual los péptidos son capaces de insertarse en la monocapa. Este parámetro depende de la composición de la monocapa tanto como de la afinidad relativa de los péptidos para asociarse con la película interfacial (Bartels et al., 2010). Por lo general, se asume que el empaquetamiento lateral de un lípido en una bicapa puede ser

representado en una monocapa comprimida a una presión de ~ 30 mN/m. Por tanto, moléculas con valores de π_c mayores a 30 mN/m son consideradas como capaces de interactuar e insertarse en membranas lipídicas (Ghio, Kamp, Cauchi, Giese, & Vassallo, 2016b).

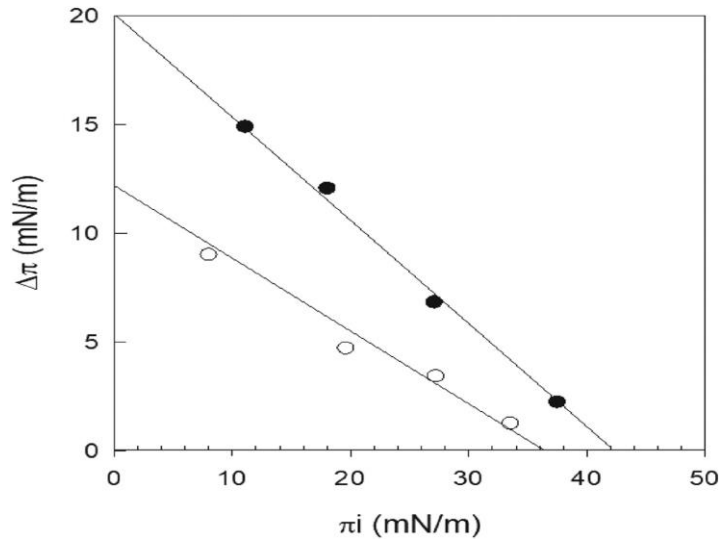


Figura 13. Determinación de la presión crítica de inserción de los péptidos derivados de la alfa-sinucleína P1 (●) y P3 (○) en monocapas compuestas de DOPC:DOPE:CL (45:28:22 razón molar). Se relaciona el incremento de la presión superficial ($\Delta\pi$) respecto a la presión superficial inicial (π_i) de la monocapa cuando se inyecta el péptido correspondiente. La subfase se componía de Tris 5 mM, pH 7.4, NaCl 100 mM y la temperatura se mantuvo a 25 °C. La concentración de péptido era de 4 μ M. Las líneas representan la regresión lineal que mejor representa la relación entre las variables. La presión de inserción crítica fue calculada por extrapolación del valor $\Delta\pi = 0$ mN/m

La presión crítica calculada para la inserción del péptido P1 en la monocapa fue de cerca de 42 mN/m, mientras que π_c para el péptido P3 fue de cerca de 36 mN/m, entonces, ambos péptidos exceden las condiciones de presión fisiológicas. Estos valores diferenciales, muestran que son los residuos 1-15 los que tienen una asociación más profunda con la monocapa.

7. DISCUSIÓN

La unión de la alfa sinucleína a membranas biológicas ha sido estudiada extensamente. Los experimentos previos hacen uso de bicapas planas, vesículas liposomales y micelas que contienen fosfolípidos relevantes desde un punto de vista fisiológico (Beyer, 2007). Aunque se han demostrado distintas formas de unión de la proteína con las membranas, hay un consenso: al unirse a la membrana biológica, la alfa sinucleína forma hélices alfa anfipáticas mediante el segmento N-terminal y la región NAC (Fusco et al., 2014). Al ser monitorizada por medio de la espectroscopía de dicroísmo circular, la unión de la proteína a lípidos le indujo un cambio de conformación, de una estructura aleatoria a una helicoidal, donde el contenido de alfa-hélice para la alfa sinucleína pasa del 2% al 71% (Alderson & Markley, 2013), estos porcentajes son comparables a las observaciones reportadas en el presente estudio para los péptidos derivados del segmento N-terminal de la alfa sinucleína. La unión a membranas de los monómeros de alfa sinucleína parece involucrar dos pasos: primero el anclaje por medio de los residuos 3-25 del segmento N-terminal; seguido por un cambio de conformación, de estructura aleatoria a una helicoidal para los residuos 26-97, estos residuos actúan como sensores de membrana para determinar la afinidad de unión de la proteína; el dominio C-terminal exhibe una débil interacción con la superficie de las membranas (Bartels et al., 2010). Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran que los primeros 15 aminoácidos de la alfa sinucleína son los principales responsables del anclaje a membrana, perturbando en el proceso la región hidrocarbonada de la misma, para el caso de los residuos 16-30, la interacción se da solo al nivel del grupo polar de los fosfolípidos, sugiriendo que la interacción lípido-péptido se basaría solo en los primeros 15 aminoácidos (Devi et al., 2008; Zigoneanu et al., 2012). Los resultados del presente concuerdan con las observaciones anteriores, que revelan que la afinidad de unión del segmento N-terminal no es uniforme (Robotta et al., 2012). Estos resultados no solamente implican que la unión de la alfa sinucleína a la membrana mitocondrial interna es un proceso iniciado por el segmento N-terminal, sino que sugieren también que la afinidad de las regiones más cercanas a la parte N-terminal de la proteína interactúan más fuertemente que las más distales a dicho segmento. La cardiolipina se

asoció por muchos años, de forma exclusiva, con la membrana mitocondrial interna, donde conforma el 25% del total de fosfolípidos. Pero, de forma reciente, la cardiolipina se ha encontrado en la membrana mitocondrial externa (~4%), especialmente en los sitios de contacto que unen la membrana interna con la externa, debido a la estructura hexagonal que es capaz de formar este lípido (Ghio et al., 2016b), de esta forma, es posible que la asociación de la alfa sinucleína en los sitios de contacto sea modulada por los primeros quince residuos del segmento N-terminal de la proteína, respondiendo a fuerzas eléctricas e hidrofóbicas mostradas por la habilidad del péptido P1 para permanecer asociado a la interface a las altas presiones laterales causadas por la cardiolipina, debidas a que este lípido incrementa las interacciones laterales entre los lípidos de cada monocapa, así mismo, y de forma simultánea, la cardiolipina disminuye la cohesión de la membrana a concentraciones fisiológicas de la alfa sinucleína (Nichols-Smith, Teh, & Kuhl, 2004). Reportes recientes demuestran la translocación de la cardiolipina a la membrana mitocondrial externa en respuesta a la presencia de alfa sinucleína en la superficie de la membrana mitocondrial (Ryan et al., 2018), entonces, es posible que los primeros 15 aminoácidos permitan el anclaje de la proteína a los sitios de contacto, para que los siguientes residuos del segmento N-terminal participen en la traslocación de la cardiolipina. Sin embargo, se requieren experimentos futuros para analizar la reorganización de los fosfolípidos mitocondriales.

8. CONCLUSIÓN

En conjunto con los datos reportados en la literatura, los resultados expuestos muestran que la afinidad del segmento N-terminal hacia la mitocondria no es uniforme. Aparentemente, los primeros 15 aminoácidos de la alfa sinucleína penetran más profundamente en los liposomas que simulan la membrana mitocondrial interna y permanecen asociados a la misma, incluso a altas presiones interfaciales. El conocimiento actual sobre el papel desempeñado por la alfa sinucleína y la mitocondria, así como el rol desempeñado por la interacción entre ellos, en el desarrollo de la enfermedad de Parkinson es limitado, pero es posible que estos primeros 15 aminoácidos de la proteína sean los primeros en interactuar y perturbar la función mitocondrial. Esta interacción se traduce luego en una serie de fallos celulares que podrían ser los causales en la muerte neuronal y en el desarrollo posterior de la Enfermedad de Parkinson.

9.BIBLIOGRAFÍA

- Alderson, T. R., & Markley, J. L. (2013). Biophysical characterization of α -synuclein and its controversial structure. *Intrinsically Disordered Proteins*, 1(1), e26255. <https://doi.org/10.4161/idp.26255>
- Ardail, D., Privat, J. P., Egret-Charlier, M., Levrat, C., Lerme, F., & Louisot, P. (1990). Mitochondrial contact sites. Lipid composition and dynamics. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1186/s12936-015-0661-z>
- Banerjee, K., Sinha, M., Pham, C. L. L., Jana, S., Chanda, D., Cappai, R., & Chakrabarti, S. (2010). α -Synuclein induced membrane depolarization and loss of phosphorylation capacity of isolated rat brain mitochondria: Implications in Parkinson's disease. *FEBS Letters*, 584(8), 1571–1576. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.03.012>
- Bartels, T., Ahlstrom, L. S., Leftin, A., Kamp, F., Haass, C., Brown, M. F., & Beyer, K. (2010). The N-terminus of the intrinsically disordered protein α -synuclein triggers membrane binding and helix folding. *Biophysical Journal*, 99(7), 2116–2124. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2010.06.035>
- Bellani, S., Sousa, V. L., Ronzitti, G., Valtorta, F., Meldolesi, J., & Chieragatti, E. (2010). The regulation of synaptic function by α -synuclein. *Communicative and Integrative Biology*, 3(2), 106–109. <https://doi.org/10.4161/cib.3.2.10964>
- Bender, A., Desplats, P., Spencer, B., Rockenstein, E., Adame, A., Elstner, M., ... Masliah, E. (2013). TOM40 Mediates Mitochondrial Dysfunction Induced by α -Synuclein Accumulation in Parkinson's Disease. *PLoS ONE*, 8(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062277>
- Betzer, C., Movius, A. J., Shi, M., Gai, W. P., Zhang, J., & Jensen, P. H. (2015). Identification of synaptosomal proteins binding to monomeric and oligomeric α -synuclein. *PLoS ONE*, 10(2), 1–24. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116473>
- Beyer, K. (2007). Mechanistic aspects of Parkinson's disease: α -synuclein and the

- biomembrane. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 47(2), 285–299. <https://doi.org/10.1007/s12013-007-0014-9>
- Blumenfeld, Z., & Brontë-Stewart, H. (2015). High Frequency Deep Brain Stimulation and Neural Rhythms in Parkinson's Disease. *Neuropsychology Review*, 25(4), 384–397. <https://doi.org/10.1007/s11065-015-9308-7>
- Bonini, N. M., & Giasson, B. I. (2005). Snaring the function of α -synuclein. *Cell*, 123(3), 359–361. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.10.017>
- Burre, J., Sharma, M., Buchman, V., Etherton, M. R., Sudhof, T. C., & Tsetsenis, T. (2010). Alpha-synuclein promotes SNARE-complex assembly in vivo and in vitro. *Science*, 329(September), 1663–1667. <https://doi.org/10.1126/science.1195227>
- Burré, J., Sharma, M., & Südhof, T. C. (2014). α -Synuclein assembles into higher-order multimers upon membrane binding to promote SNARE complex formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(40), E4274–E4283. <https://doi.org/10.1073/pnas.1416598111>
- Busch, D. J., Oliphint, P. A., Walsh, R. B., Banks, S. M. L., Woods, W. S., George, J. M., & Morgan, J. R. (2014). Acute increase of α -synuclein inhibits synaptic vesicle recycling evoked during intense stimulation. *Molecular Biology of the Cell*, 25(24), 3926–3941. <https://doi.org/10.1091/mbc.E14-02-0708>
- Bustad, H. J., Underhaug, J., Halskau, Ø., & Martinez, A. (2011). The binding of 14-3-3 c to membranes studied by intrinsic fluorescence spectroscopy. *FEBS Letters*, 585(8), 1163–1168. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.03.027>
- Cabin, D. E., Shimazu, K., Murphy, D., Cole, N. B., Gottschalk, W., McIlwain, K. L., ... Nussbaum, R. L. (2002). Synaptic Vesicle Depletion Correlates with Attenuated Synaptic Responses to Prolonged Repetitive Stimulation in Mice Lacking alpha - Synuclein. *J. Neurosci.*, 22(20), 8797–8807. <https://doi.org/22/20/8797> [pii]
- Camilleri, A., Zarb, C., Caruana, M., Ostermeier, U., Ghio, S., Högen, T., ... Vassallo, N. (2013). Mitochondrial membrane permeabilisation by amyloid aggregates and protection by polyphenols. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*,

1828(11), 2532–2543. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.06.026>

- Castagnet, P. I., Golovko, M. Y., Barceló-Coblijn, G. C., Nussbaum, R. L., & Murphy, E. J. (2005). Fatty acid incorporation is decreased in astrocytes cultured from α -synuclein gene-ablated mice. *Journal of Neurochemistry*, *94*(3), 839–849. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2005.03247.x>
- Chandra, S., Chen, X., Rizo, J., Jahn, R., & Südhof, T. C. (2003). A broken α -helix in folded α -synuclein. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(17), 15313–15318. <https://doi.org/10.1074/jbc.M213128200>
- Chandra, S., Fornai, F., Kwon, H.-B., Yazdani, U., Atasoy, D., Liu, X., ... Südhof, T. C. (2004). Double-knockout mice for α - and β -synucleins: Effect on synaptic functions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *101*(41), 14966–14971. <https://doi.org/10.1073/pnas.0406283101>
- Chávez-León, E., Ontiveros-Urbe, M. P., & Carrillo-Ruiz, J. D. (2013). la enfermedad de Parkinson: Neurología para psiquiatras. *Salud Mental*, *36*(4), 315–324. <https://doi.org/10.17711/SM.0185-3325.2013.038>
- Cheng, D., Jenner, A. M., Shui, G., Cheong, W. F., Mitchell, T. W., Nealon, J. R., ... Garner, B. (2011). Lipid pathway alterations in parkinson's disease primary visual cortex. *PLoS ONE*, *6*(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017299>
- Choi, B.-K., Choi, M.-G., Kim, J.-Y., Yang, Y., Lai, Y., Kweon, D.-H., ... Shin, Y.-K. (2013). Large α -synuclein oligomers inhibit neuronal SNARE-mediated vesicle docking. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(10), 4087–4092. <https://doi.org/10.1073/pnas.1218424110>
- Christiaens, B., Symoens, S., Vanderheyden, S., Engelborghs, Y., Joliot, A., & Prochiantz, A. (2002). Tryptophan fluorescence study of the interaction of penetratin peptides with model membranes, *2926*, 2918–2926. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2002.02963.x>
- Cooper, A. A., Gitler, A. D., Cashikar, A., Haynes, C. M., Hill, K. J., Bhullar, B., ... Lindquist, S. (2006). α -synuclein blocks ER-Golgi traffic and Rab1 rescues neuron

- loss in Parkinson's models. *Science*, 313(5785), 324–328.
<https://doi.org/10.1126/science.1129462>
- Devi, L., Raghavendran, V., Prabhu, B. M., Avadhani, N. G., & Anandatheerthavarada, H. K. (2008). Mitochondrial import and accumulation of α -synuclein impair complex I in human dopaminergic neuronal cultures and Parkinson disease brain. *Journal of Biological Chemistry*, 283(14), 9089–9100.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M710012200>
- Dikiy, I., & Eliezer, D. (2012). Folding and misfolding of alpha-synuclein on membranes. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1818(4), 1013–1018.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2011.09.008>
- Drescher, M., Veldhuis, G., Van Rooijen, B. D., Milikisyants, S., Subramaniam, V., & Huber, M. (2008). Antiparallel arrangement of the helices of vesicle-bound α -synuclein. *Journal of the American Chemical Society*, 130(25), 7796–7797.
<https://doi.org/10.1021/ja801594s>
- Drolet, R. E., Cannon, J. R., Montero, L., & Greenamyre, J. T. (2009). Chronic rotenone exposure reproduces Parkinson's disease gastrointestinal neuropathology. *Neurobiology of Disease*, 36(1), 96–102. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2009.06.017>
- Fink, A. L. (2006). <The Aggregation and Fibrillation of alfa synu.pdf>, 39(9), 628–634.
- Firsov, A. M., Kotova, E. A., Korepanova, E. A., Osipov, A. N., & Antonenko, Y. N. (2015). Peroxidative permeabilization of liposomes induced by cytochrome c/cardiolipin complex. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1848(3), 767–774. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.11.027>
- Fusco, G., De Simone, A., Gopinath, T., Vostrikov, V., Vendruscolo, M., Dobson, C. M., & Veglia, G. (2014). Direct observation of the three regions in α -synuclein that determine its membrane-bound behaviour. *Nature Communications*, 5(May), 1–8.
<https://doi.org/10.1038/ncomms4827>
- Georgieva, E. R., Ramlall, T. F., Borbat, P. P., Freed, J. H., & Eliezer, D. (2008).

- Membrane-bound α -synuclein forms an extended helix: Long-distance pulsed ESR measurements using vesicles, bicelles, and rodlike micelles. *Journal of the American Chemical Society*, *130*(39), 12856–12857. <https://doi.org/10.1021/ja804517m>
- Ghio, S., Kamp, F., Cauchi, R., Giese, A., & Vassallo, N. (2016a). Interaction of α -synuclein with biomembranes in Parkinson's disease - Role of cardiolipin. *Progress in Lipid Research*, *61*, 73–82. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2015.10.005>
- Ghio, S., Kamp, F., Cauchi, R., Giese, A., & Vassallo, N. (2016b). Interaction of α -synuclein with biomembranes in Parkinson's disease - Role of cardiolipin. *Progress in Lipid Research*, *61*, 73–82. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2015.10.005>
- Hurtado, F., Cardenas, M. A. N., Cardenas, F., & León, L. A. (2016). La enfermedad de Parkinson: Etiología, tratamientos y factores preventivos. *Universitas Psychologica*, *15*(5). <https://doi.org/10.11144/Javeriana.upsy15-5.epet>
- Klingenberg, M. (2009). Cardiolipin and mitochondrial carriers. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, *1788*(10), 2048–2058. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2009.06.007>
- Kruger, R., W. Kuhn, T. Muller, D. Woitalla, M. Graeber, S. Kosel, H. Przuntek, J. T. Epplen, L., & Riess, S. and O. (1998). © 1998 Nature Publishing Group <http://www.nature.com/naturegenetics>. *Nature Genetics*, *10*, 106–108. <https://doi.org/10.1002/asi>
- Kumudini, N., Uma, A., Prameela Devi, Y., Mohammad Naushad, S., Mridula, R., Borgohain, R., & Kumar Kutala, V. (2014). Association of Parkinson's disease with altered serum levels of lead and transition metals among South Indian subjects. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*, *51*(2), 121–126.
- Lai, Y., Kim, S., Varkey, J., Lou, X. C., Song, J. K., Diao, J. J., ... Shin, Y. K. (2014). Nonaggregated alpha-Synuclein Influences SNARE-Dependent Vesicle Docking via Membrane Binding. *Biochemistry*, *53*(24), 3889–3896. <https://doi.org/10.1021/bi5002536>

- Lee, H. J., Khoshaghideh, F., Lee, S., & Lee, S. J. (2006). Impairment of microtubule-dependent trafficking by overexpression of α -synuclein. *European Journal of Neuroscience*, 24(11), 3153–3162. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.05210.x>
- Lorenzen, N., Lemminger, L., Pedersen, J. N., Nielsen, S. B., & Otzen, D. E. (2014). The N-terminus of α -synuclein is essential for both monomeric and oligomeric interactions with membranes. *FEBS Letters*, 588(3), 497–502. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.12.015>
- Lotharius, J., & Brundin, P. (2002). Pathogenesis of parkinson's disease: Dopamine, vesicles and α -synuclein. *Nature Reviews Neuroscience*, 3(12), 932–942. <https://doi.org/10.1038/nrn983>
- Lucía, N., Pedraza, V., Montes, A. C., Condado, D. M., Hernández, B. G., & González-horta, A. (2014). Palabras clave: alfa-sinucleína * interacción lípido-oligómero * permeabilización, 48(4).
- Ludtmann, M. H. R., Angelova, P. R., Horrocks, M. H., Choi, M. L., Rodrigues, M., Baev, A. Y., ... Gandhi, S. (2018). α -synuclein oligomers interact with ATP synthase and open the permeability transition pore in Parkinson's disease. *Nature Communications*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04422-2>
- Luth, E. S., Stavrovskaya, I. G., Bartels, T., Kristal, B. S., & Selkoe, D. J. (2014). Soluble, prefibrillar α -synuclein oligomers promote complex I-dependent, Ca²⁺-induced mitochondrial dysfunction. *Journal of Biological Chemistry*, 289(31), 21490–21507. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.545749>
- Maroteaux, L., Campanelli, J. T., & Scheller, R. H. (1988). Synuclein: a neuron-specific protein localized to the nucleus and presynaptic nerve terminal. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.08-08-02804.1988>
- Mileykovskaya, E., & Dowhan, W. (2014). Cardiolipin-dependent formation of mitochondrial respiratory supercomplexes. *Chemistry and Physics of Lipids*, 179, 42–48. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2013.10.012>

- Nakamura, K., Nemani, V. M., Azarbal, F., Skibinski, G., Levy, J. M., Egami, K., ... Edwards, R. H. (2011). Direct membrane association drives mitochondrial fission by the Parkinson disease-associated protein α -synuclein. *Journal of Biological Chemistry*, 286(23), 20710–20726. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.213538>
- Nemani, V. M., Lu, W., Berge, V., Nakamura, K., Onoa, B., Lee, M. K., ... Edwards, R. H. (2010). Increased Expression of α -Synuclein Reduces Neurotransmitter Release by Inhibiting Synaptic Vesicle Reclustering after Endocytosis. *Neuron*, 65(1), 66–79. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.12.023>
- Nichols-Smith, S., Teh, S. Y., & Kuhl, T. L. (2004). Thermodynamic and mechanical properties of model mitochondrial membranes. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1663(1–2), 82–88. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2004.02.002>
- O’Keeffe, F. E., Scott, S. A., Tyers, P., O’Keeffe, G. W., Dalley, J. W., Zufferey, R., & Caldwell, M. A. (2008). Induction of A9 dopaminergic neurons from neural stem cells improves motor function in an animal model of Parkinson’s disease. *Brain*, 131(3), 630–641. <https://doi.org/10.1093/brain/awm340>
- Pacelli, C., Giguère, N., Bourque, M. J., Lévesque, M., Slack, R. S., & Trudeau, L. É. (2015). Elevated Mitochondrial Bioenergetics and Axonal Arborization Size Are Key Contributors to the Vulnerability of Dopamine Neurons. *Current Biology*, 25(18), 2349–2360. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.07.050>
- Parihar, M. S., Parihar, A., Fujita, M., Hashimoto, M., & Ghafourifar, P. (2009). Alpha-synuclein overexpression and aggregation exacerbates impairment of mitochondrial functions by augmenting oxidative stress in human neuroblastoma cells. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2009.05.008>
- Phan, J. A., Stokholm, K., Zareba-Paslawska, J., Jakobsen, S., Vang, K., Gjedde, A., ... Romero-Ramos, M. (2017). Early synaptic dysfunction induced by α -synuclein in a rat model of Parkinson’s disease. *Scientific Reports*, 7(1), 1–17. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06724-9>
- Reynolds, N. P., Soragni, A., Rabe, M., Verdes, D., Liverani, E., Handschin, S., ...

- Seeger, S. (2011). Mechanism of membrane interaction and disruption by α -synuclein. *Journal of the American Chemical Society*, *133*(48), 19366–19375. <https://doi.org/10.1021/ja2029848>
- Robotta, M., Gerding, H. R., Vogel, A., Hauser, K., Schildknecht, S., Karreman, C., ... Drescher, M. (2014). Alpha-synuclein binds to the inner membrane of mitochondria in an α -helical conformation. *ChemBioChem*, *15*(17), 2499–2502. <https://doi.org/10.1002/cbic.201402281>
- Robotta, M., Hintze, C., Schildknecht, S., Zijlstra, N., Jüngst, C., Karreman, C., ... Drescher, M. (2012). Locally resolved membrane binding affinity of the N-terminus of α -synuclein. *Biochemistry*, *51*(19), 3960–3962. <https://doi.org/10.1021/bi300357a>
- Rochet, J.-C., Fleming Outeiro, T., A. Conway, K., T. Ding, T., J. Voller, M., A. Lashuel, H., ... T. Lansbury Jr., P. (2004). Interactions Among α -Synuclein, Dopamine, and Biomembranes. *Journal of Molecular Neuroscience*, *4*(23), 23–33.
- Rockenstein, E., Nuber, S., Overk, C. R., Ubhi, K., Mante, M., Patrick, C., ... Masliah, E. (2014). Accumulation of oligomer-prone α -synuclein exacerbates synaptic and neuronal degeneration in vivo. *Brain*, *137*(5), 1496–1513. <https://doi.org/10.1093/brain/awu057>
- Ryan, T., Bamm, V. V., Stykel, M. G., Coackley, C. L., Humphries, K. M., Jamieson-Williams, R., ... Ryan, S. D. (2018). Cardiolipin exposure on the outer mitochondrial membrane modulates α -synuclein. *Nature Communications*, *9*(1), 1–17. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03241-9>
- Sawle, G. V., Bloomfield, P. M., Ourklund, A. B., Brooks, D. J., Brundin, P., Leenders, K. L., ... Frackowiak, R. S. J. (1992). Transplantation of fetal dopamine neurons in Parkinson's disease: PET ^{18}F -6-L-fluorodopa studies in two patients with putaminal implants. *Annals of Neurology*, *31*(2), 166–173. <https://doi.org/10.1002/ana.410310207>
- Schmid, A. W., Fauvet, B., Moniatte, M., & Lashuel, H. A. (2013). Alpha-synuclein Post-translational Modifications as Potential Biomarkers for Parkinson Disease and

- Other Synucleinopathies. *Molecular & Cellular Proteomics*, 12(12), 3543–3558.
<https://doi.org/10.1074/mcp.R113.032730>
- Shen, J., Du, T., Wang, X., Duan, C., Gao, G., Zhang, J., ... Yang, H. (2014). α -Synuclein Amino Terminus Regulates Mitochondrial Membrane Permeability. *Brain Research*, 1591(1), 14–26. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2014.09.046>
- Singleton, A. B., Farrer, M. J., & Bonifati, V. (2013). The genetics of Parkinson's disease: Progress and therapeutic implications. *Movement Disorders*, 28(1), 14–23. <https://doi.org/10.1002/mds.25249>
- Spillantini, M. G., Crowther, R. A., Jakes, R., Hasegawa, M., & Goedert, M. (1998). α -Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(11), 6469–6473. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.11.6469>
- Stefanovic, A. N. D., Stöckl, M. T., Claessens, M. M. A. E., & Subramaniam, V. (2014). α -Synuclein oligomers distinctively permeabilize complex model membranes. *FEBS Journal*, 281(12), 2838–2850. <https://doi.org/10.1111/febs.12824>
- Tosatto, L., Andrighetti, A. O., Plotegher, N., Antonini, V., Tessari, I., Ricci, L., ... Dalla Serra, M. (2012). Alpha-synuclein pore forming activity upon membrane association. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1818(11), 2876–2883. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2012.07.007>
- Trojanowski, J. Q., & Lee, V. M.-Y. (1998). Aggregation of Neurofilament and α -Synuclein Proteins in Lewy Bodies. *Archives of Neurology*, 55(2), 151. <https://doi.org/10.1001/archneur.55.2.151>
- Tsigelny, I. F., Sharikov, Y., Wrasidlo, W., Gonzalez, T., Desplats, P. A., Crews, L., ... Masliah, E. (2012). Role of α -synuclein penetration into the membrane in the mechanisms of oligomer pore formation. *FEBS Journal*, 279(6), 1000–1013. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2012.08489.x>
- van Rooijen, B. D., Claessens, M. M. A. E., & Subramaniam, V. (2008). Membrane binding of oligomeric α -synuclein depends on bilayer charge and packing. *FEBS*

- Letters*, 582(27), 3788–3792. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.10.009>
- van Rooijen, B. D., Claessens, M. M. A. E., & Subramaniam, V. (2009). Lipid bilayer disruption by oligomeric α -synuclein depends on bilayer charge and accessibility of the hydrophobic core. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1788(6), 1271–1278. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2009.03.010>
- van Rooijen, B. D., Claessens, M. M. A. E., & Subramaniam, V. (2010). Membrane permeabilization by oligomeric α -synuclein: In search of the mechanism. *PLoS ONE*, 5(12), 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014292>
- van Rooijen, B. D., van Leijenhorst-Groener, K. A., Claessens, M. M. A. E., & Subramaniam, V. (2009). Tryptophan Fluorescence Reveals Structural Features of α -Synuclein Oligomers. *Journal of Molecular Biology*, 394(5), 826–833. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.10.021>
- Volles, M. J., & Lansbury, P. T. (2002). Vesicle permeabilization by protofibrillar α -synuclein is sensitive to Parkinson's disease-linked mutations and occurs by a pore-like mechanism. *Biochemistry*, 41(14), 4595–4602. <https://doi.org/10.1021/bi0121353>
- Wang, C., Shah, N., Thakur, G., Zhou, F., & Leblanc, R. M. (2010). α -Synuclein in α -helical conformation at air-water interface: Implication of conformation and orientation changes during its accumulation/aggregation. *Chemical Communications*, 46(36), 6702–6704. <https://doi.org/10.1039/c0cc02098b>
- Winner, B., Kohl, Z., & Gage, F. H. (2011). Neurodegenerative disease and adult neurogenesis. *European Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2011.07613.x>
- Zaltieri, M., Grigoletto, J., Longhena, F., Navarria, L., Favero, G., Castrezzati, S., ... Bellucci, A. (2015). α -synuclein and synapsin III cooperatively regulate synaptic function in dopamine neurons. *Journal of Cell Science*, 128(13), 2231–2243. <https://doi.org/10.1242/jcs.157867>
- Zarranz, J. J., Alegre, J., Gómez-Esteban, J. C., Lezcano, E., Ros, R., Ampuero, I., ...

De Yebenes, J. G. (2004). The New Mutation, E46K, of α -Synuclein Causes Parkinson and Lewy Body Dementia. *Annals of Neurology*.
<https://doi.org/10.1002/ana.10795>

Zigoneanu, I. G., Yang, Y. J., Krois, A. S., Haque, M. E., & Pielak, G. J. (2012). Interaction of α -synuclein with vesicles that mimic mitochondrial membranes. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1818(3), 512–519.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2011.11.024>

10. RESUMEN BIOGRÁFICO

Exiquio Maldonado Vidaurri

Candidato para el Grado de

Doctorado en Ciencias con Orientación en Biotecnología

Tesis: EVALUACIÓN DE LA INTERACCIÓN DEL SEGMENTO N-TERMINAL DE LA PROTEÍNA NEURONAL ALFA-SINUCLEÍNA CON MODELOS DE MEMBRANA MITOCONDRIAL.

Campo de Estudio: Biotecnología

Datos Personales: Nacido en Nuevo Laredo, Tamaulipas el 13 de febrero de 1993, hijo de Exiquio Maldonado Vallejo y Silvia Vidaurri de Hoyos.

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Químico Bacteriólogo Parasitólogo en 2015.

Experiencia Profesional: Maestro por horas en la Facultad de Ciencias Biológicas y en la Facultad de Agronomía, desde el año 2019.

11. Anexos