



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Trabajo de Tesis Doctoral:

Enfermedad de Parkinson: Modificaciones Oxidativas y su Rol en la Toxicidad de α -Sinucleína

Tesista: Ezequiel Giménez

Director/a: Dr. Lisandro J. Falomir Lockhart

Año: 2022

El presente trabajo de Tesis, para optar al grado de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, fue realizado en el Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata (INIBIOLP) "Prof. Dr. Rodolfo R. Brenner", Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata, bajo la dirección del Dr. Lisandro J. Falomir Lockhart.

Reconocimiento

Al Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata (INIBIOLP) de la Facultad de Ciencias Médicas (FCM), Universidad Nacional de La Plata (UNLP), por haberme brindado el espacio y los medios para la ejecución de esta Tesis.

Al Instituto Max Planck de Ciencias Multidisciplinarias (anteriormente MPI de Biofísica Química, MPIbpc) de la ciudad de Göttingen, Alemania, por haberme abierto las puertas y permitirme realizar una estancia de investigación de gran importancia para el desarrollo de esta Tesis.

A las Instituciones que han financiado mi trabajo de investigación:

- Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)
- Universidad Nacional de La Plata (UNLP)
- Ministerio de Ciencia y Técnica (MinCyT)
- Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPyT)
- Fundación Bunge y Born
- Fundación Williams
- Organización Europea de Biología Molecular (EMBO)
- Fundación Boehringer Ingelheim

Agradecimientos

El desarrollo de una Tesis demanda trabajo, dedicación y esfuerzo, pero también es fundamental el acompañamiento, sacrificio y comprensión de la gente que a uno lo rodea. Es así que considero a esta Tesis, no como un trabajo individual, sino más bien un trabajo grupal y en equipo, en el que todos colaboraron para fuese posible. Es a ellos a quien quiero dedicarles este pequeño apartado.

A mi Director, Lisandro, por acompañarme, compartirme todo su conocimiento y brindarme la confianza necesaria para afrontar los desafíos que nos tocaron atravesar durante todos estos años.

A los miembros del antiguo Laboratorio 10 con quienes compartimos charlas y cervezas, haciendo que las frustraciones del doctorado sean más livianas. Particularmente a todo el grupo Neuro, que no la tuvimos fácil y aun así seguimos adelante. No puedo dejar de mencionar a Tincho, un gran amigo y consejero.

A los miembros del INIBIOLP que siempre que los necesité estuvieron disponibles para darme una mano. Mención especial a la gente del Altillo y el 3^{er} piso quienes me apoyaron e incluyeron como uno más de ellos en momentos de turbulencia e incertidumbre. Hoy somos una gran familia (de esas que uno elige) que trascendió las paredes de la FCM, y es fuente inagotable de encuentros, risas, fútbol y tantas cosas más que hacen bien al alma.

A mis minions, Anto y Jero, quienes me brindaron la posibilidad de acompañarlos en sus últimos pasos para conseguir sus títulos y desarrollar una faceta en mí hasta entonces desconocida.

A la cátedra de Biología, donde conocí gente maravillosa y descubrí una profesión hermosa a la cual aprendí a disfrutar.

A Tom, Donna y Henning, por su sabiduría, generosidad y guía constante en esa aventura que me sacó de mi zona de confort y me mando a Alemania sin escalas.

Al Grupo de Espectrometría de Masas del MPIbpc, en especial a Andreas, Iwan, Alex y Fanni, que me recibieron de la mejor manera, acompañaron e incluyeron en actividades dentro y fuera del laboratorio y me brindaron todo el apoyo que necesitaba estando a miles de kilómetros de casa.

A mis amigos de siempre, Los Magios, las nuevas amigas, las Magias y los peques que llegaron, que llenaron de hermosos momentos a una etapa que fue una montaña rusa de emociones.

A mi familia, mi hermano, tíos, abuelos y primos, los que están y no están, que siempre tuvieron una palabra de ánimo en esos momentos donde las fuerzas flaqueaban. También a mi segunda familia, a los Falomir, los Lockhart, los Falomir Lockhart y los Barral, todo esto también fue posible por ellos.

A Euge, mi gran compañera y sostén imprescindible, con la que caminamos juntos el sinuoso camino del doctorado y la vida. Sin vos, nada de esto hubiese sido posible. Te amo!

A mis viejos, motores indispensables del día a día que supieron acompañarme, comprenderme y apoyarme incondicionalmente desde siempre. Soy lo que soy gracias a ellos y es a quienes dedico este trabajo.

Índice

Abreviaturas y Nomenclatura	4
Resumen	5
Summary	7

Capítulo 1

1.1- Enfermedad de Parkinson: aspectos clínicos y factores de riesgo	10
1.2- Sinucleopatías	12
1.3- Estrés oxidativo y EP	13
1.4- α -Sinucleína	14
1.4.1- Estructura de aSyn	15
1.4.2- Localización, función y modificaciones postraduccionales de aSyn	18
1.5- Toxicidad de aSyn	20
1.6- aSyn: ¿Cuáles son las especies tóxicas?	22
1.6.1- Predisposiciones genéticas	23
1.6.2- Oligómeros, fibrillas y fibras maduras	23
1.6.3- PTM asociadas a ganancia de función tóxica	24

Capítulo 2

2.1- Hipótesis	31
2.2- Objetivos específicos	31

Capítulo 3

3.1- Reactivos y proteínas	34
3.2- Expresión y purificación de α -Sinucleína humana salvaje (aSyn wt)	34
3.3- Reacción de modificación foto-inducible	36
3.3.1- Entrecruzamiento y nitración de tirosina libre	36
3.3.2- Reacción de nitración foto-inducible en proteínas	37
3.3.3- Reacción de entrecruzamiento y nitración foto-inducible de aSyn	37
3.4- Espectroscopias UV-Visible y de fluorescencia	38
3.5- Preparación de fibras de aSyn	38
3.6- Preparación y caracterización de vesículas unilamelares pequeñas (SUV)	38
3.7- Análisis de interacción fotosensibilizador-SUV	39
3.8- Análisis por espectrometría de masas (MS)	40
3.7.1- Preparación de muestras, digestión y análisis por MS para proteínas modelo	40
3.8.2- Preparación de muestras, digestión y análisis por MS para aSyn	41
3.8.3- Análisis de datos de MS	41
3.9- Modelado molecular	44
3.10- Purificación de variantes de aSyn modificadas	45

3.11- Cultivo celular	45
3.12- Diferenciación de SH-SY5Y	46
3.13- Ensayo de viabilidad celular.....	46
3.14- Ensayo cinético de agregación	47
3.15- Estadística	47

Capítulo 4

4.1- Introducción	49
4.2- Modificación foto-inducible de Tirosina libre con Ru(bpy) ₃ Cl ₂	49
4.2.1- <i>La nitración de Tyr foto-inducible compite con la formación de DiTirocinas (DiTyr)</i>	49
4.2.2- <i>La eficiencia de las reacciones foto-inducibles es dependiente del pH</i>	52
4.2.3- <i>Buffer fosfato y baja concentración salina maximizan la nitración de Tyr</i>	53
4.2.4- <i>Los residuos Trp y Cys, pero no los aminoácidos polares, interfieren con las reacciones catalizadas por Ru(bpy)₃⁺²</i>	55
4.3- Nitración de proteínas	57
4.3.1- <i>La reacción de foto-nitración de proteínas es rápida y puede ser monitoreada por métodos espectroscópicos</i>	57
4.3.2- <i>La nitración de proteínas fue confirmada y cuantificada mediante espectrometría de masas</i>	59
4.3.3- <i>Características estructurales modulan el grado de nitración de residuos específicos</i>	64
4.3.4- <i>Modificaciones oxidativas secundarias del sistema foto-inducible</i>	70
4.4- Conclusión.....	73

Capítulo 5

5.1- Introducción	76
5.2- Modificación foto-inducible de aSyn libre en solución.....	76
5.2.1- <i>Las reacciones de foto-modificación de aSyn pueden ser caracterizadas por métodos espectroscópicos</i>	76
5.2.2- <i>Los entrecruzamientos entre Tyr del N- y C-terminal son los más favorables</i>	79
5.2.3- <i>Todos los residuos de Tyr son susceptibles a la nitración</i>	83
5.3- Efecto de la conformación de aSyn sobre la modificación de los residuos de Tyr	86
5.3.1- <i>La presencia de aSyn altera el tamaño de las vesículas</i>	86
5.3.2- <i>La modificación de aSyn está limitada en presencia de SUV</i>	88
5.3.3- <i>La restricción de la Y₃₉ en las fibrillas limita su modificación</i>	92
5.4- Conclusión	94

Capítulo 6

6.1- Introducción	97
6.2- Purificación de las variantes generadas por los métodos foto-inducibles	97
6.3- Efecto de las variantes de aSyn sobre la agregación.....	99
6.4- Efecto de las variantes de aSyn sobre las SUV	100

6.5- Análisis de la citotoxicidad de las variantes oxidadas de aSyn	102
6.5.1- <i>Tanto aSyn wt como sus variantes no muestran un efecto tóxico sobre células BV-2.</i>	102
6.5.2- <i>N-aSyn posee un efecto tóxico similar a aSyn wt en células SH-SY5Y diferenciadas, no así aSyn-XL</i>	104
6.6- Conclusión.....	106

Capítulo 7

7.1- Conclusiones generales.....	109
Bibliografía.....	114

Abreviaturas y Nomenclatura***NO₂**: Radical dióxido de nitrógeno**APS**: Persulfato de amonio**Arg, R**: L-Arginina**Asp, E**: Ácido L-Aspártico**aSyn XL**: α-Sinucleína entrecruzada**aSyn**: α-Sinucleína**CL**: Cardiolipina**C-term**: C-terminal**Cys, C**: L-Cisteína**DA**: Dopamina**DiTyr**: 3,3'-DiTirosina**DLB**: Demencia con cuerpo de Lewy**DLS**: Dispersión de Luz Dinámica**EP**: Enfermedad de Parkinson**EPC**: Fosfatidilcolina**ESI**: Ionización por *electrospray***GdH**: Glutamato deshidrogenasa**Glu, E**: Ácido L-Glutámico**HEWL**: Lisozima**His, H**: L-Histidina**I-FABP**: Proteína de unión a ácido graso intestinal**IPTG**: Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido**LB**: Cuerpos de Lewy**LC-MS/MS**: Cromatografía líquida acoplado a espectrometría de masas en tándem**LdH**: Lactato deshidrogenasa**LFQ**: Cuantificación libre de marca**LN**: Neuritas de Lewy**LPS**: Lipopolisacárido bacteriano**Lys, K**: L-Lisina**Met, M**: L-Metionina**MOPS**: Ácido 3-(N-Morfolino) propano sulfónico**MS**: Espectrometría de masas**MSA**: Atrofia Multisistémica**NAC**: Componente no amiloideo**NaNO₂**: Nitrito de sodio**N-aSyn**: α-Sinucleína nitrada**NitroTrp**: Nitro-Triptófano**NitroTyr**: 3-Nitro-Tirosina**N-term**: N-terminal**Phe, F**: L-Fenilalanina**PIC**: Entrecruzamiento foto-inducible**PICUP**: Entrecruzamiento foto-inducible de proteínas no modificadas**PS**: Fosfatidilserina**PTM**: Modificaciones postraduccionales**RA**: Ácido retinoico**RMR**: Grado de modificación de residuo**RNR**: Grado de nitración de residuo**RNS**: Especies reactivas de nitrógeno**ROS**: Especies reactivas de oxígeno**RSA**: Área relativa accesible al solvente**Ru(bpy)₃⁺²/ Ru(bpy)₃⁺³**: catión (+2)/(+3) tris (2,2'-bipiridina)-Rutenio(II)**Ru(bpy)₃Cl₂**: Cloruro de tris (2,2'-bipiridina)-Rutenio(II)**SASA**: Área accesible al solvente**SUV**: Vesículas unilamelares pequeñas**TioT**: Tioflavina T**Trp, W**: L-Triptófano**Tyr, Y**: L-Tirosina**Tyr[•]**: Radical Tiroxilo**WST-1**: 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolio**WST-8**: 2-(2-metoxi-4-nitrofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolio

Resumen

La Enfermedad de Parkinson (EP) se incluye dentro de un grupo de patologías neurodegenerativas conocidas como Sinucleopatías, cuya principal característica es la presencia de agregados amiloides de la proteína α -Sinucleína (aSyn). Se ha vinculado una ganancia de función tóxica por parte de aSyn con el desarrollo y progreso de la EP. Sin embargo, la identidad de las especies tóxicas de aSyn es aún desconocida. En este contexto, varias modificaciones postraduccionales (PTM) asociadas al estrés oxidativo podrían ser potenciales moduladores de la fisiopatología de aSyn en neuronas. Así, el presente trabajo se centra en la generación y caracterización de especies modificadas de aSyn en residuos de Tirosina (Tyr), con el propósito de dilucidar sus roles en la EP y otras Sinucleopatías.

Inicialmente, nos enfocamos en la optimización de las condiciones para la nitración y entrecruzamiento de Tyr libre por métodos fotoquímicos que usan Rutenio (II) Tris (bipiridina) como fotosensibilizador, incluyendo el análisis de reacciones secundarias y la interferencia de otros aminoácidos. Previo al empleo en aSyn, confirmamos la capacidad del método PICUP modificado para la nitración de proteínas modelo mediante técnicas espectroscópicas y espectrometría de masas.

Modificamos aSyn recombinante empleando los métodos foto-inducibles optimizados y caracterizamos las especies generadas por espectroscopia y espectrometría de masas. Se analizaron tres conformaciones alternativas: aSyn desordenada libre en solución, unida a vesículas unilamelares pequeñas (ricas en estructura de hélice), y formando parte de fibras amiloides (ricas en estructura $cross\text{-}\beta$). Los entrecruzamientos de aSyn libre en solución involucraron principalmente a Y₃₉ y residuos del C-terminal (Y₁₃₃ o Y₁₃₆). Por otro lado, todos los residuos de Tyr se identificaron como nitrados, siendo Y₁₂₅ el más susceptible a la nitración. Tanto al interaccionar con vesículas aniónicas, como cuando forma parte de agregados amiloides, la modificación de Y₃₉ se vio restringida. La nitración de residuos del C-terminal sólo se redujo en presencia de vesículas aniónicas, no así en el caso de los agregados. Estos resultados resaltan que la susceptibilidad de los residuos de Tyr a ser oxidados depende de su estado conformacional y de los componentes con los que interactúan, sugiriendo un mecanismo para la aparición de variantes con diferentes PTM y potenciales especies tóxicas.

Finalmente, las especies modificadas de aSyn se analizaron en términos de su capacidad de agregar, interaccionar con membranas y promover la citotoxicidad. Las especies nitradas y entrecruzadas no mostraron capacidad de agregar y bloquearon la tendencia a la agregación de la proteína sin modificar. Además, también se observó la alteración de la interacción con membranas. Por último, estas especies no exhibieron un comportamiento tóxico en células BV-2; por otro lado, la

variante nitrada resultó ser tóxica para las células SH-SY5Y diferenciadas, aunque no se observaron diferencias con respecto a la proteína sin modificar.

En conclusión, modificaciones particulares, como la nitración de Y₃₉ y el entrecruzamiento Y₃₉-Y_{133/136}, podrían ser responsables de cambios conformacionales y funcionales que lleven a la ganancia de función tóxica de aSyn. Si estas modificaciones pudiesen ser efectivamente correlacionadas con rasgos patológicos a nivel subcelular y/o con la progresión de la EP, su identificación en muestras biológicas complejas podría ser empleado para el desarrollo de herramientas innovadoras para el diagnóstico temprano de Sinucleopatías, su monitoreo, y la evaluación de la eficacia de potenciales tratamiento.

Summary

Parkinson's disease (PD) is included in a group of neurodegenerative pathologies known as Synucleinopathies, whose main feature is the presence of amyloid aggregates of α -Synuclein (aSyn). A gain of toxic function by aSyn has been largely linked to their development and progress. However, the identity of aSyn toxic species remains elusive. In this context, several oxidative stress related post-translational modifications (PTMs) could be possible modulators of the physiopathology of aSyn in neurons. Thus, the present work focuses on the generation and characterization of modified species of aSyn on Tyrosine (Tyr) residues in order to elucidate their specific role in PD and other Synucleinopathies.

Firstly, we center on the optimization of conditions for nitration and crosslinking of free Tyr amino acids by photochemical methods that uses Ruthenium (II) Tris (bipyridine) as photosensitizer, including the analysis of putative side reactions and interference by other amino acids. Previously to their application on aSyn, we confirmed the suitability of the modified PICUP method to nitrate different model proteins by spectroscopic techniques and mass spectrometry.

Recombinantly expressed aSyn was then modified employing the optimized photo-induced methods and characterized by spectroscopy and mass spectrometry. Three alternative conformations were analyzed: disordered aSyn free in solution, bound to small unilamellar vesicles (helix-rich structure), and amyloid fibril conformation (cross β -sheets). Tyr crosslinking of disordered aSyn mainly involved Y₃₉ and C-term residues Y₁₃₃ or Y₁₃₆. On the other hand, Tyr nitration were identified in all Tyr residues, being Y₁₂₅ the most nitrated residue with this photo-reaction. When bound to negatively charged vesicles, modification of Y₃₉ is highly restricted. Similar outcome was found in the fibrillar form. Nitration of C-term residues is only reduced when aSyn interacts with membranes with a negative net charged, not in the unstructured C-term in fibrils. These results highlight that susceptibility to oxidation of aSyn Tyr residues depends on its conformational state and its interacting partners, suggesting a mechanism for the appearance of variants with differential PTMs and putative toxic species.

Finally, the modified aSyn species were analyzed in terms of their ability to aggregate, interact with membranes and promote cytotoxicity. The nitrated and crosslinked species were not able to aggregate and impair aSyn wt aggregation propensity. Furthermore, membrane interaction is also altered in the presence of nitrated and crosslinked species. Finally, these species did not showed to be toxic for BV-2 cells; but, on the other hand, the nitrated species proved to reduce differentiated SH-SY5Y cells viability, although no differences were detected regarding aSyn wt.

In conclusion, particular modifications, such Y₃₉ nitration or Y₃₉-Y_{133/136} crosslinking, could be responsible for functional and conformational changes that lead to a gain of toxic function of aSyn. If these modifications could be effectively correlated with pathological subcellular features and/or PD

progression, their identification in complex biological samples could be employed for the development of innovative tools for the early diagnosis of Synucleopathies, their monitoring, and the efficacy evaluation of their treatment.

Capítulo 1

Introducción

1.1- Enfermedad de Parkinson: aspectos clínicos y factores de riesgo

La enfermedad de Parkinson (EP) es una patología neurodegenerativa, la segunda en importancia luego de la enfermedad de Alzheimer, afectando a más de 6 millones de personas a nivel mundial según la Fundación Michael J. Fox (<https://www.michaeljfox.org/>). Debido al aumento promedio de la expectativa de vida de la población, las proyecciones estiman que el número de individuos con EP será mayor a 9 millones para el 2030 [1]. Posee una prevalencia muy baja en personas por debajo de los 50 años (alrededor de 41/100000), aumentando progresivamente a partir de esa edad, desde 107/100000 en personas entre 50 y 59 años hasta 1087/100000 en la franja etaria de 70 a 79 [2]. Además, la prevalencia varía según etnicidad, geografía e incluso género, donde la EP es más común en varones que en mujeres en una proporción aproximada 3:2 [3]. A pesar de que numerosos genes se han asociado a formas familiares de la enfermedad, la mayoría de los casos son idiopáticos [4].

La EP fue descrita por primera vez en 1817 por James Parkinson y se caracteriza por la pérdida progresiva e irreversible de las neuronas dopaminérgicas de las *Susstantia Nigra pars compacta* y sus proyecciones al cuerpo estriado, lo que ocasiona los típicos síntomas motores: temblor en las extremidades, bradicinesia, inestabilidad postural y rigidez [5]. Sin embargo, actualmente se piensa que la neurodegeneración comenzaría décadas antes de los síntomas mencionados. Así, se han vinculado algunos síntomas no motores, como constipación, hiposmia y alteraciones del sueño, que formarían parte de un período pre-motor del proceso de neurodegeneración. Posteriormente, a medida que la enfermedad progresa se suman otros síntomas producto de la ingesta crónica de medicamentos y/o debido a que otras partes del cerebro se ven afectadas (**Fig. 1-1A**) [6]. En este sentido, Braak y col. propusieron 6 etapas de desarrollo de la EP de tipo idiopática, comenzando en el sistema nervioso periférico (potencialmente producto de factores medioambientales, toxinas, bacterias y/o virus), más precisamente en neuronas del sistema entérico y olfativas, para luego extenderse al sistema nervioso central vía el nervio vago y/o el sistema olfatorio (**Fig. 1-1B**) [7,8]. Las primeras 2 etapas corresponderían al período pre-motor, mientras que la aparición de los síntomas motores debido a la pérdida de neuronas dopaminérgicas podría asignarse a las etapas 3 y 4. Finalmente, las etapas 5 y 6 estarían asociados a síntomas no-motores de la enfermedad avanzada debido a que otras partes del cerebro, como el neocórtex, se encontrarían afectadas.

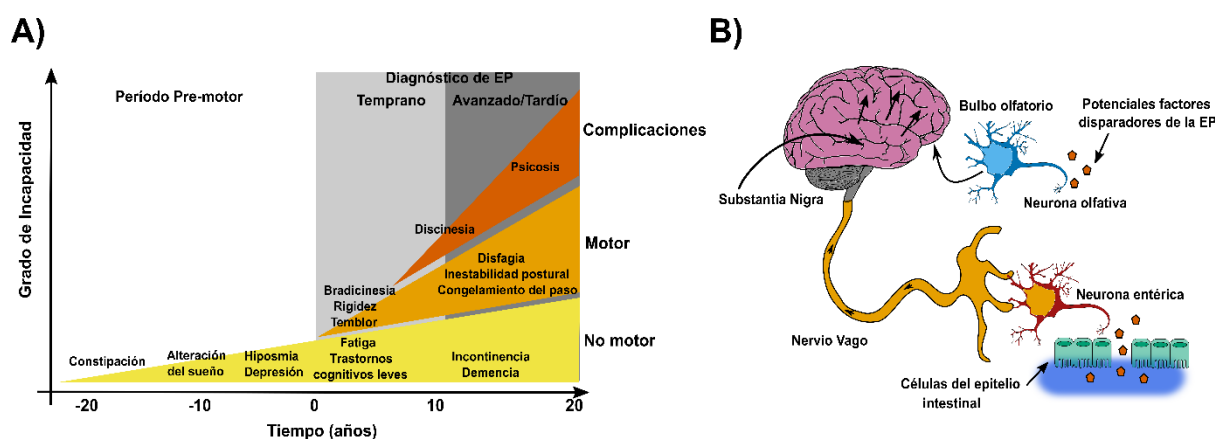


Figura 1-1. A) Síntomas y progresión de la EP: Al día de hoy se relacionan numerosos síntomas a la EP, incluso varios de ellos aparecerían décadas antes de los síntomas motores. En particular, la identificación y vinculación de síntomas no motores del “Período Pre-motor” podrían ser de vital importancia para futuros desarrollos de técnicas de diagnóstico y/o tratamiento (Modificado de [6]). **B) Hipótesis de Braak:** Según Braak y col., la neurodegeneración comenzaría en el sistema nervioso periférico (producto de factores que dispararían la enfermedad), más precisamente en neuronas entéricas y/u olfativas para luego afectar al sistema nervioso central, en sentido caudal-rostral (Modificado de [9]).

En ausencia de biomarcadores específicos que definan la enfermedad, el diagnóstico se realiza en base a la aparición de los síntomas motores y la respuesta a los fármacos anti-parkinsonianos. Actualmente, los tratamientos existentes tienen carácter paliativo y no revierten y/o retardan el proceso neurodegenerativo. Las estrategias más comunes actualmente implementadas incluyen la administración de fármacos que aumentan la concentración de dopamina (DA) intracerebral o estimulan a los receptores dopaminérgicos: levodopa, agonistas de DA, inhibidores de monoamina oxidasa B, entre otros [4]. Sin embargo, como consecuencia de la ingesta de estos fármacos, se han asociados diversos efectos adversos como náuseas, alucinaciones, trastornos obsesivo-compulsivos, incluso nuevos síntomas motores, como discinesias [4].

Múltiples factores de riesgo se han asociado al desarrollo de la EP, entre los que se incluyen, factores genéticos y ambientales, comorbilidades, ingesta de medicación, etc. Dentro de los factores medioambientales, se ha correlacionado la exposición a pesticidas, como rotenona y paraquat, con la aparición de síntomas parkinsonianos debido a que alteran la función mitocondrial y promueven la formación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno [10]. Síntomas similares se observaron también en individuos que consumieron la droga MPTP, cuya forma oxidada, MPP⁺, actúa como inhibidor de la cadena transportadora de electrones, produciendo especies reactivas, lo que evidencia la importancia del estrés oxidativo en las patologías neurodegenerativas [11]. Además, en un meta-análisis llevado a cabo por Noyce y col., se asociaron otros factores con un incremento en el riesgo de desarrollar EP, como la vida y trabajo rural, uso de beta bloqueantes, el consumo de agua de pozo y el daño cerebral [12]. También el consumo de productos lácteos y algunos tipos de cáncer, como melanomas, han sido asociados [13]. Sorpresivamente, se ha correlacionado una disminución en el riesgo con la ingesta de café, alcohol y tabaquismo, así como también, el aumento en la

concentración de ácido úrico sérico, el uso de fármacos antihipertensivos (bloqueantes de canales de calcio), antiinflamatorios no esteroideos (como ibuprofeno) y la actividad física [12–14].

Otro aspecto a destacar es la importancia de predisposiciones genéticas en el riesgo de desarrollar EP. Una mutación en el gen que codifica para α -Sinucleína (aSyn), *SNCA*, fue la primera en vincularse con formas heredables de EP [15]. Al día de hoy, múltiples mutaciones con herencia autosómica dominante se han identificado en el gen *SNCA*, así como también duplicaciones y triplicaciones génicas [6]. Además de *SNCA*, se han asociado múltiples genes distribuidos en 24 *loci* de relevancia clínica con un aumento en el riesgo de desarrollar EP [16]. Entre los más destacados se encuentran aquellos relacionados con formas monogénicas de EP con herencia autosómica dominante, como *LRKK2* (codifica para la proteína quinasa rica en repeticiones de leucina 2), y recesiva, como *Parkin*, *PINK1* y *DJ-1*, relacionados con el mantenimiento de la homeostasis mitocondrial. Otro gen importante es *GBA* que codifica para β -glucocerebrosidasa (proteína deficiente en la enfermedad de Gaucher), cuyas mutaciones se han relacionado con la aparición de síntomas motores del tipo parkinsoniano [17].

1.2- Sinucleopatías

La EP junto con la Demencia con Cuerpo de Lewy (DLB) y la Atrofia Multisistémica (MSA) conforman un grupo de patologías neurodegenerativas conocidas como Sinucleopatías, cuya característica histopatológica distintiva es la presencia de agregados lipoproteicos donde el componente proteico mayoritario es aSyn [18,19]. Estos agregados responden positivamente a la tinción específica de Rojo Congo y de Tioflavinas, indicando la presencia de agregados proteicos con estructuras amiloides. Particularmente EP y DLB presentan inclusiones citoplasmáticas en neuronas conocidos como cuerpos y neuritas de Lewy (LB y LN, de *Lewy Bodies* y *Lewy Neurites*), mientras que en el caso de MSA, los agregados se encuentran en oligodendrocitos, formando los cuerpos PAPP-Lantos [19]. Los principales síntomas de DLB son demencia acompañada de alucinaciones visuales, alteraciones de sueño y síntomas motores similares a los de EP, producto de la neurodegeneración nigroestriatal y neocortical [20]. Por otro lado, los síntomas relacionados a la MSA son variables, siendo el parkinsonismo, ataxia cerebelar y fallas en el sistema autónomo (particularmente a nivel urogenital y cardiovascular) los más comunes. Se identifican dos tipos de presentaciones motoras de MSA: MSA-P o con predominancia de parkinsonismo, y MSA-C o con predominancia cerebelar. En la primera predomina la degeneración nigroestriatal con ausencia de respuesta a levodopa; mientras que en la segunda, los oligodendrocitos olivopontocerebelares son los más afectados [21]. No se descarta que estas patologías sean distintas facetas de una misma enfermedad, cuya presentación depende de las células y tejidos afectados.

1.3- Estrés oxidativo y EP

Uno de los factores comunes en procesos neurodegenerativos es el estrés oxidativo, el cual surge de un desbalance donde las especies oxidantes prevalecen sobre los antioxidantes, promoviendo el daño molecular de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos [22]. A modo general, el origen de la mayoría de las especies reactivas de oxígeno (ROS) requiere la activación de oxígeno molecular (O_2). Estas especies se generan principalmente a nivel mitocondrial, y son usualmente productos secundarios fisiológicos del funcionamiento de la cadena transportadora de electrones y la generación de ATP. Entre las especies que pueden generarse, se encuentran el radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) [23]. El radical superóxido es altamente reactivo y es posteriormente reducido por Superóxido Dismutasas (SOD1 y SOD2) en H_2O_2 , el cual, a su vez, es convertido en H_2O por Peroxidasas, Peroxiredoxinas y, en los peroxisomas, por la Catalasa (en H_2O y O_2) [24]. La acumulación de especies reactivas en la EP y otras patologías neurodegenerativas producto de la desregulación del balance redox lleva a la aparición de otras especies, como el radical oxhidrilo ($\bullet OH$). Este radical puede surgir de la combinación de $O_2^{\bullet-}$ y H_2O_2 mediante la reacción de Haber-Weiss ($O_2^{\bullet-} + H_2O_2 \rightarrow O_2 + \bullet OH + OH^-$) o, en presencia Fe^{+2} , a través de la reacción de Fenton ($H_2O_2 + Fe^{+2} \rightarrow Fe^{+3} + \bullet OH + OH^-$) [23]. Otras especies importantes derivadas del O_2 incluyen a los radicales alcoxilo y peróxilo ($RO\bullet$ y $ROO\bullet$, respectivamente), entre los que se destacan el radical hidroperóxido ($HO_2\bullet$) y los surgidos durante las reacciones de peroxidación de lípidos ($LO\bullet$ y $LOO\bullet$) [23,25]. Por otro lado, el radical óxido nítrico ($\bullet NO$) se genera *in vivo* por Óxido Nítrico Sintetas y actúa en diversos procesos fisiológicos como la regulación de la presión sanguínea, la relajación de músculo liso, y en procesos inmunológicos, entre otros [26]. La sobreproducción de $\bullet NO$ genera el llamado estrés nitrosativo y la generación de especies reactivas de nitrógeno (RNS). En particular, la reacción entre $O_2^{\bullet-}$ y $\bullet NO$ produce el anión peroxinitrito ($ONOO^-$), un importante agente oxidante y nitrante, del cual deriva el radical dióxido de nitrógeno ($\bullet NO_2$). Otras fuentes de generación de $\bullet NO_2$ incluyen la reacción de hemo-peroxidasas, la descomposición ácida de ácido nitroso en el lumen gástrico y la reacción de NO_2^- y oxihemoglobina en los eritrocitos [27].

Existe abundante evidencia de que el estrés oxidativo cumpliría un rol central en el desarrollo de la EP con un origen relacionado a la disfunción mitocondrial, el metabolismo de catecolaminas y procesos neuroinflamatorios [28]. En este sentido, alteraciones de la cadena transportadora de electrones están directamente relacionadas con la desregulación del balance redox, la producción de ROS y RNS y, eventualmente, la aparición de síntomas de tipo parkinsonianos. Así lo demuestran los efectos producidos por rotenona, MPTP y su metabolito MPP⁺ (inhibidores del complejo I NADH deshidrogenasa) y paraquat [10,11]. Además, algunos genes mutados en las formas familiares de EP, se encuentran relacionados al mantenimiento de la homeostasis mitocondrial como *PINK1*, *DJ-1* y *Parkin* [29,30].

Por otro lado, la pérdida selectiva de neuronas dopaminérgicas en EP sugiere una conexión entre el proceso patológico y el metabolismo de las catecolaminas (particularmente DA). La DA es sintetizada a partir de Tirosina (Tyr) y es muy sensible a la oxidación. Para evitar esto, luego de su síntesis, es incorporada en vesículas pre-sinápticas por el transportador de monoaminas vesicular VMAT2 y retenida a expensas del mantenimiento de un gradiente de pH, con un continuo gasto de ATP. Luego de su liberación, DA es internalizada y reempaquetada por el transportador de membrana plasmática DAT y VMAT2, respectivamente. Por el contrario, la acumulación de DA en el citosol promueve su oxidación mediada por la enzima Monoamina Oxidasa A (MOA), generando DOPAL y otras quinonas, las cuales han sido vinculados con la modificación de proteínas (entre ellas aSyn) y la disfunción mitocondrial, aumentando la generación de especies reactivas [31,32].

Se cree que el proceso patológico de EP incluiría una etapa de propagación de la enfermedad de las células afectadas en primer término (neuronas dopaminérgicas) hacia las vecinas (neuroglía y neuronas no-dopaminérgicas), pero aún los mecanismos por los cuales esto ocurriría no están completamente definidos. Una de las hipótesis es la liberación de partículas tóxicas (oligómeros de aSyn o exosomas que los contengan, ver más adelante) que serían asimilados por microglía, astrocitos y/o neuronas sanas que ahora se verían afectadas [33,34]. Otra alternativa, no excluyente, sería la activación de un proceso inflamatorio, por parte de la microglía, asociado a la necrosis de las células dopaminérgicas que extendería el estrés oxidativo a células vecinas [35]. Así lo sugieren estudios con muestras de pacientes [36,37] y con modelos animales [38]. Además, la activación de enzimas como la NADPH oxidasa (NOX2) en la microglía podría generar un ambiente tóxico para células vecinas, no sólo a través de la producción de ROS extracelular, sino también amplificando la respuesta pro-inflamatoria, lo que podría colaborar con la progresión de la EP y otras enfermedades neurodegenerativas [39].

1.4- α -Sinucleína

Es una pequeña proteína citoplasmática perteneciente a la familia de las sinucleínas. Las primeras proteínas de esta familia, cuyo nombre deriva de su localización subcelular originalmente descrita (núcleo y terminal pre-sináptica), fueron identificadas en neuronas de raya eléctrica del Pacífico (*Torpedo californica*) y rata (*Rattus norvegicus*) [40,41]. Posteriormente se encontraron las sinucleínas humanas que constituyen una familia compuesta por las variantes α , β [42] y γ (cuyo gen fue originalmente denominada *BCSG1*, por *Breast Cancer Specific Gene 1*) [43].

Actualmente se conoce que los genes que codifican para estas proteínas están ubicados en los cromosomas 4q21.3-q22 (*SNCA*, α), 5q35 (*SNCB*, β) y 10q23 (*SNCG*, γ) [44,45]. Particularmente, el gen *SNCA* está constituido por 5 exones codificantes (2-6) y un exón 5'-UTR. Producto del *splicing* alternativo de este gen, existen varias isoformas de aSyn, de las cuales, la forma predominante y

más abundante está compuesta por 140 aminoácidos (aSyn-140). Le siguen las isoformas aSyn-112 (delección del exón 5, aminoácidos 103-130), aSyn-126 (delección del exón 3, aminoácidos 41-54) y aSyn-98 (delección de los exones 3 y 5) [46,47]. Finalmente, recientemente se identificó una quinta isoforma, 41-aSyn, en la que la delección de los exones 3 y 4 genera la aparición de un codón de stop, formando un péptido truncado del N-terminal, conformado por 41 aminoácidos [48].

1.4.1- Estructura de aSyn

Según la secuencia primaria de la isoforma de 140 aminoácidos (**Fig. 1-2A**) presenta una masa molecular de 14460,16 Da y un punto isoelectrónico de 4,67. Además, se reconocen 3 dominios funcionales: la región N-terminal (1-60), rica en residuos de Lisina (Lys) e importante para la interacción con membranas fosfolipídicas; el dominio NAC (por componente no amiloideo β , 61-95), crucial para el proceso de agregación; y la región C-terminal (96-140), principalmente desordenada, rica en aminoácidos ácidos e importante para la interacción con metales, pequeñas moléculas y proteínas (**Fig. 1-2B**) [49]. Los primeros 2/3 de su secuencia consisten en una sucesión de segmentos repetidos imperfectos de 11 aminoácidos, que presentan la secuencia consenso "KTKEGV" (K(A)-T(A,V)-K(V)-E(Q,T)-G(Q)-V(A)). Estos segmentos, similares a los encontrados en apolipoproteínas, le confieren el carácter anfipático que explicaría su habilidad de interactuar con lípidos [9].

La conformación que adopta aSyn es un tema aún en debate. Estudios por resonancia magnética nuclear (NMR), dicroísmo circular (CD) y espectrometría de masas (MS) han mostrado que la proteína en solución acuosa adopta una estructura desordenada y de conformación extendida [50,51]. Recientemente se demostró que aSyn existe principalmente como monómero altamente dinámico y desordenado en células neuronales y no neuronales, aunque adoptando una estructura más compacta que en *buffer* [52]. Sin embargo, también se ha reportado que la conformación nativa de la proteína podría ser un tetrámero helicoidal, cuya desestabilización podría llevar a la agregación [53].

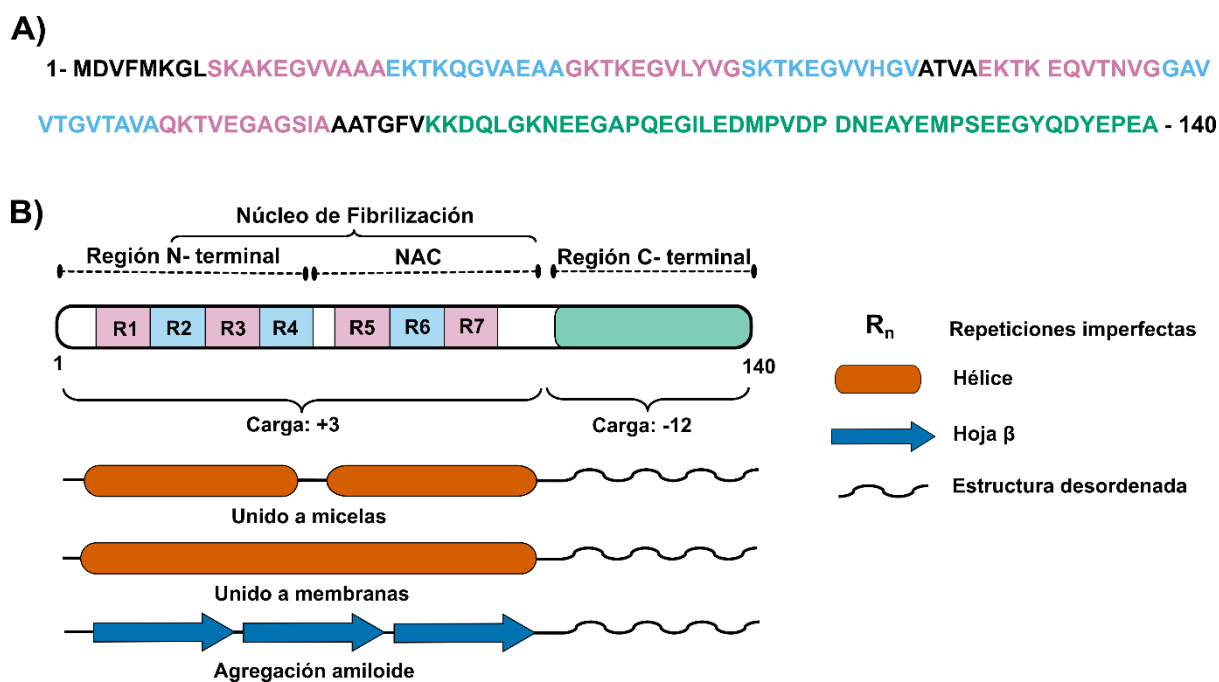


Figura 1-2. A) Secuencia aminoacídica de aSyn: en rosa y celeste se destacan las repeticiones imperfectas, mientras que en verde se señala la región C-terminal. **B) Diagrama de los dominios de aSyn y estructuras secundarias predominantes:** aSyn puede adoptar diferentes conformaciones de acuerdo al contexto. Así puede formar hélices en aproximadamente los primeros 2/3 de su estructura al interactuar con micelas y/o membranas, u hojas β al formar oligómeros amiloideos.

Independientemente de la estructura que adopte aSyn en condiciones fisiológicas, una de las características más importantes de esta proteína es su flexibilidad conformacional, lo que posibilita que aSyn adopte diferentes estructuras secundarias según interactúe con membranas, proteínas u otros componentes celulares (**Fig. 1-2B**). Así, aSyn, al interactuar con micelas de SDS, forma dos hélices antiparalelas anfipáticas de tipo 3/11 (aminoácidos V₃-V₃₇ y K₄₅-T₉₂) conectadas por una corta secuencia de 7 aminoácidos [54,55] (**Fig. 1-3A**). Mientras que al interactuar con membranas fosfolípídicas, en especial aquellas con una alta curvatura y abundancia de fosfolípidos ácidos [56], aSyn adopta una única hélice curvada extendida en la región comprendida hasta, al menos, el aminoácido A₉₀ [57]. En esta conformación, la hélice se extiende de forma paralela a la membrana de manera que los residuos cargados interactúan con las cabezas polares de los fosfolípidos, mientras que los residuos hidrofóbicos penetran en la región de las cadenas aciladas [57]. Más recientemente se identificó mediante NMR que los residuos L₆-G₂₅ forman una hélice determinante para el anclaje de aSyn a membranas, mínimamente afectada por la composición lipídica; mientras que la región central (V₂₆-K₉₇) exhibe flexibilidad estructural y actuaría como “sensor” que modularía la afinidad de aSyn por la membrana (**Fig. 1-3B**) [58]. En todos los casos, el C-terminal permanece desordenado.

Bajo condiciones patológicas, los monómeros de aSyn se auto ensamblan formando largas fibras amiloides ricas en hojas β , para lo cual la región NAC es determinante. Esto fue originalmente demostrado por Li y col. [59] y confirmado por el hecho de que β -Sinucleína, que en comparación

con aSyn no posee 11 aminoácidos (71-82) en la región NAC, no es capaz de agregar [60]. Estudios mediante proteólisis seguido de MS permitieron determinar que el núcleo de las fibras comprende los aminoácidos G₃₁-Q₁₀₉ [61], lo que incluye la región NAC y, parcialmente, el N- y C-terminal. Además, el análisis mediante NMR y resonancia paramagnética nuclear (EPR) estableció que las fibras están compuestas por protofilamentos (5 nm de diámetro cada uno), en los cuales el núcleo fibrilar de cada monómero está formado por hojas β paralelas en forma de serpentina, perpendicular al eje de las fibras [62–64].

Actualmente se reconoce que los núcleos fibrilares adoptan un motivo particular denominado *cross- β* , donde la interdigitación de las cadenas laterales de dos hojas β adyacentes forma, en el sentido longitudinal de la fibra, una estructura conocida como cremallera estérica amiloide (**Fig. 1-3C**) [65]. La estructura central de cada monómero (E₄₆-K₉₆) está compuesta por varias hojas β paralelas y en registro, estabilizadas por hetero-cremalleras estéricas, puentes salinos, una escalera de Glu e interacciones hidrofóbicas; flanqueados por segmentos N- y C-terminal menos estructurados [66]. Además, reconstrucciones mediante Crio-microscopía electrónica (Cryo-EM) y RMN mostraron que los residuos del corazón fibrilar pueden adoptar diferentes topologías que dan a lugar a variados polimorfismos. Entre ellas se destacan las topologías arco β curvado [67] y la llave griega [66,68,69], las cuales definen la morfología general de las fibras y su citotoxicidad.

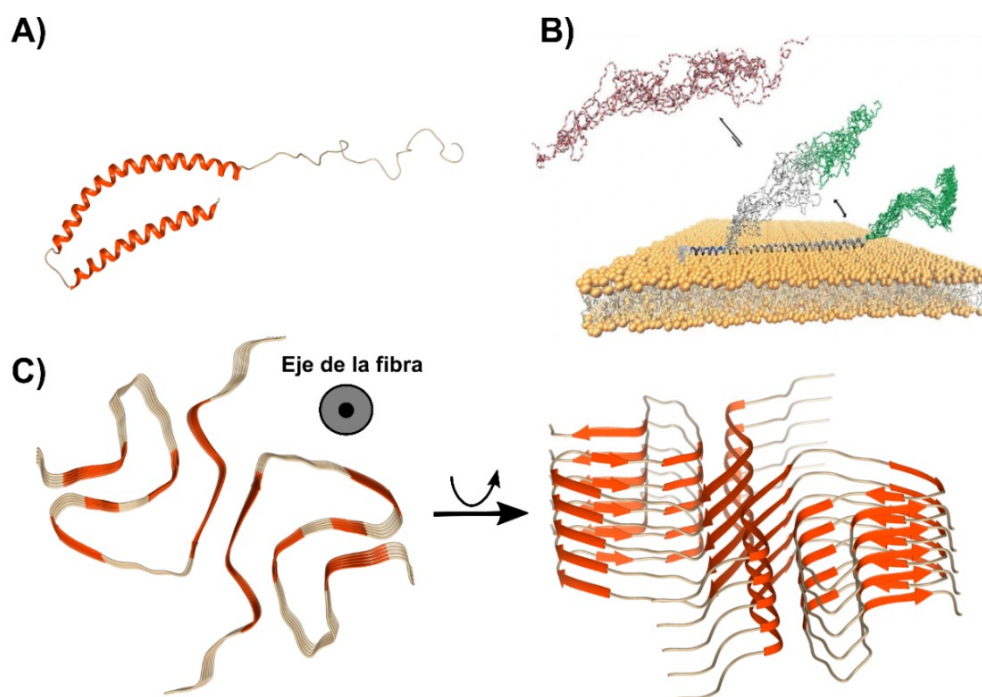


Figura 1-3. Conformaciones de aSyn. **A)** Estructura de NMR donde se observa las dos hélices anfipáticas de aSyn al interactuar con micelas (PDB 1XQ8). **B)** Estudio vía NMR de las transiciones de aSyn al interactuar con membranas fosfolipídicas, desde un estado desordenado hasta la adquisición de una hélice extendida, formada por los residuos K₆-K₉₇, con el C-terminal desordenado (Imagen de [58]). **C)** Sección de una fibra formada por dos protofilamentos obtenida por Cryo-EM, cada uno formado por 5 monómeros (121 aminoácidos), los cuales adoptan una estructura *cross- β* , donde las hojas β (en naranja) se disponen paralelamente en forma de serpentina (PDB 6H6B). Las estructuras se muestran de forma paralela y perpendicular al eje de la fibra, respectivamente.

1.4.2- Localización, función y modificaciones postraduccionales de aSyn

aSyn se expresa principalmente en el cerebro, particularmente en neocortex, hipocampo, cuerpo estriado, tálamo y cerebelo. Sin embargo su expresión no se limita al SNC, sino que también se la ha localizado en músculo, riñón, hígado, pulmón, corazón, testículos, vasos sanguíneos, líquido cefalorraquídeo, plasma, plaqueta, linfocitos y eritrocitos [70]. A nivel subcelular, la localización es aún tema de debate. Existe amplia evidencia de que aSyn está particularmente enriquecida en las terminales presinápticas, aunque también se encuentran estudios del rol de aSyn asociada a otras organelas y/o estructuras celulares. Así, como se mencionó anteriormente, aSyn se localiza en el núcleo celular. También habría cierta interacción con mitocondrias, retículo endoplasmático (RE), Golgi e incluso proteínas del citoesqueleto. Sin embargo, en estos casos, la localización de aSyn podría surgir de una distribución alterada producto de eventos patológicos [70].

Las funciones fisiológicas de aSyn aún no están completamente dilucidadas. Esto deriva de la complejidad que implica trabajar con aSyn debido a que 1) es una proteína intrínsecamente desordenada, 2) su sobreexpresión resulta tóxica tanto en modelos *in vitro* como *in vivo*, y 3) la potencial compensación producida por las isoformas β y γ en experimentos de *knockout* de aSyn [71]. Esto lleva a que las funciones descritas, algunas deducidas de los efectos nocivos producto de la sobreexpresión de aSyn, estén sujetas a constante discusión.

La gran mayoría de los trabajos publicados se centran en su posible rol en las terminales sinápticas, particularmente en el estudio de los mecanismos involucrados en la regulación de la actividad y plasticidad sináptica (mediante la liberación de neurotransmisores), el metabolismo de catecolaminas, el mantenimiento de los *pools* de vesículas y el tráfico vesicular (**Fig. 1-4**). Gracias a su habilidad de adoptar una estructura de hélice anfipática en los primeros 2/3 de su al asociarse con membranas fosfolipídicas, se ha reportado que aSyn tiene la capacidad de sensor y modular la curvatura vesículas sinápticas [72] e incluso se ha sugerido que podría tener actividad remodeladora mediante la modificación del empaquetamiento de los fosfolípidos [73].

Además de la unión ampliamente validada a vesículas fosfolipídicas, aSyn también interacciona con un amplio repertorio de proteínas pre-sinápticas. Se destacan las interacciones con las proteínas SNARE Sinaptobrevina-2 y VAMP2, actuando como chaperona para el correcto ensamblado de los complejos y promoviendo la fusión de las vesículas en la terminal sináptica [74]; con la proteína Rab3-GTP para la estabilización de la unión de aSyn con vesículas sinápticas [75]; la unión a la proteína Fosfatasa A2 y la regulación de la actividad de la Tirosina Hidroxilasa (TH), enzima involucrada en el paso limitante de la síntesis de DA [76]; y la regulación de transportadores monoaminas VMAT2 y DAT, importantes para la modulación de la homeostasis dopaminérgica [77,78]; entre otras.

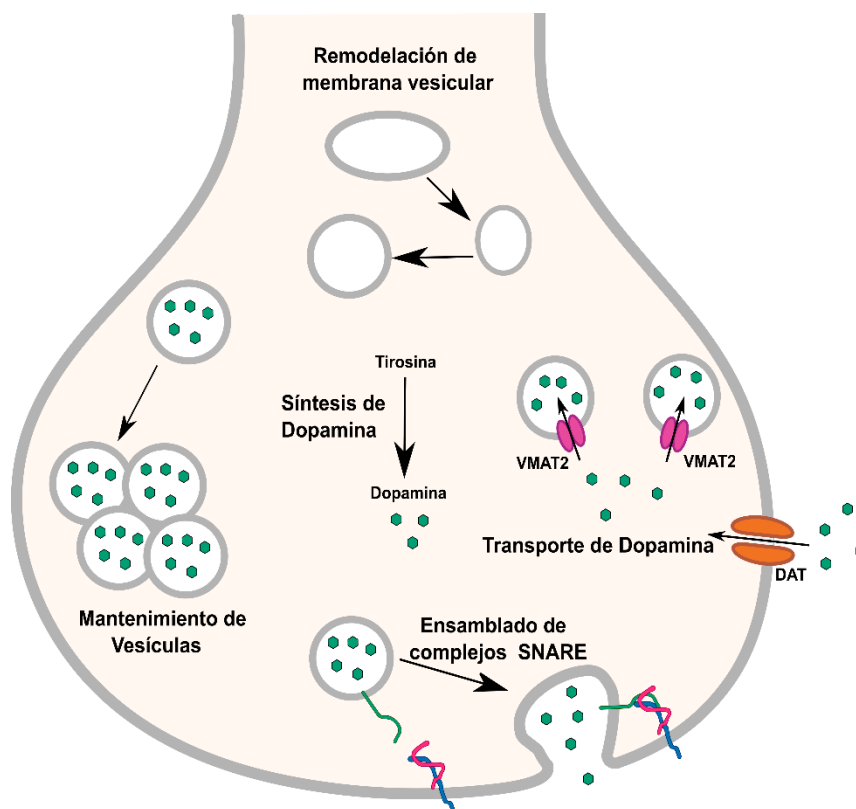


Figura 1-4. Funciones de aSyn. A pesar de que no han sido completamente dilucidadas, las funciones de aSyn a nivel de las terminales sinápticas estarían estrechamente relacionadas con su habilidad de unirse a membranas fosfolipídicas y a su interacción con proteínas sinápticas, regulando el tráfico vesicular, la liberación de neurotransmisores y el metabolismo de catecolaminas.

Por otro lado, las modificaciones postraduccionales (PTM) son importantes moduladores de la estructura y función de aSyn y, a pesar de que se reconoce que varias de ellas podrían estar relacionadas con procesos patológicos, algunas también cumplirían un rol fisiológico [79,80]. Una de las modificaciones mejor caracterizadas es la acetilación en su extremo N-terminal, la cual se presenta de forma constitutiva *in vivo* [81] y es determinante en relación a la interacción con membranas [82]. Estudios mediante NMR y CD demostraron que esta modificación no altera la unión de aSyn con membranas de alta carga negativa, pero incrementa la afinidad por membranas de composición biológica [83]. Además, existe evidencia de que la acetilación de los residuos K₆ y K₁₀ también es clave para modular la afinidad por los lípidos y que la actividad deacetilasa de Sirtuína 2 aumenta la propensión de aSyn a la agregación e incrementa su citotoxicidad [84]. Por otro lado, la fosforilación de ciertos residuos también podría cumplir un rol fisiológico, disminuyendo la afinidad por las membranas y modulando el tráfico vesicular y el metabolismo de DA [85]. Un aspecto importante que se ha comenzado a estudiar recientemente es la interacción entre distintas PTM de aSyn. Así se ha propuesto que la acetilación y la fosforilación podrían estar interrelacionadas y tener efectos opuestos respecto al control del metabolismo del hierro en neuronas dopaminérgicas, un cofactor esencial de la enzima Tirosina Hidroxilasa [85]. La desregulación de estas PTM llevaría a defectos en la homeostasis del hierro y, por ende, en la síntesis de DA, promoviendo el estrés

oxidativo y disminuyendo la capacidad sináptica, lo que favorecería la progresión de las Sinucleopatías.

La regulación de los procesos de degradación y exportación de proteínas también son determinantes para evitar la acumulación intracelular de aSyn. En este sentido, la ubiquitinación es una modificación en la que la proteína ubiquitina se une covalentemente a la proteína blanco, en presencia de las enzimas de Activación de Ubiquitina (E1), Conjugación de Ubiquitina (E2) y Ubiquitin Ligasa (E3). aSyn es principalmente ubiquitinada en los residuos K₂₁ y K₉₆ gracias a la E3 ligasa NEDD4, lo que la direcciona a degradación por vía lisosomal [86,87]. Las E3 ligasas CHIP y SIAH 1 y 2 también serían importante en la regulación de aSyn [86,88]. Particularmente se ha observado que las proteínas SIAH 1 y 2 pueden monoubiquitinar los residuos de Lys 10,12, 21, 23, 34, 43, y 96 y marcarla para la vía de degradación proteosomal [86]. Por otro lado, aSyn también puede ser modificada por la unión de la proteína SUMO, particularmente en K₉₆ y K₁₀₂ (aunque otras Lys también pueden ser modificadas), gracias a la actividad de SUMO ligasas (PIAS2, TRIM28 y hPc2) [89]. Aún no se comprende completamente el rol que cumple esta función, pero dado que la SUMOilación permite el empaquetado de aSyn en vesículas para exportación [33], se ha sugerido que podrían ayudar a la eliminación de aSyn vía exosomas.

1.5- Toxicidad de aSyn

A pesar de su función sináptica, la ganancia de función tóxica potencialmente le confiere a aSyn la habilidad de alterar numerosos procesos celulares y organelas, llevando a la degeneración y muerte celular. A continuación, se enumeran los efectos patológicos a nivel celular más importantes descritos para aSyn, los cuales, a su vez, son resumidos en la **Fig. 1-5**.

Sinapsis

A nivel de las terminales sinápticas, las especies oligoméricas de aSyn se unen a vesículas y a la proteína Sinaptobrevina-2, alterando la formación de los complejos SNARE e interrumpiendo tanto la fusión como la movilidad de vesículas, lo que consecuentemente disminuye la liberación de neurotransmisores [90,91]. A su vez, se ha demostrado que la sobreexpresión de aSyn provoca la reducción del *pool* de vesículas y el transporte de las mismas [92,93]. El metabolismo, liberación y reciclado de DA también se ven afectados por la actividad tóxica de aSyn. En este sentido, la modificación de la expresión aSyn en modelos de ratón mostró una anormal liberación de DA [94,95]. Así, aSyn altera la regulación de la actividad de las proteínas del metabolismo de DA, TH y AADC (Aminoácidos Aromáticos Descarboxilasa) [96,97], así como también la internalización de DA por parte de DAT [98].

Mitocondria

Se ha localizado aSyn en los 3 compartimientos principales de las mitocondrias: membrana interna y externa, y en la matriz mitocondrial. La acumulación y formación de oligómeros de aSyn inhibe la importación de proteínas mediante la interacción con TOM20 e interrumpe su interacción con TOM22 [99]. Además, la traslocación de aSyn a la matriz mitocondrial provoca una alteración en la respiración celular por inhibición del complejo I, la disminución de la producción de ATP y el consecuente aumento de generación de ROS [100–102]. En este contexto, el ADN mitocondrial también es afectado por el incremento del estrés oxidativo, lo que genera una retroalimentación negativa que afecta la actividad mitocondrial [103]. Adicionalmente, aSyn interfiere con los procesos de fusión y fisión, aumentando la fragmentación mitocondrial, e inhibiendo la mitofagia, así como también con su transporte [104].

Núcleo

Uno de los aspectos más importantes es la importación de aSyn al núcleo, la cual depende de su interacción con TRIM28 [105]. Una vez dentro, se ha sugerido que aSyn interactúa directamente con el ADN, modulando la expresión génica e induciendo daño en su estructura [106,107]. La interacción de aSyn con histonas acelera la formación de fibras [108], así como también inhibe la acetilación de histonas [109]; además de alterar la actividad de otras proteínas involucradas en la regulación epigenética, como Metiltransferasas y Deacetilasas [110].

RE/Golgi

La acumulación de aSyn en el RE interfiere con el plegado de proteínas, aumentando el estrés del RE, lo que induce la activación de la respuesta a proteínas mal plegadas a través de la vía IRE1 α /XBP1 [111,112]. La homeostasis del Ca⁺² también se ve afectada dado que agregados de aSyn pueden unirse a la bomba SERCA y disminuir la concentración de Ca⁺² citosólico [113]. Por otro lado, la sobreexpresión de aSyn provoca la alteración del tráfico entre el RE y el complejo de Golgi, mediante la alteración de la proteína Rab1, un factor clave en el transporte vesicular [114]. Recientemente también se demostró que aSyn afecta directamente al complejo de Golgi mediante la inducción de su fragmentación [115].

Sistema Endolisosomal

La acumulación de aSyn genera la alteración de los procesos de autofagia, afectando a las proteínas Rab1, lo que eventualmente deslocaliza la proteína ATG9 disminuyendo la formación de autofagosomas [116]. De hecho, aSyn se trasloca a los lisosomas para su degradación por la vía de autofagia mediada por chaperonas gracias a la unión con el receptor LAMP2A. Sin embargo, se ha demostrado que mutantes de aSyn bloquean este receptor, inhibiendo tanto su degradación como la

de otros sustratos [117]. Además, la sobreexpresión de aSyn provoca la reducción de la actividad de múltiples enzimas lisosomales, incluyendo la β -Glucocerebrosidasa [114,118].

Transporte axonal

Particularmente se observó que las fibras afectan el transporte de autofagosomas. Esto puede deberse a una disminución de proteínas motoras [119], así como también a una alteración en la estabilidad de los microtúbulos y la carga de las quinesinas [120]. La interacción de variantes de aSyn con tau, proteína que estabiliza y promueve la polimerización de microtúbulos, también podría influir en la regulación del transporte axonal [121].

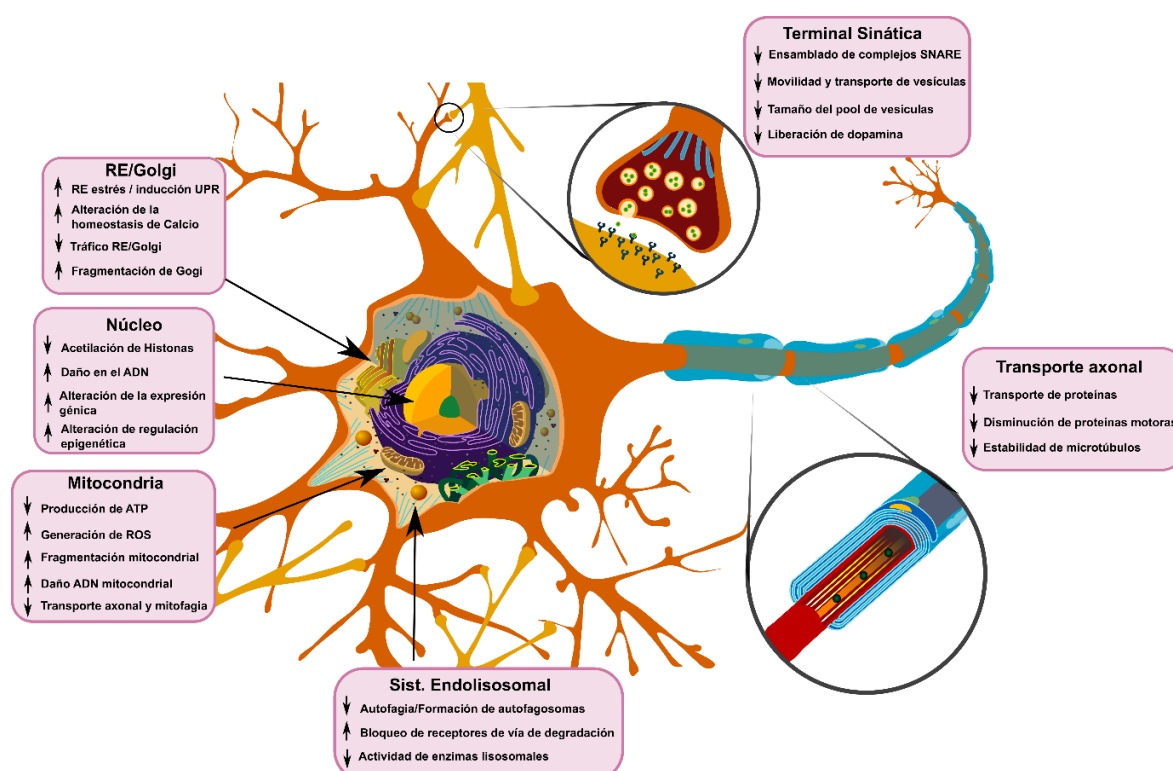


Figura 1-5. Efecto patológico de aSyn. Múltiples procesos y organelos se ven afectados en presencia de variantes de aSyn que alteran el normal funcionamiento de la célula y, eventualmente, producen la muerte de esta.

1.6- aSyn: ¿Cuáles son las especies tóxicas?

El hecho de que aSyn sea el componente mayoritario en los cuerpos de Lewy, tenga o no mutaciones con relevancia clínica, sugiere que esta proteína tiene un rol central en el desarrollo de la EP mediante la ganancia de función tóxica, a través de mecanismos aún desconocidos. La alteración de varios procesos celulares asociados a aSyn que involucran la homeostasis de proteínas y catecolaminas estarían directamente relacionados con la neurodegeneración, como son la actividad mitocondrial, el tráfico vesicular, el reciclado de proteínas, la liberación de DA y procesos

neuroinflamatorios (descritos en la sección anterior). En este contexto, la identidad de las especies tóxicas, tanto en presencia como en ausencia de mutaciones genéticas, es un tema de constante debate debido a la flexibilidad conformacional de aSyn y al gran número de modificaciones que puede sufrir esta proteína. A continuación, se detallan las variantes de aSyn que se cree que podrían modular su función y promover su toxicidad.

1.6.1- Predisposiciones genéticas

Tanto la EP como el resto de las Sinucleopatías son enfermedades multifactoriales en donde se reconoce la importancia de la confluencia de factores tanto genéticos como ambientales. A pesar de que la gran mayoría de los casos son idiopáticos, un gran número de mutaciones genéticas de aSyn se han asociado al desarrollo de la EP. Las primeras mutaciones puntuales en describirse fueron A30P, E46K y E53T, reportadas en familias alemanas, españolas y griego-italianas, respectivamente [122–124]. Al día de hoy se han reportado un total de 9 mutaciones familiares con un patrón de herencia autosómico dominante (A18T, A29S, A30P, E46K, H50Q, G51D, A53T, A53E y A53V), además de duplicaciones y una triplicación de la región del cromosoma 4 que incluye a *PARK1* (*SNCA*) [6,125,126]. Algunas de las mutaciones puntuales llevan a un desarrollo más temprano de la EP (A30P, E46K, G51D, A53E, A53T), mientras que A18T, A29S, H50Q y A53V llevan a una presentación típica en pacientes a partir de los 60 años [125–127].

Debido a que todas las mutaciones conocidas hasta el momento de aSyn se localizan en el dominio N-terminal (o la transición al dominio NAC), se las han asociados con cambios estructurales que impactan en los procesos de unión a membrana, oligomerización, agregación y citotoxicidad [127–130]. Estudios *in vitro* mostraron que E46K, A53T, A53V, y H50Q tienden a aumentar la formación de fibras maduras en comparación con aSyn salvaje (o *wild type*, wt), mientras que en el caso de A30P promueve una rápida oligomerización pero una lenta formación de fibras [130,131]. G51D y A53E, por su parte, retardan el proceso de agregación [130,132]. En relación a la unión con membranas, ensayos empleando CD, EPR y NMR reportaron que A30P y las mutantes de la posición 53, A53E y A53V, presentan una menor afinidad con membranas; mientras que los resultados obtenidos con A53T son variables, y E46K presenta una afinidad incrementada [129,130,133]. En conjunto, la alteración de los procesos de agregación y unión a membrana podrían ser los responsables de la ganancia de función tóxica por parte de estas variantes de aSyn, lo que podría favorecer el desarrollo de la EP.

1.6.2- Oligómeros, fibrillas y fibras maduras

Los niveles de aSyn en el SNC dependen del balance entre la velocidad de síntesis, agregación y la eliminación de aSyn. El desbalance de estos mecanismos puede resultar en una anormal acumulación de especies potencialmente tóxicas de aSyn. Existe un amplio número de

variantes de aSyn asociados a las Sinucleopatías, incluyendo oligómeros, protofibrillas o fibrillas, y fibras amiloides maduras (agregados) [49]. Los términos oligómero y protofibrilla incluyen un amplio rango de especies, desde variantes oligoméricas de bajo peso molecular (como dímeros, trímeros y tetrameros) hasta intermediarios de agregación de alto peso molecular con estructuras variadas (esféricas, anulares o en forma de cadena). Las fibras maduras, como se mencionó anteriormente, se caracterizan por la presencia de la estructuras *cross-β* en su núcleo, por presentar morfología polimórfica de tipo filamentosa (>1 μm de largo) y por su unión a Rojo Congo y Tioflavina T [49].

Una de las hipótesis que intenta explicar la capacidad de aSyn de alterar los componentes celulares y perturbar su homeostasis establece que esta proteína, en su forma oligomérica, podría aumentar la permeabilización de las membranas, ya sea mediante un rearrreglo de los fosfolípidos [134] o la formación de poros hidrofílicos [135]. Por otro lado, las fibras maduras de aSyn son el componente proteico principal de los Cuerpos de Lewy, la marca histopatológica distintiva de las Sinucleopatías, y se cree que la formación de las mismas sería un mecanismo de detoxificación para la conversión de intermediarios tóxicos (oligómeros y/o fibrillas) en estructuras más estables y menos nocivas [136]. Sin embargo, también se ha descrito que las fibras de aSyn alteran la permeabilización de las membranas [137], probablemente debido a su hidrofobicidad, resultando tóxicas en algunos modelos animales [138].

1.6.3- PTM asociadas a ganancia de función tóxica

Por otro lado, una fuente alternativa, pero no excluyente, de la ganancia de función tóxica de aSyn podría radicar en las numerosas PTM que modulan y alteran su estructura, influyendo en los procesos fisiológicos, de agregación y citotoxicidad (Fig. 1-6).

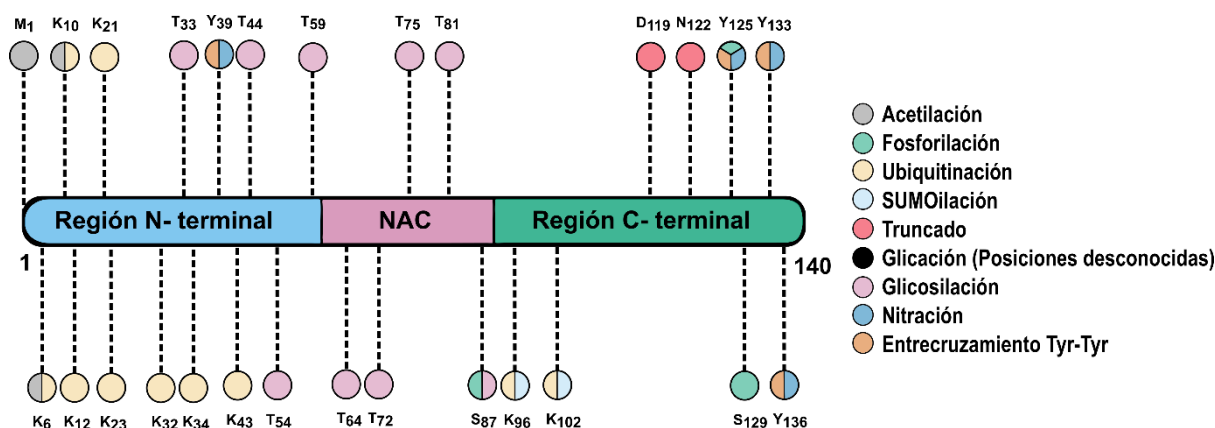


Figura 1-6. Principales PTM descritas en aSyn. Se reconocen varias modificaciones relacionadas con procesos fisiológicos, tal como la acetilación del N-terminal. Sin embargo, múltiples PTM podrían ser responsables de la ganancia de función tóxica de aSyn.

Fosforilación

La fosforilación es una modificación reversible que involucra la adición de un grupo fosfato a la cadena lateral de Ser, Thr o Tyr. En relación con aSyn, la fosforilación de la S₁₂₉ es una de las modificaciones más estudiadas. Particularmente, S₁₂₉ fosforilada se encuentra ampliamente enriquecida en los agregados de aSyn en LB de pacientes [81,139], lo que sugiere una conexión entre esta modificación y el desarrollo de las Sinucleopatías. Es así, que se ha postulado que esta modificación podría afectar la respuesta de proteínas mal plegadas en el RE, los procesos de degradación proteica, así como también el tráfico vesicular (disminuyendo la interacción de aSyn con membranas) y la actividad mitocondrial, aumentando la generación de ROS (Revisado por [140]). Sin embargo, existen numerosas discrepancias en relación a si esta modificación promueve, inhibe o no tiene efecto alguno sobre la agregación y toxicidad en modelos animales [141,142], las cuales podrían provenir de la incapacidad de reproducir experimentalmente el estado real de fosforilación de aSyn *in vivo* [80]. Existe evidencia de que la fosforilación de S₁₂₉ podría ser un evento tardío y ocurrir luego de la formación de los LB, principalmente por la actividad de varias quinasas como CK2, GRK5 y LRRK2 [80]. Independientemente de que la modificación de S₁₂₉ sea causa o consecuencia del proceso patológico, en los últimos años se ha consolidado como biomarcador de la EP dado que se ha encontrado esta modificación acumulada en líquido cefalorraquídeo, sistema nervioso periférico, tracto gastrointestinal y glóbulos rojos [143]. Por otro lado, otros residuos importantes que pueden ser fosforilados son S₈₇ e Y₁₂₅ y se ha propuesto que Y₁₃₃ e Y₁₃₆ también podrían ser blanco de fosforilación [140]. En el caso de la fosforilación de S₈₇, Oueslati y col. [144] mostraron que podría tener un rol protector, disminuyendo la agregación y la toxicidad neuronal; aunque también se la ha encontrado aumentada en modelos animales de Sinucleopatías [145]. En relación con la fosforilación de Y₁₂₅, Hejjaoui y col., a través del empleo de una estrategia de semisíntesis para la introducción de una modificación específica, mostraron que la fosforilación no altera la estructura monomérica ni la formación de hélice al interaccionar con membranas de POPG y micelas de SDS, así como tampoco la tendencia a agregación [146]. Por último, la relación entre la fosforilación Y₁₂₅ y S₁₂₉ podría ser importante en la regulación de la tendencia a la agregación y citotoxicidad de aSyn, como lo sugieren estudios en un modelo de EP de *Drosophila*, donde la fosforilación Y₁₂₅ tendría un efecto protector, contrario al rol de la fosforilación de S₁₂₉ [147].

Ubiquitinación y SUMOilación

A pesar de tener un aparente rol fisiológico, la ubiquitinación de residuos Lys en aSyn también podría estar relacionado con procesos patológicos. En este contexto, se ha encontrado aSyn modificada en LB, particularmente en los residuos de Lys de las posiciones 12, 21 y 23 [81], lo cual ha sido asociado con la actividad *in vivo* de la proteína E3 ligasa SIAH [148]. Así, la monoubiquitinación por parte de SIAH podría favorecer la agregación de aSyn [149], en

contraposición a lo mencionado anteriormente en relación al destino de aSyn monoubiquitada (ver sección 1.4.2). Por otro lado, la desregulación de proteínas desubiquitinasa, como Usp8, también tendría un efecto nocivo, impidiendo la degradación de aSyn y favoreciendo su acumulación y toxicidad [150].

De manera similar a lo discutido con la ubiquitinación, la SUMOilación podría tener implicancias en el desarrollo de la EP, inhibiendo la agregación de aSyn y promoviendo su citotoxicidad [151]. Además, podría modular su translocación a núcleo, gracias a la SUMO ligasa TRIM28, también favoreciendo su acumulación y toxicidad [105]. Por otro lado, la actividad SUMO ligasa de PIAS2 reduce la ubiquitinación por parte de SIAH2 y Nedd4, afectando el proceso de degradación de aSyn y promoviendo su acumulación y agregación [152]. Más interesante aún es la posibilidad de que la SUMOilación de aSyn promueva su exportación en exosomas, lo que sería una posible vía de escape de especies tóxicas que extenderían la patología a células vecinas y demás regiones del SNC [33].

Truncado

Las formas truncadas de aSyn se encuentran de forma ubicua en LB y se cree que son producto de proteólisis anormal en el C-terminal de la proteína. Originalmente se identificaron 5 sitios de clivado principales por MS: D₁₁₅, D₁₁₉, N₁₂₂, Y₁₃₃ y D₁₃₅ [81]. Mediante MS, mapeo de epítopes y/o el uso de anticuerpos específicos, al día de hoy se han identificado, en muestras de pacientes con Sinucleopatías, múltiples formas truncadas en el C-terminal finalizando en los residuos 103, 110, 113, 114, 115, 119, 122, 124, 125, 133, y 135; así como también formas truncadas en el N-terminal como en las posiciones 5, 10, 18, 19, y 68 (Revisado por [153]). Entre ellas, las formas más abundantes son 1-119 y 1-122. A pesar de que se han encontrado varias isoformas truncadas tanto en cerebros sanos como enfermos, estas están enriquecidas en los últimos [154]. Además, está establecido que las formas truncadas aumentan ampliamente la tendencia de aSyn a formar agregados [155]. Es así que se ha hipotetizado que las formas truncadas podrían actuar como semillas para iniciar los eventos de nucleación que lleva a la agregación amiloide de aSyn wt [156], de manera similar a una proteína priónica.

En condiciones fisiológicas, las formas truncadas son generadas y eliminadas por vía lisosomal, lo que ha llevado a sugerir que la acumulación de estas formas deriva de la alteración de esta vía de degradación de proteínas [157]. En este sentido, numerosas proteasas se han asociado a la generación de variantes truncadas: calpaína I, caspasa I, neurosina, catepsinas y metaloproteasas, entre otras; las cuales podrían estar relacionadas con el desarrollo de Sinucleopatías dado que se las ha encontrado también en LB (Revisado por [153]).

Glicación y Glicosilación

La desregulación del metabolismo de la glucosa puede llevar a la modificación de aminoácidos, generando productos tempranos de glicación (a través de la reacción de Maillard) y, eventualmente, productos finales de glicación (AGE), especies ricas en grupos carbonilo que impactan en la estructura y función de las proteínas. En particular, se han asociado altos niveles de AGE en pacientes con Sinucleopatías [158]. En este contexto, no es sorprendente que se considere a la diabetes como factor de riesgo de la EP [159]. Entre los agentes de glicación se destaca el metilglioxal (MGO), el cual puede modificar residuos de Arg y Lys. Así, se determinó que la glicación de aSyn por MGO afecta la región N-terminal, reduciendo la unión a membrana y su ubiquitinación, con lo que evita su degradación y promueve la acumulación de oligómeros que alteran la transmisión sináptica [158].

La aSyn puede sufrir también la glicosilación de residuos de Thr, mediante la incorporación enzimática de N-Acetilglucosamina. Se han detectado múltiples residuos de Thr modificados (33, 44, 54, 59, 64, 72, 75, 81, y 87) derivados de muestras de pacientes con Sinucleopatías y modelos animales (Revisado por [143]). Se observó que la modificación de ciertos residuos de Thr puede inhibir la formación de agregados, con lo que la pérdida de esta modificación podría ser un factor que podría promover el desarrollo de la EP [160]. Sin embargo, Zhang y col. mostraron que el bloqueo de la agregación viene acompañado de la formación de oligómeros SDS-resistentes, lo que podría aumentar la toxicidad de aSyn [161].

Oxidación: Nitración y Entrecruzamiento Tyr-Tyr

In vivo, la oxidación de residuos de Tyr está mediada por reacciones con radicales libres. Como primer paso, una amplia variedad de agentes oxidantes (X^\bullet) derivados del estrés oxidativo, tales como los radicales CO_3^\bullet , $\bullet OH$ y $\bullet NO_2$, así como también radicales alcoxilo y peroxilo lipídicos (LO^\bullet y LOO^\bullet), promueven la oxidación de Tyr (y la pérdida de un átomo de H) para producir radicales Tiroxilo (Tyr^\bullet). La neutralización de esta última especie genera variantes oxidadas de este aminoácido. Por un lado, la reacción con $\bullet NO_2$ provoca la adición de un grupo $-NO_2$ en la posición 3 del anillo fenólico, resultando en la formación de 3-NitroTyr (NitroTyr). Otra reacción que puede ocurrir en simultáneo es la neutralización de 2 radicales Tyr^\bullet para generar la especie DiTiroxina (DiTyr), producto del entrecruzamiento covalente 3-3'-Tyr-Tyr. Por último, también es posible la hidroxilación de Tyr mediante la reacción entre los radicales Tyr^\bullet y $\bullet OH$ para generar la especie 3,4-dihidroxifenilalanina (DOPA) [27]. Tanto la nitración de residuos de Tyr como los entrecruzamientos Tyr-Tyr en aSyn se identificaron en inclusiones citoplasmáticas de pacientes con Sinucleopatías [162–164]. Así, estas modificaciones han sido directamente vinculados con la EP y han sido propuestos como potenciales biomarcadores de Sinucleopatías [164,165]. Además, formas nitradas

de aSyn también se han detectado en suero y en células mononucleares de sangre periférica en pacientes con EP [166,167], lo que facilitaría su detección mediante herramientas de diagnóstico.

aSyn posee 4 residuos de Tyr, uno ubicado en el N-terminal (Y₃₉) y los restantes en el C-terminal (residuos 125, 133 y 136), todos susceptibles a la nitración [168]. Los resultados obtenidos del estudio de la agregación de especies nitradas son altamente dependientes del sistema de oxidación. Así, Hodara y colaboradores reportaron que los monómeros y dímeros de aSyn nitrados obtenidos mediante reacción con peroxinitrito, promueven la agregación de aSyn wt, no así los oligómeros unidos de forma covalente [169]. Mientras que en el caso del uso de tetranitrometano para la reacción de modificación se generan especies que inhiben la agregación de aSyn wt [170]. Por otro lado, ambos estudios coinciden en que los monómeros nitrados purificados no generan fibras maduras [169,170], probablemente debido a la formación de intermediarios de agregación estables, ya que la incorporación de un grupo -NO₂ genera cambios estructurales, permitiendo a aSyn plegarse parcialmente [170]. Sin embargo, estudios más recientes empleando la incorporación sitio específica de residuos de Tyr modificados mostraron que la nitración de Y₃₉ e Y₁₂₅ no inhibe la formación de fibras, aunque presenta menor tendencia a agregar que aSyn wt [168]. Por otro lado, la habilidad de interactuar con membranas por parte de aSyn nitrada también se ve afectada. Particularmente, la nitración de Y₃₉ disminuye la tendencia de aSyn de adoptar una estructura de hélice, alterando la interacción con vesículas [168,169]. Además, la disminución del pK_a del anillo fenólico por incorporación del grupo -NO₂ (de 10 a ~7,3) le confiere a la NitroTyr una carga parcial negativa a pH neutro, lo que podría disminuir la interacción con vesículas cargadas negativamente debido al aumento de repulsión electrostática [171]. Asimismo, la nitración de los residuos del C-terminal también podrían influir negativamente en la afinidad por membranas [171]. Por otro lado, Trostchansky y colaboradores demostraron que la interacción de aSyn con vesículas la protege de la nitración, en comparación con la modificación de la proteína libre en solución [172].

En sintonía a lo anteriormente expuesto, la generación de radicales libres *in vivo* puede provenir de diversas fuentes. Es así que el exceso de la producción de H₂O₂ por parte de la enzima Monoamina Oxidasa B se ha vinculado con el aumento en los niveles de nitración de aSyn, particularmente de Y₃₉ [173]. Asimismo, los procesos neuroinflamatorios por parte de la microglía también son característicos en enfermedades neurodegenerativas y se ha sugerido que la producción de especies reactivas como NO y O₂^{•-} podrían ser mediadores de la modificación de aSyn y la progresión de la EP [174]. Así, el aumento en la producción de NO por la enzima iNOS promueve la formación de peroxinitrito a partir de la reacción entre NO y O₂^{•-}, cuyo impacto sobre el grado de nitración de aSyn fue demostrado por Stone y col. mediante la sobreexpresión de iNOS [175]. Además, Reynolds y col. demostraron que la variante nitrada de aSyn activa a la microglía, estimulando la producción de factores neuroinflamatorios que promueven la muerte de células dopaminérgicas [176]. Por otro lado, se demostró que variantes nitradas de aSyn tienen un efecto

nocivo tanto a nivel de cultivo celular (SH-SY5Y y cultivo primario de neuronas) como en modelos animales, produciendo síntomas motores similares a los observados en la EP [177].

Tanto en modelos *in vitro* como como *in vivo*, se observa que aSyn también puede sufrir el entrecruzamiento de sus residuos de Tyr, los cuales además han sido identificados en LB [164]. *In vivo*, esta modificación puede derivar de múltiples escenarios que fomentan la formación de radicales Tiroxilo, como la reacción con radicales libres y peroxidasas (Citocromo C), la interacción con metales divalentes (Cu^{+2}), como producto derivado de la oxidación de catecolaminas, etc. [178]. A pesar de que es una de las variantes menos estudiadas, esta modificación oxidativa ocurre de manera simultánea con la nitración de Tyr [179,180]. En este sentido, se ha demostrado que oligómeros covalentes nitrados poseen efecto tóxico sobre células SH-SY5Y [181]. Por otro lado, gracias la generación específica *in vitro* por métodos fotoquímicos, se determinó que variantes entrecruzadas de aSyn poseen mayor efecto citotóxico en comparación con la aSyn wt [182]. De igual manera a lo expuesto para la nitración de aSyn, el efecto observado de las variantes entrecruzadas sobre la agregación *in vitro* es dependiente del método de oxidación empleado. Así, por un lado existe evidencia de que las variantes entrecruzadas pueden inhibir la formación de agregados y estabilizar intermediarios de agregación [182,183]. En relación a esto, la oxidación de agregados fibrilares y consecuente formación de entrecruzamientos Tyr-Tyr, genera el efecto opuesto de la modificación de monómeros, lo que podría prevenir su degradación y promover la agregación [184]. Sin embargo, también existen estudios que indican que la formación de oligómeros covalentes también podrían fomentar la generación de fibras maduras [164].

Capítulo 2

Hipótesis y Objetivos

2.1- Hipótesis

La EP es una patología multigénica y multifactorial con amplios espectros de presentación clínica, cuyos tratamientos son simplemente paliativos y el diagnóstico se realiza a partir de la aparición de síntomas motores y la respuesta a fármacos antiparkinsonianos (como la levodopa). Aunque se han identificado varios genes asociados a esta enfermedad, la mayoría de los casos son considerados idiopáticos o esporádicos. En todos los casos se reconoce una fuerte influencia de agentes exógenos que, generalmente, desencadenan fallas mitocondriales o promueven una condición de estrés, como se observa en los casos de exposición a herbicidas o metales de transición. Tanto en la mayoría de los casos idiopáticos como familiares, la proteína aSyn no presenta generalmente alteraciones en su secuencia y, sin embargo, en algún punto del proceso patológico adquiere una función tóxica que mediaría y/o promovería el avance de la enfermedad. Las actividades tóxicas sugeridas para aSyn incluyen alteración de la función mitocondrial, aumento en la producción de o en la sensibilidad a especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ROS/RNS), alteraciones del tráfico de vesículas y organelas, defectos en la liberación de neurotransmisores, cambios en la regulación de la expresión de genes, bloqueo de los sistemas de degradación de proteínas anómalas (proteosomal y microautofagocitosis lisosomal), activación de respuesta inflamatoria de la glía, y la diseminación de la patología hacia otras células y regiones del cerebro. Se ha señalado a los oligómeros e intermediarios de agregación como potenciales agentes tóxicos asociados a los inicios de las Sinucleopatías. Sin embargo, una alternativa no excluyente, sugiere que algunas PTM, particularmente aquellas derivadas del estrés oxidativo, podrían disparar los eventos nocivos en las células. **Dado que aSyn es considerada una proteína “camaleón”, por su flexibilidad conformacional, y que las PTM son una fuente de variabilidad funcional muy importante en proteínas intrínsecamente desordenadas, las modificaciones oxidativas podrían ser las responsables de la ganancia de actividad tóxica.** Así, este podría ser uno de los mecanismos moleculares que gatillan el inicio de las Sinucleopatías.

2.2- Objetivos específicos

Dada la ausencia de tratamientos efectivos que enlentezcan o detengan la neurodegeneración, así como también de herramientas de diagnóstico previo a la aparición de los síntomas motores, el estudio de PTM de aSyn es un área de constante desarrollo que podría sentar las bases para novedosos métodos de diagnóstico temprano y estrategias de intervención terapéutica para la EP y otras Sinucleopatías. Con este objetivo general en mente, los objetivos específicos del presente plan de trabajo apuntan a mejorar la comprensión de la etiología de la EP mediante la generación y caracterización de modificaciones oxidativas de aSyn y a sentar las bases

para una nueva estrategia de diagnóstico y el monitoreo de su progreso o la efectividad de las terapias implementadas. En particular nos enfocamos en las modificaciones asociados a los residuos de Tyr, para lo cual se propusieron los siguientes objetivos específicos:

- 1- Optimización de protocolos de modificación fotoquímica de aminoácidos y proteínas, particularmente para generar modificaciones derivadas del estrés oxidativo.**
- 2- Generación y caracterización de la formación de variantes de aSyn modificadas en entornos acuosos (proteína soluble), en la interfaz de membranas y en fibrillas amiloides maduras.**
- 3- Análisis del efecto de las variantes mencionadas de aSyn sobre la agregación amiloide, la interacción proteína-membrana y la toxicidad celular.**

Capítulo 3

Materiales y Métodos

3.1- Reactivos y proteínas

Los siguientes insumos fueron comprados a Sigma: Nitrito de sodio (NaNO_2), Tris(2,2'-bipiridil) dicloro Rutenio(II) hexahidrato ($\text{Ru}(\text{bpy})_3^{+2}$), aminoácidos (L-Triptófano, Ácido L-Glutámico, L-Lisina), ácido 3-(N-Morfolino) propanosulfónico (MOPS), proteínas (Glutamato deshidrogenasa bovina (GdH) y Lisozima de huevo de gallina (HEWL)), Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), Tioflavina T (TioT) y Iodoacetamida (IAA). Otros reactivos fueron adquiridos a Merk (L-Tirosina, Acetonitrilo, Agua *Lichrosolv*, y Etanol), Fluka (L-Cisteína); Roche (Lactato deshidrogenasa de conejo (LdH)); Promega (Tripsina modificada, Glu-C); Waters (Rapigest); Biopack (Amonio persulfato, APS); y Roth (Ácido trifluoroacético (TFA), Ditiotreitól (DTT) e Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG)). Las proteínas α -Sinucleína humana wt (aSyn wt) y la Proteína que une ácidos grasos intestinal de rata (I-FABP) se generaron de forma recombinante. Los lípidos naturales Fosfatidilcolina de huevo (EPC), Fosfatidilserina de cerebro de cerdo (PS) y Cardiolipina de corazón de vaca (CL) se compraron a Avanti Polar Lipids. Para cultivo y los ensayos con células se emplearon los siguientes insumos: medio de cultivo *Dulbecco's Modified Eagle's Medium-F12* (DMEM-F12) y antibióticos Penicilina y Estreptomina 1000 U/ml (Gibco); Suero fetal bovino (SFB, Internegocios); EDTA (Biopack); 2-(2-metoxi-4-nitrofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolio y 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolio (WST-8 y WST-1, respectivamente; CarboSynth); 1-Metoxi PMS (Interchim); Lipopolisacárido de *Escherichia coli* (LPS, Sigma); H_2O_2 (Biopack); y DimetilSulfóxido (DMSO, Sigma). El resto de los reactivos empleados fueron de grado analítico o superior.

3.2- Expresión y purificación de α -Sinucleína humana salvaje (aSyn wt)

Para la purificación de manera recombinante de aSyn, 10-25 μL de bacterias *Escherichia Coli* de la cepa BL21 (DE3) transformadas con el plásmido pT7.7-wt-aSyn (TAT) se incubaron en 50 mL de medio Luria Bertani estéril suplementado con 50 μL de ampicilina 100 mg/mL (1000X) toda la noche a 37 °C con agitación. Se diluyó el cultivo en 2 L de medio fresco suplementado con Ampicilina distribuidos en 8 frascos Erlenmeyer de 1 L. Se incubó el cultivo hasta alcanzar una $\text{DO}_{600\text{nm}}$ de 0,6-0,8 y se indujo la expresión de aSyn con IPTG 400 mM (concentración final 400 μM). Luego de 3 h de incubación, se centrifugó el cultivo y se separó el sobrenadante del pellet. Este último se diluyó en *buffer* de lisis (50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA) suplementado con PMSF (inhibidor de proteasas, 1 mM final) inmediatamente antes de su uso, y se lo sonicó empleando un sonicador de punta (Branson) por aproximadamente 5 min mediante intervalos intermitentes cortos de 30 segundos (ciclo de trabajo del 50 %) hasta oscurecimiento de la suspensión. Luego se centrifugó la muestra por 20 min a 21000 g para eliminar restos celulares insolubles, y el sobrenadante se incubó por 5 min en un

baño de agua a 90 °C. Este paso promueve la desnaturalización y floculación de proteínas globulares mientras que la aSyn se mantiene en suspensión gracias a su estructura nativa intrínsecamente desordenada. Luego de enfriar la muestra por 5 min en hielo, se procedió con una nueva ronda de centrifugación y al sobrenadante obtenido se le agregó $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sólido hasta alcanzar una concentración final de 350 mg/mL, seguido de una incubación a 4°C con agitación por 30 min. Luego de una nueva centrifugación, el pellet se resuspendió en buffer Tris-HCl 30 mM pH 7,4. Finalmente, se aplicaron alternativamente uno de los protocolos detallados a continuación para completar la purificación de aSyn:

- **Protocolo 1:** Se inyectó el pellet disuelto en una columna de exclusión molecular conteniendo resina Sephadex G50 y se la eluyó con buffer Tris-HCl 30 mM, pH 7,4 con control de flujo mediante bomba peristáltica para coleccionar fracciones de 12 mL. Las fracciones conteniendo proteínas se identificaron mediante la reconstrucción de cromatogramas a partir de las medidas de absorbancia a 260, 275 y 280 nm. Posteriormente, se agruparon las fracciones que contenían proteína y se las concentró a 4 °C mediante equipo de filtración Amicon usando un filtro en forma de disco con poros de corte de tamaños moleculares de 3 kDa. El concentrado se inyectó en el equipo ÄKTA purifier (GE) conectado a una columna de intercambio aniónico MonoQ de 4,8 mL y se eluyó empleando un gradiente del *buffer* Tris-HCl 30 mM, NaCl 1 M, pH 7,4. Alternativamente se empleó la columna HiTrap Q FF (Sigma/Merk) de 5 mL con inyección manual y la elución se realizó con solución Tris-HCl 30 mM, NaCl 350 mM, pH 7,4. Las fracciones conteniendo aSyn se agruparon y desalaron mediante cromatografía de exclusión molecular usando el sistema ÄKTA purifier, columna Superdex 75 (Sigma/Merk) y *buffer* Fosfato Salino (PBS, $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ 20-25 mM, NaCl 100 mM, pH 7,4). De forma alternativa también se utilizaron filtros de centrifuga Amicon Ultra (Merk Millipore) con tamaño de poro de 50 kDa y 3 kDa, para eliminación de contaminantes y, desalado y concentrado, respectivamente.

- **Protocolo 2:** Se inyectó el pellet disuelto en una columna de exclusión molecular de Sephadex G15 (Sigma/Merk) conectada al sistema ÄKTA purifier y se eluyó con buffer Tris-HCl 30 mM, pH 7,4. Las fracciones conteniendo proteína se identificaron mediante absorbancia a 275 nm y posteriormente se las agrupó. Seguido de esto, se las inyectó en una columna de intercambio aniónico Q Sepharose FF (Sigma/Merk) y eluyó empleando un gradiente de la solución Tris-HCl 30 mM, NaCl 1 M, pH 7,4. Finalmente, el desalado e intercambio a *buffer* PBS se completó con una cromatografía de exclusión molecular utilizando la columna Superdex 200 HiLoad. Posibles contaminantes remanentes de alto peso molecular se eliminaron posteriormente con filtro Amicon Ultra 50 kDa.

Para ambos protocolos, cada paso de purificación se controló mediante electroforesis SDS-PAGE con geles al 12 o 15 % caseros o empleando geles comerciales NuPAGE 4-12 % Bis-Tris (Thermo Scientific). Finalmente, la eliminación de posibles contaminantes trazas se controló mediante la

ausencia de emisión de fluorescencia de triptófano (λ_{exc} 295 nm), dado que aSyn carece de este aminoácido. La concentración final se estimó mediante absorción a 275 nm empleando el coeficiente de extinción molar $\epsilon_{275nm} = 5600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Los stocks de proteína se almacenaron en *buffer* PBS a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta su utilización y el rendimiento de la purificación se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Rendimiento} \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) = \frac{\text{Peso Molecular} \left(\frac{\text{gr}}{\text{mol}} \right) \times \text{Concentración} \left(\frac{\text{mmol}}{\text{L}} \right) \times \text{Volúmen(L)}}{\text{Volúmen inicial de cultivo (L)}} \quad \text{Ec. 3.1}$$

3.3- Reacción de modificación foto-inducible

3.3.1- Entrecruzamiento y nitración de tirosina libre

Las reacciones se llevaron a cabo en cubetas de cuarzo de 100 μL o 3,5 mL, con soluciones de 800 μM L-Tirosina (Tyr) en 20 mM *buffer* fosfato (PB), pH 7,4. En todos los casos, las concentraciones del fotosensibilizador $\text{Ru}(\text{bpy})_3\text{Cl}_2$ y el aceptor de electrones APS fueron de 40 μM y 1,2 mM, respectivamente. En el caso de la reacción de nitración se adicionó NaNO_2 hasta concentración final de 10 mM, dependiendo del ensayo. La irradiación de la solución se logró en el espectrofluorómetro Fluorolog 3 (Horiba-Jobin Yvon), equipado con una lámpara de arco de xenón, a través de su monocromador de excitación con un haz centrado en 450/4 nm por un máximo de 360 segundos, con intervalos de tiempos entre 90 y 180 segundos para agitación manual y medidas de emisión de fluorescencia de Tyr (λ_{exc} 275 nm). La irradiación incidente total fue monitoreada a través del detector R para garantizar la homogeneidad de la emisión de la lámpara y, eventualmente, para permitir comparar muestras analizadas distintos días. Muestras control con ausencia de $\text{Ru}(\text{bpy})_3\text{Cl}_2$, APS, NaNO_2 y/o luz fueron preparadas, procesadas y analizadas en paralelo. Para las reacciones con otros aminoácidos libres Lisina (Lys), ácido Glutámico (Glu), Cisteína (Cys) y Triptófano (Trp), con el fin de analizar su interferencia sobre las modificaciones de Tyr, se los agregó en una proporción 1:1 con este. También se evaluaron reacciones Trp:Tyr en una relación 1:8. Además, se obtuvieron los espectros diferenciales para evaluar la aparición de nuevas bandas de absorción. Los espectros de absorción de la reacción de nitración para Tyr/Trp en una relación 1:1 se compararon con la combinación lineal de los espectros individuales de nitración de Tyr y Trp, en un rango de longitudes de onda donde los aminoácidos están mejor caracterizados (320-600 nm). También se evaluaron reacciones en diferentes condiciones, entre las que se incluyen alternativamente *buffers* MOPS o Tris-HCl 20 mM, además de PB a diferentes pH (5,4; 6,4; 7,4; y 8,4) o suplementado con distintas concentraciones de NaCl (0-500 mM final). El análisis espectral de fasores se realizó de

acuerdo a lo descrito por Golfetto y col. [185], empleando una ventana espectral fija (260-510 nm) a partir de los espectros de absorbancia registrados.

3.3.2- Reacción de nitración foto-inducible en proteínas

Como sistemas modelos para poner a punto las reacciones foto-inducibles optimizadas anteriormente para aminoácidos libres, se emplearon las proteínas Glutamato deshidrogenasa (GdH, bovina), Proteína que une ácidos grasos intestinal (I-FABP, rata), Lactato deshidrogenasa (LdH, conejo) y Lisozima (HEWL, gallina). De forma resumida, las reacciones fueron realizadas en cubetas de cuarzo de 3,5 mL (Hellma, Alemania) con proteínas a 250 µg/mL en PB, pH 7.4. Se irradió las suspensiones de proteínas con un haz centrado en 450/8 nm por un total de 360 segundos en el espectrofluorómetro Fluorolog 3. De forma alternativa, las muestras fueron irradiadas con un dispositivo desarrollado en el Instituto Max Planck de Biofísica Química (MPIbpc, Goettingen, Alemania), equipado con una rueda de leds y un regulador de intensidad de luz. Se seleccionó la longitud de onda 450 nm y se ajustó la intensidad a 1,1 mW/cm². Se tomaron muestras a diferentes intervalos de tiempo para análisis espectroscópico y espectrometría de masas (MS), como se describe más abajo. El análisis de fasores se realizó de manera análoga a lo expuesto para la modificación de aminoácidos libres.

3.3.3- Reacción de entrecruzamiento y nitración foto-inducible de aSyn

Las reacciones fueron realizadas en cubetas de cuarzo de 100 µL (Hellma, Alemania) con concentraciones de proteína de 20-40 µM en PBS (KPO₄ 20-25 mM, NaCl 100 mM, pH 7,4), en presencia de Ru(bpy)₃⁺² 10-20 µM, APS 300-600 µM y, en el caso de la reacción de nitración, NaNO₂ 10 mM. Las muestras fueron irradiadas con el dispositivo desarrollado en el MPIbpc (descrito más arriba) empleando intensidades en el rango de 0,8 a 1,1 mW/cm². Para el caso de la reacción de entrecruzamiento, se irradiaron las muestras por 140 y 80 s a intensidades de 0,8 y 1,1 mW/cm², respectivamente; mientras que para la nitración de aSyn, los tiempos fueron de 300 y 140 s a fin de alcanzar niveles equivalentes de consumo de Tyr. Se tomaron muestras a diferentes intervalos de tiempo para su posterior análisis espectroscópico y por MS, como se describe más abajo. Alternativamente, se empleó el espectrofluorómetro Fluorolog 3 de manera similar a lo descrito en la sección 3.3.1. Brevemente, soluciones de proteínas 50-150 µM en PBS, en presencia de Ru(bpy)₃⁺² 20-40 µM, APS 600-1200 µM y, en el caso de la reacción de nitración, NaNO₂ 10 mM, se irradiaron con un haz de 450/10 nm en cubetas de 3,5 mL por 240 s.

3.4- Espectroscopias UV–Visible y de fluorescencia

Los espectros de absorbancia se midieron en un lector de placa Multiskan GO (Thermo Scientific) utilizando una microplaca de 96 pocillos de cuarzo negro (Hellma, Alemania) o, alternativamente, para la reacción de nitración de Tyr evaluando el efecto del pH, microplacas negras de 96 pocillos (Thermo Scientific). En este último caso, los espectros fueron medidos luego de diluir las muestras irradiadas en proporción 1:1 con PB (PBS, para aSyn) o solución saturada de NaHCO₃, pH ~10. Los espectros de fluorescencia se registraron con un espectrofotómetro Fluorolog 3 (Horiba-Jobin Yvon) usando cubetas de cuarzo de 100 µL con un paso óptico de 1 cm (Hellma, Alemania). Los espectros de emisión se midieron luego de la excitación selectiva a 275 y 320 nm de los cromóforos Tyr y DiTyr, respectivamente. Para las muestras que contenían Trp, se registraron también los espectros de emisión luego de su excitación selectiva a 295 nm. Alternativamente, se registraron los espectros de emisión de fluorescencia mediante un espectrofluorómetro Cary Eclipse (Varian, Australia). Los espectros de emisión se corrigieron por blanco, señal Raman y efecto de filtro interno, esto último, basado en la fórmula de corrección de Lakowicz [186].

3.5- Preparación de fibras de aSyn

Se incubó aSyn (120 µM en PBS, en alícuotas de 1 mL) a 45 °C y con agitación continua (800 rpm) por 1 semana en Thermomixer (Thermo Scientific). Luego de la incubación la formación de fibrillas se confirmó por el ensayo de Tioflavina T (TioT) [187]. Brevemente, se tomaron 5 µL y se mezclaron con 2 mL de solución 5 µM TioT en *buffer* glicina 50 mM, pH 8,2. Finalmente, se confirmó la presencia de fibrillas por el aumento en la emisión a 482 nm luego de excitar a 446 nm, debido a que la sonda adsorbida sobre las fibras amiloides aumenta su rendimiento cuántico al verse impedida la rotación libre de sus anillos aromáticos. Luego, las fibrillas se aislaron centrifugando y lavando dos veces las muestras antes de resuspenderlas en PBS. La concentración se determinó mediante la medida de absorbancia a 275 nm corregida por *scattering* a 305 nm. Estas fibrillas maduras se emplearon en algunas de las reacciones de foto-oxidación destinadas a evaluar la influencia de la conformación de aSyn sobre su susceptibilidad a ser oxidada.

3.6- Preparación y caracterización de vesículas unilamelares pequeñas (SUV)

Las Vesículas Unilamelares Pequeñas (SUV, por sus siglas en inglés) son los modelos *in vitro* de bicapas de fosfolípidos más frecuentemente empleadas para modelar estructuras

membranosas, similares a las vesículas intracelulares como por las que aSyn muestra mayor afinidad [56]. Se prepararon soluciones stock de fosfatidilcolina de huevo (EPC) 25 mg/ml, fosfatidilserina (PS) 10 mg/ml y cardiolipina (CL) 25 mg/ml (Avanti Polar Lipids) en CHCl₃, y se almacenaron en viales de vidrio a -80 °C. Alícuotas de las soluciones stock se mezclaron para preparar mezclas 4 mM en fosfolípidos (100 % EPC, 50% PS, y 50% CL), las cuales se secaron en corriente de nitrógeno en balones de vidrio y luego se rehidrataron con PBS. Para las vesículas con más de un tipo de fosfolípido, los porcentajes están basados en la composición molar relativa. Para la generación de SUV, los lípidos hidratados se sonicaron utilizando un sonicador de punta (Kontes Micro cell disrupter) por 1 hora. Alternativamente se usó un sonicador Branson, empleando punta chata y sonicado continuo por 15 min (ciclo de trabajo del 50 %). La solución coloidal se centrifugó 15 min a 13000 rpm para remover las trazas metálicas del sonicador. El tamaño de las vesículas se determinó por Dispersión de Luz Dinámica (DLS) usando el equipo Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments), equipado con un láser de 633 nm. Las muestras de las vesículas preparadas por sonicado se diluyeron en buffer PBS por duplicado y se obtuvo el valor Z-promedio y el índice de polidispersión (PDI) mediante el análisis de cumulantes de las funciones de autocorrelación generadas por la intensidad de luz dispersada a un ángulo de 173°, usando la función de análisis por defecto del software del equipo (Zetasizer software v. 7.13). Las vesículas fueron empleadas en las reacciones de foto-oxidación dentro de la semana de preparación, en concentraciones finales de 0,8, 1,6 y 2,4 mM.

El efecto de la proteína aSyn sobre el tamaño de las vesículas se analizó luego de incubaciones cortas (10 min) a temperatura ambiente por DLS de manera análoga a lo especificado para la determinación del tamaño de las vesículas preparadas por sonicado.

3.7- Análisis de interacción fotosensibilizador-SUV

Las medidas para el cálculo de la anisotropía de fluorescencia se realizaron en cubetas de cuarzo de 100 µL (Hellma, Alemania), empleando el espectrofluorómetro Fluorolog 3, con concentraciones de Ru(bpy)₃⁺² de 10 µM en PBS (KPO₄ 20-25 mM, NaCl 100 mM, pH 7,4), en presencia de concentraciones variables de SUV (0,8, 1,6 y 2,4 mM). Las soluciones se irradiaron con un haz de 450/1 nm y se registraron los espectros de emisión en el rango (590-650) empleando las orientaciones vertical (v) y horizontal (h) de los polarizadores de excitación y emisión; y se calculó la anisotropía empleando las siguientes ecuaciones:

$$Anisotropía = \frac{I_{vv} - G \times I_{vh}}{I_{vv} + 2 \times G \times I_{vh}} \quad Ec. 3-2$$

$$G = \frac{I_{vv}}{I_{hh}}$$

Ec. 3-3

Donde I_{vv} indica la intensidad de emisión de fluorescencia con ambos polarizadores en posición vertical e I_{vh} con el polarizador de excitación en posición vertical y el de emisión en posición horizontal. El factor de corrección G se calculó empleando una solución de fotosensibilizador 10 μM libre en solución el cual tiene en cuenta la intensidad de emisión con los polarizadores en posición horizontal (I_{hh}) y con el polarizador de excitación en posición horizontal y el de emisión en la orientación vertical (I_{hv}).

Las medidas de fluorescencia resuelta en el tiempo fueron realizadas empleando el espectrofluorómetro Fluorolog 3, equipado con un láser de 461 nm para la excitación a 500 KHz, con un retardo de 50 ns. Los perfiles de caída de fluorescencia se registraron a 600 nm (ancho de banda de 16 nm) empleando un detector TCSPC, en un rango de medida de 800 ns y un pico mínimo de 2000 cuentas. El perfil de respuesta del equipo (*prompt*) se registró usando una solución de vesículas de 3,7 mM. Las curvas se ajustaron empleando el software asociado al sistema (DAS6), aplicando un modelo monoexponencial para la solución de fotosensibilizador (75 μM) libre, y biexponencial para soluciones suplementadas con vesículas (3,4 mM).

3.8- Análisis por espectrometría de masas (MS)

3.7.1- Preparación de muestras, digestión y análisis por MS para proteínas modelo.

Muestras de 200 μL con 300 $\mu\text{g/mL}$ proteína (GdH, I-FABP, LdH y HEWL) fueron irradiadas en presencia de 10 μM $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+2}$, 300 μM APS y 10 mM NaNO_2 por 200 segundos. Luego, se precipitó las proteínas con etanol frío (relación 1:9 muestra/alcohol, a -30°C toda la noche), se las secó en SpeedVac y finalmente se las disolvió en 10 μL de Rapigest (Waters) al 1 %. Se redujeron los puentes disulfuro con 10 μL de DTT 50 mM y luego se los alquiló con 10 μL de IAA 100 mM. La digestión de las proteínas se realizó empleando Tripsina o Glu-C en una proporción 1:20 enzima/masa de sustrato. Para el análisis por Cromatografía Líquida seguido de MS en tándem (LC-MS/MS), se disolvieron las muestras en 10 μL del *buffer* de carga (5 % v/v acetonitrilo, 1 % v/v TFA). Para la separación cromatográfica, se empleó un sistema UHPLC Dionex Ultimate 3000 (Thermo Scientific) equipado con una columna de C18 (ReproSil-Pur 120 C18-AQ, Dr. Maisch GmbH), acoplado al espectrómetro de masas. Los péptidos fueron inyectados a un flujo de 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ en *buffer* A (0.1 % TFA en H_2O , v/v) y subsecuentemente separados y eluidos con un gradiente 5-90 % con *buffer* B (95 % acetonitrilo, 0.1 % TFA en H_2O , v/v) a lo largo de un tiempo total de corrida de 58 minutos a un flujo de 300 nL/min. Para la ionización por *electrospray* (ESI) seguido de MS en tándem se empleó el sistema Q Exactive HF-X Hybrid Quadrupole-Orbitrap (Thermo Scientific), operado en

modo positivo. Cada espectro de MS (*scan*) fue registrado en el rango 350-1600 m/z (MS1) y los 30 iones más intensos fueron seleccionados para fragmentación (método TOP30). Los iones fragmentados se generaron por HCD (disociación por colisión de alta energía) y registrados desde los 110 m/z (MS2). Los precursores y fragmentos fueron escaneados mediante un detector Orbitrap.

3.8.2- Preparación de muestras, digestión y análisis por MS para aSyn

Para el caso de las muestras de aSyn sometidas las reacciones de foto-oxidación se procedió de manera similar a lo expuesto en la sección 3.7.1. Muestras de 150-200 μL (20-40 μM) fueron precipitadas con etanol frío y luego secadas, previo a la disolución en 10 μL de 1 % (p/v) Rapigest (Waters). En el caso de las muestras que contenían SUV, luego de la precipitación con etanol, se adicionó un lavado con CHCl_3 /Etanol (1:2) para eliminar lípidos remanentes. Por otro lado, las muestras con fibrillas de aSyn, previo a la precipitación con etanol, se trataron con Cloruro de Guanidinio (4 M concentración final). La digestión de las muestras, las condiciones de corrida en el UHPLC y el análisis por MS fueron las mismas a las descritas en el punto 3.7.1.

3.8.3- Análisis de datos de MS

La identificación de los péptidos nitrados y oxidados provenientes de los datos crudos de MS fue realizado mediante los *software* MaxQuant (v1.6.10.43) y pLink2 (v2.3.9)[188,189]. La cuantificación a través de la implementación de una estrategia libre de marca se realizó con los cromatogramas extraídos con el *software* Skyline (v. 20.1.0.31), tal como se detalla a continuación y se esquematiza en la **Fig. 3-1** [190].

- MaxQuant/Skyline

Se emplearon los espectros MS/MS y los archivos FASTA de la base de datos Uniprot para las proteínas modelo (P00698, P13491, P02693 y P00366). La carbamidometilación de Cys fue considerada como modificación fija, mientras que la nitración ($\text{NO}(2)\text{H}(-1)$, +45 Da) de Tyr, Trp, Phe y His, junto con la oxidación de Met y His (+1O, +16 Da) y la hidroxilación de residuos aromáticos (+1O), fueron consideradas como variables. Además, otras modificaciones de Trp fueron estudiadas, específicamente +4 Da (quinurenina, +1O-1C), +14 Da (Oxolactona, +1O-2H), y +32 Da (N-formilquinurenina, dioxindolilalanina o dihidroxitriptófano, +2O). Dado que puede suceder una subalquilación de los residuos de Cys, su oxidación (+1O) fue también incluida en una búsqueda paralela. Para el caso de las muestras de aSyn (P37840), sólo se consideraron variables la nitración e hidroxilación (+1O y +2O) de Tyr, junto con la oxidación de Met. Tripsina/P o Glu-C fueron seleccionadas como proteasas y se permitió hasta 3 errores de clivaje. Para el control de errores en la asignación de espectro de péptido (PSM, *Peptide Spectrum Match*) se optó por una aproximación

de búsqueda en una base de datos señuelo, fijando una tasa de error (*False Discovery Rate* o FDR) de 1 %.

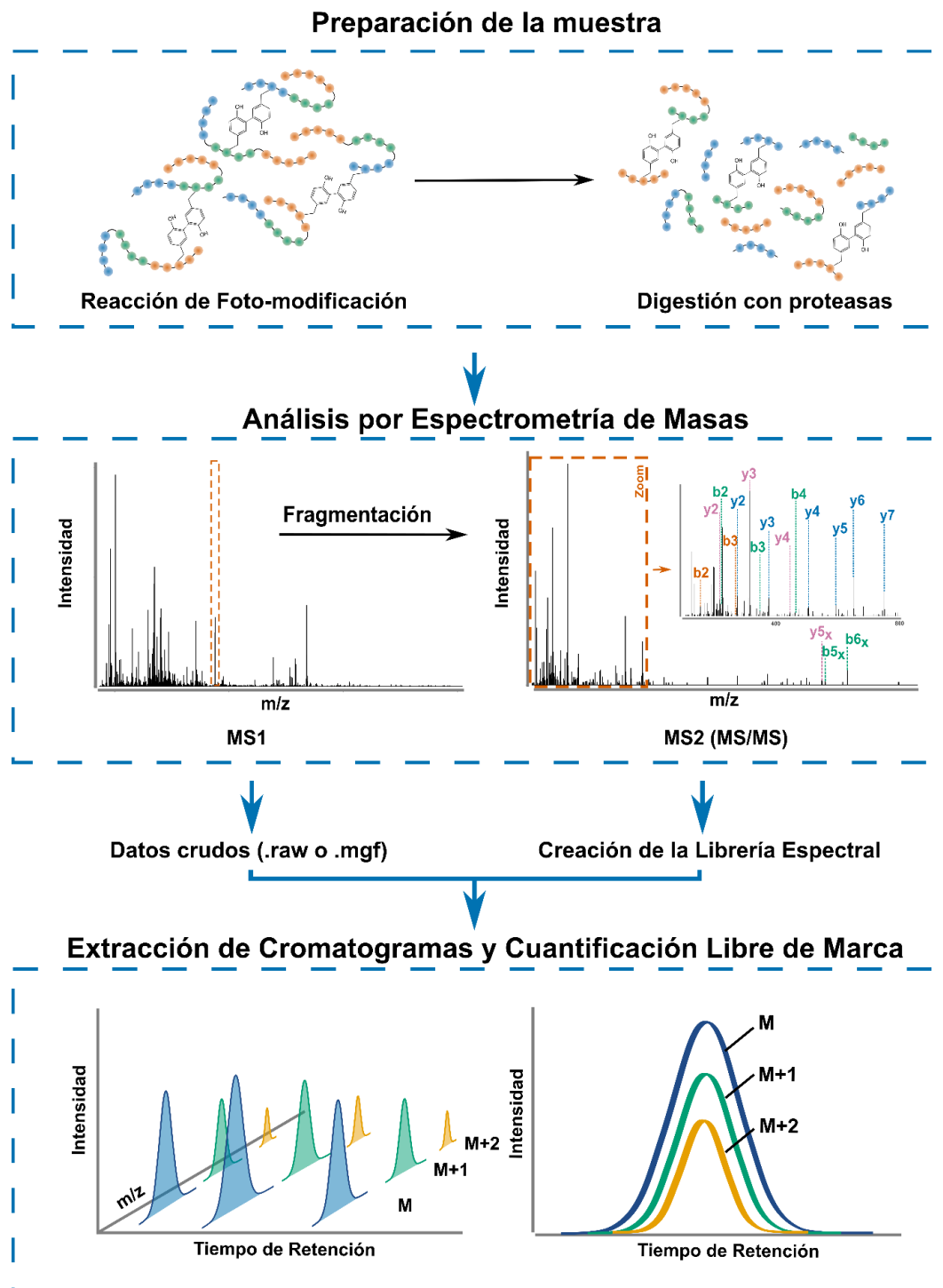


Figura 3-1. Diseño experimental para cuantificación libre de marca de los productos foto-oxidados. Los productos de oxidación generados fueron digeridos con proteasas y los residuos modificados se identificaron por LC-MS/MS. Posteriormente, gracias a la extracción de los cromatogramas a partir de la combinación de las librerías espectrales (archivos *.ssl* o *msms.txt*) con los archivos con los datos crudos, se realizó la cuantificación del grado de modificación a nivel de residuo.

Para analizar el nivel de modificación de los péptidos identificados se empleó un método de cuantificación libre de marca (LFQ, por sus siglas en inglés) basado en la extracción de los cromatogramas a partir de los PSM. Para este propósito, se utilizó el software Skyline, empleando como base de datos el archivo *msms.txt* provisto por el análisis realizado por el motor de búsqueda Andrómeda y estableciendo un FDR al 1 %. Se seleccionaron y extrajeron los cromatogramas de los iones precursores M, M+1 y M+2 para cada péptido identificado y los límites de integración fueron ajustados manualmente en los casos necesarios. Se empleó la disminución de la proporción de péptidos sin modificar (UPR, por *unmodified peptide ratio*, Ec. 3-4) generado por la aparición de modificaciones, para monitorear diferencias entre muestras tratadas y no tratadas. Además, la modificación total del péptido (TMR, por *total modification ratio*) se puede estimar como $TMR (\%) = 100 - UPR$. Por último, el grado de modificación a nivel de residuo (RMR, por *Residue Modification Ratio*, Ec. 3-5) se calculó teniendo en cuenta la suma de todas las variantes donde el aminoácido en cuestión es oxidado (+16 Da, +32 Da, etc.) o nitrado (+45 Da). Por lo tanto, se emplearon las siguientes fórmulas para estimar el grado de modificación a nivel de péptido y residuo:

$$UPR (\%) = \left(\frac{I_0}{I_0 + \sum_{i=1}^n I_i} \right) \times 100 \quad \text{Ec. 3-4}$$

$$RMR (\%) = \left(\frac{\sum_{k=1}^m I_k}{I_0 + \sum_{i=1}^n I_i} \right) \times 100 \quad \text{Ec. 3-5}$$

Donde I_0 e I_i son las intensidades (o, mejor dicho, el área bajo la curva de los cromatogramas extraídos) que corresponden al péptido no modificado y las versiones modificadas, respectivamente; mientras que I_k representa las intensidades de péptidos donde un residuo en particular es modificado. Para el caso particular de la nitración, el cociente calculado (Ec. 3-5) también lo denominamos RNR, por *Residue Nitration Ratio*. Los resultados fueron exportados desde Skyline a un archivo de Excel y se realizó la cuantificación basándose en la transición con la carga que presentaba un mayor número de PSM para cada péptido y que permitiera la mayor cobertura de su secuencia.

- pLink2/Skyline

Para la identificación de variantes entrecruzadas de aSyn, se convirtieron los archivos *.raw* en *.mgf* con el software Proteome Discoverer 2.1. Luego, se utilizó el software pLink2 con los siguientes parámetros: se configuró $Ru(bpy)_3^{+2}$ como agente entrecruzante (*crosslinker*) de residuos de Tyr con una composición de -2H (-2,016 Da); Tripsina/P o Glu-C fueron seleccionadas como proteasas y se permitió un máximo de 3 errores de clivaje; y la oxidación de Met (+1O, +16 Da) se consideró una modificación variable. Las tolerancias a nivel del precursor y fragmentos se fijaron en

± 10 ppm. Se aplicó un filtro adicional de ± 10 ppm junto con un FDR de 1 % para el análisis de los resultados.

Para analizar el nivel de modificación de los péptidos identificados nuevamente empleamos los cromatogramas extraídos con el software Skyline basado en las intensidades de los espectros MS1. Para esto, se configuró un archivo *.ssl* (*Spectrum Sequence List*) como base de datos de entrada de los péptidos identificados por el software pLink2. Para la confección de éste se reunió la siguiente información para cada péptido (modificado y sin modificar): secuencia, archivo crudo en el cual fue detectado (*.raw*), el número de espectros y la carga. Dado que los entrecruzamientos entre péptidos no es una modificación admitida por Skyline, estos fueron linearizados considerando el péptido β como un aducto del péptido α y la masa resultante (menos 2 átomos de H) se configuró como una nueva modificación de Tyr en el software (**Fig. 3-2**). Además, en el archivo *.ssl* se incluyeron los datos de identificación de modificación oxidativas realizadas con el software MaxQuant.

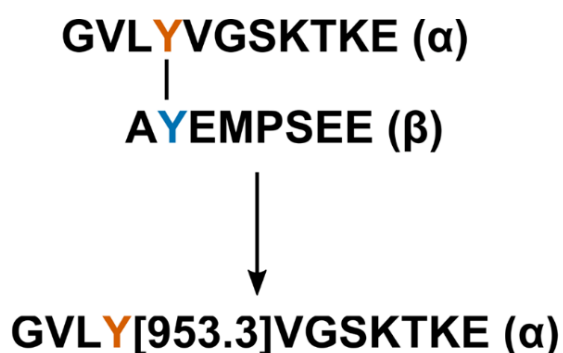


Figura 3-2. Linearización de péptidos entrecruzados. Los péptido entrecruzados de la reacción de foto-oxidación (α y β) se linearizaron para permitir la cuantificación libre de marca por Skyline. Como ejemplo, el péptido β ($^{124}\text{AYEMPSEE}^{131}$, 955,3 Da) se consideró un aducto del péptido α ($^{36}\text{GVLYVGSKTKE}^{46}$) de masa 953,3 Da, considerando la pérdida de 2 átomos de H.

Se extrajeron los cromatogramas de los iones precursores M, M+1 y M+2 con un FDR al 1 % y se aplicó la Ec. 3-5 para calcular el grado de modificación a nivel de residuo (RMR) de manera similar a lo anteriormente expuesto. En lo referido a los entrecruzamientos, se utilizaron los péptidos que incluyen a la Y₃₉, $^{36}\text{GVLY}_{39}\text{VGSKTKE}^{46}$ (Glu-C) y $^{33}\text{TKEGVLY}_{39}\text{VGSK}^{43}$ (Tripsina), para normalizar los datos y estimar el nivel de modificación de Y₃₉ en relación con los entrecruzamientos identificados.

3.9- Modelado molecular

Las proteínas modelo empleadas fueron seleccionadas por la vasta información estructural disponible, lo que permite analizar correlaciones de la susceptibilidad de ser modificados con el grado de exposición o diversas características estructurales a fin de caracterizar y validar los métodos fotoquímicos. Para una visualización más intuitiva de las estructuras, estas fueron renderizadas mediante el software Chimera (v. 1.13.1) usando las extraídas del Protein Data Bank (PDB): 6DHD

(GdH), 1IFB (I-FABP), 5NQQ (LdH) y 6RXI (HEWL). La estimación del área superficial accesible al solvente (SASA, por sus siglas en inglés) se calculó con el software Surface Race 5.0, usando el radio de Van der Waals de F.M. Richards y considerando al radio de la sonda de 1,4 Å. El cálculo del área superficial relativa (RSA) se obtuvo normalizando los valores de SASA calculados por el valor teórico máximo posible de las áreas accesibles para los residuos Tyr y Trp libres [191].

3.10- Purificación de variantes de aSyn modificadas

Las variantes generadas por los métodos foto-inducibles se purificaron mediante cromatografía de exclusión molecular empleando columnas de desalado Sephadex G-25 PD-10 (GE) equilibradas con *buffer* PBS, para eliminación de Ru(bpy)₃Cl₂, APS y NaNO₂. La presencia de proteínas en las fracciones colectadas se confirmó mediante absorbancia a 275 nm y geles de SDS-PAGE 12,5 %. Posteriormente, la esterilización de las proteínas modificadas para su posterior uso en ensayos de cultivo celular o *in vitro* se logró utilizando filtros de jeringa de polietersulfona (PES) de 0,22 µm (Abluo, GVS). Finalmente, la cuantificación de las proteínas modificadas se realizó empleando el *kit* comercial basado en el método del ácido bicinconínico (BCA, Pierce/Thermo Scientific), utilizando una solución de concentración conocida de aSyn wt como patrón para la confección de la curva de calibración. Para evitar la aparición de artefactos producto del proceso de purificación, se aplicó el mismo protocolo para la proteína wt sin modificar que se empleó en paralelo como control en los ensayos.

3.11- Cultivo celular

Se emplearon dos líneas celulares, BV-2 y SH-SY5Y, como modelos de células microgliales y neuronales, respectivamente. Las células BV-2 son células derivadas de microglía murina neonatal inmortalizados por expresión de los genes oncovirales Raf/Myc [192]. Se ha descrito que esta línea celular mantiene las propiedades morfológicas, fenotípicas y funcionales presentes en las células de cultivo primario de microglía: responden a lipopolisacárido bacteriano (LPS), tienen capacidad fagocítica y aumentan sus niveles de expresión de ROS-RNS y de genes pro-inflamatorios luego de ser expuestas a fibrillas de péptido β-Amiloide (Aβ) o aSyn [193]. Por su parte, las células SH-SY5Y derivan de un neuroblastoma humano [194]. Esta línea celular se ha utilizado ampliamente como modelo neuronal desde principios de la década de 1980, ya que posee muchas propiedades bioquímicas y funcionales de las neuronas, incluyendo la proyección de neuritas con la capacidad de formar contactos simil-sinapsis. Su fenotipo dopaminérgico se debe a que fue seleccionada para mantener la expresión de la enzima TH, la cual cataliza el paso limitante en la síntesis de

catecolaminas y el neurotransmisor DA. Ambas líneas se cultivaron en placas de 10 cm de diámetro, empleando medio DMEM-F12 alta glucosa con 10 % SFB (Internegocios) y 1 % Penicilina/Estreptomina, (Gibco/Invitrogen). Las células se incubaron en una estufa con humedad en saturación, 5 % CO₂ y a 37 °C hasta un 80-90 % de confluencia. Los pasajes se efectuaron utilizando PBS con 0,17 % EDTA o solución de Tripsina-EDTA 0,25% (Gibco) para BV-2 y SH-SY5Y, respectivamente. En el caso de la preparación de *stocks* para criopreservación, las células cosechadas se resuspendieron en medio de cultivo completo (25 %), SFB (60 %) y DMSO (15 %), se enfriaron de forma controlada en un envase MrFrosty (Nalgene) con Isopropanol durante 24 hs a -80 °C, y finalmente se almacenaron en N₂ líquido.

3.12- Diferenciación de SH-SY5Y

Para promover su fenotipo neuronal, se plaquearon 15-30 × 10³ células SH-SY5Y en placas de 96 pocillos para emplearlas en los tratamientos con aSyn y sus variantes. Por otro lado, también se plaquearon 1x10⁶ células en placas de 6 cm para realizar el seguimiento de cambios morfológicos por microscopía óptica (contraste de fases) del protocolo de diferenciación. En ambos casos, las células fueron incubadas por 24-48 horas con DMEM/F12 10% SFB a 37 °C hasta observarse una confluencia del ~60%. No existe un protocolo unificado de diferenciación de células SH-SY5Y a un fenotipo dopaminérgico, lo que ha llevado a la obtención de resultados contradictorios y distintos fenotipos según cuál haya sido utilizado [195,196]. En este trabajo se decidió suplementar el medio con ácido retinoico (RA) 15 μM junto con una reducción en la concentración de SFB (al 2 %). Así, se mantuvo el medio de diferenciación por 9 días, con reemplazos de medio cada 48 hs, para posterior tratamiento y evaluación de las respuestas celulares.

3.13- Ensayo de viabilidad celular

La reducción de sales de tetrazolio tiene lugar en todas las células metabólicamente activas, lo que lo convierte en un indicador de viabilidad celular. Para esto se empleó el reactivo WST-8 (2-(2-metoxi-4-nitrofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolio), cuya reducción en presencia de un transportador de electrones (1-Metoxi PMS) produce una sal de formazán soluble en agua de color amarillo-naranja [197]. Para este ensayo, se sembraron las células en placas, a una densidad de 4.5-15 × 10³ y 15-30 × 10³ células por pocillo, para BV-2 y SH-SY5Y, respectivamente. Luego de los tratamientos, las células se incubaron con 100 μL de la solución WST-8 5 mM, 1-Metoxi PMS 0.2 mM, NaCl 150 mM (en H₂O bidestilada) diluida 1/10 con medio sin Rojo Fenol, y se midió la absorbancia a 450 nm en lector de placa durante una ventana de 30 min a 5 horas desde el agregado

de WST-8. Alternativamente, también se empleó el reactivo WST-1 (2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfopenil)-2H-tetrazolio) de manera análoga a WST-8 [197]. Se emplearon LPS y H₂O₂ como controles positivos.

3.14- Ensayo cinético de agregación

La agregación de aSyn y sus variantes se realizó a 37 °C con 20 μM de TioT y 0,05 % NaN₃ (para evitar la contaminación con bacterias o levaduras durante el ensayo) en PBS pH 7,4, con agitación continua (800 rpm) en un incubador Thermomixer Confort con tapa calefaccionada (Eppendorf) en un volumen de 200 μL, en placas de 96 pocillos para fluorescencia (Lumox, Sarstedt) selladas para evitar la evaporación. Las medidas de fluorescencia se registraron en un lector de placas Beckman Coulter modelo DTX 880 empleando filtro *bandpass* 450/8 nm (λ_{exc}) y 485/20 nm (λ_{em}). Las lecturas periódicas se realizaron excitando las muestras desde arriba de la placa (medida *top*), previa remoción del film sellador, con tiempos de integración de 0,1 s. Las curvas de agregación se emplearon para ajustar un modelo de nucleación-propagación (Ec. 3-6) mediante cuadrados mínimos [182]:

$$Y(t) = Y_0 + (Y_f - Y_0) \frac{e^{(k_{ap}t)} - 1}{e^{(k_{ap}t)} + e^{(k_{ap}t_{1/2})} - 2} \quad \text{Ec. 3-6}$$

Donde $Y(t)$ es la fluorescencia de la sonda en función del tiempo, mientras que Y_0 e Y_f son las señales registradas a tiempo inicial y final, respectivamente. Los parámetros restantes, k_{ap} y $t_{1/2}$, indican la constante de velocidad de crecimiento aparente y el tiempo requerido para alcanzar el punto medio de la fase de crecimiento rápido, respectivamente [198].

3.15- Estadística

Para el análisis de datos se emplearon los programas Excel y GraphPad Prism 8. Los resultados fueron expresados como la media \pm error estándar de la media (SEM). Para los análisis estadísticos que involucraron dos grupos experimentales, se utilizó el test t de Student. Para ensayos con más de dos grupos, se empleó la prueba ANOVA de una vía seguidos de una prueba *post hoc* de Bonferroni o Tukey. En caso de ensayos donde no se cumplían las premisas de la prueba ANOVA, se realizaron análisis no paramétricos para evaluar la significancia estadística. Los experimentos fueron realizados al menos por triplicado. En los casos que difiere, se especifica según corresponda. Los gráficos fueron confeccionados mediante GraphPad Prism 8 y el software Inkscape.

Capítulo 4

Optimización de protocolos de modificación fotoquímica

4.1- Introducción

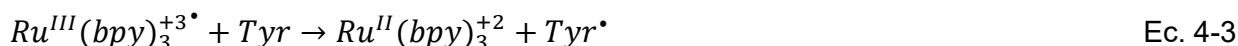
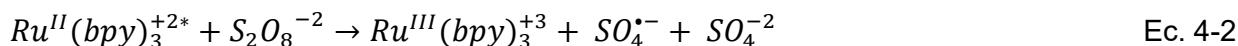
Dada la relevancia de las PTM en procesos tanto fisiológicos como patológicos, es sumamente importante desarrollar herramientas que faciliten su estudio. En relación al estrés oxidativo, existen varios métodos que permiten la introducción de PTM en aSyn, desde la radiación UV o la aplicación del sistema $\text{Cu}^{+2}/\text{H}_2\text{O}_2$ hasta el uso de peroxinitrito [164,169,184,199]. Sin embargo, a pesar de ser sistemas de simple aplicación, presentan algunas desventajas, tales como una amplia generación inespecífica de modificaciones no deseadas, bajo rendimiento, e incluso pueden ser demandantes en términos del tiempo empleado para generar modificaciones. Así, los sistemas foto-inducibles surgen como alternativas para una modificación rápida y más específica. Anteriormente se empleó $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{+2}$ como fotosensibilizador para generar variantes entrecruzadas de aSyn [182], pero hasta el momento no se investigó la posibilidad de adaptar el sistema para generar la nitración de los residuos de Tyr. De esta forma, el presente capítulo se enfoca en la comparación y optimización del sistema foto-inducible basado en $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{+2}$ para el entrecruzamiento y la nitración de aminoácidos libres, y su aplicación con proteínas modelo, previo a su empleo en aSyn.

4.2- Modificación foto-inducible de Tirosina libre con $\text{Ru}(\text{bpy})_3\text{Cl}_2$

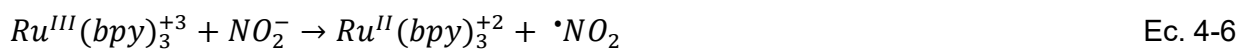
4.2.1- La nitración de Tyr foto-inducible compite con la formación de DiTirosinas (DiTyr)

De acuerdo con lo propuesto por Fancy y col., el sistema foto-inducible para generar el entrecruzamiento de Tyr es iniciado mediante la irradiación del fotosensibilizador ($\text{Ru}(\text{bpy})_3\text{Cl}_2$) con luz azul (450 nm) (Ec. 4-1), promoviendo su excitación y la posterior oxidación a Ru^{+3} por el aceptor de electrones APS ($\text{NH}_4\text{S}_2\text{O}_8$) (Ec. 4-2) [200]. Tanto el catión $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{+3}$ como el radical $\text{SO}_4^{\bullet-}$ pueden oxidar residuos aromáticos y Cys [201,202]. En particular, los radicales Tirosilo (Tyr^{\bullet}) generados mediante las reacciones especificadas con estos agentes oxidantes (Ec. 4-3 o Ec. 4-4) pueden ser neutralizados por otro radical Tyr^{\bullet} formando la especie oxidada DiTyr (Ec. 4-5). Esto puede ser monitoreado fácilmente por métodos espectroscópicos. Las muestras no irradiadas mostraron un pico de emisión bien definido con un máximo a 305 nm (λ_{exc} 275 nm), correspondiente a la fluorescencia interna de Tyr. La irradiación selectiva de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{+2}$ con luz azul resultó en la aparición de una nueva banda con un máximo a 405 nm, con la consecuente disminución en la señal de Tyr (**Fig. 4-1A**). La verificación de un punto isoemisivo alrededor de 355 nm sugiere la conversión directa de 2 Tyr a 1 DiTyr, al menos durante el tiempo de reacción analizado. Además, los espectros UV-Vis mostraron la aparición de una nueva banda de absorción alrededor de 300-340 nm, también compatible con la formación de residuos de DiTyr (**Fig. 4-1B**) [182]. Por otro lado, dado que la banda

de absorción producto de la transferencia de carga metal-ligando del fotosensibilizador (>400 nm) permanece inalterada a lo largo de la reacción, se deduce que éste no sufre ningún proceso de degradación.



Por otro lado, la adición de 10 mM NaNO₂ provocó cambios radicales en los espectros. Luego de la excitación del fotosensibilizador, se observó que la intensidad de señal de DiTyr inducida disminuyó significativamente respecto a la condición basal, mientras que la señal de Tyr mostró cambios similares a los obtenidos en ausencia de NaNO₂ (**Fig. 4-1C**). Asimismo, los espectros UV-Vis presentaron una nueva banda de absorción con máximo a 430 nm (**Fig. 4-1D**), la cual ha sido previamente asociada con la especie no fluorescente NitroTyr [203,204]. Al igual que lo reportado en la literatura [203], también se confirmó que las propiedades espectrales de la especie nitrada son dependientes del pH, al incrementarse la intensidad de absorción a pH más básicos (**Fig. 4-2A**). En conjunto, estos resultados sugieren que la presencia de aniones NO₂⁻ proveen un camino alternativo para la neutralización de radicales Tiroso formando la variante nitrada del aminoácido, probablemente mediante un mecanismo similar al que se muestra en las Ec. 4-6 y Ec. 4-7.



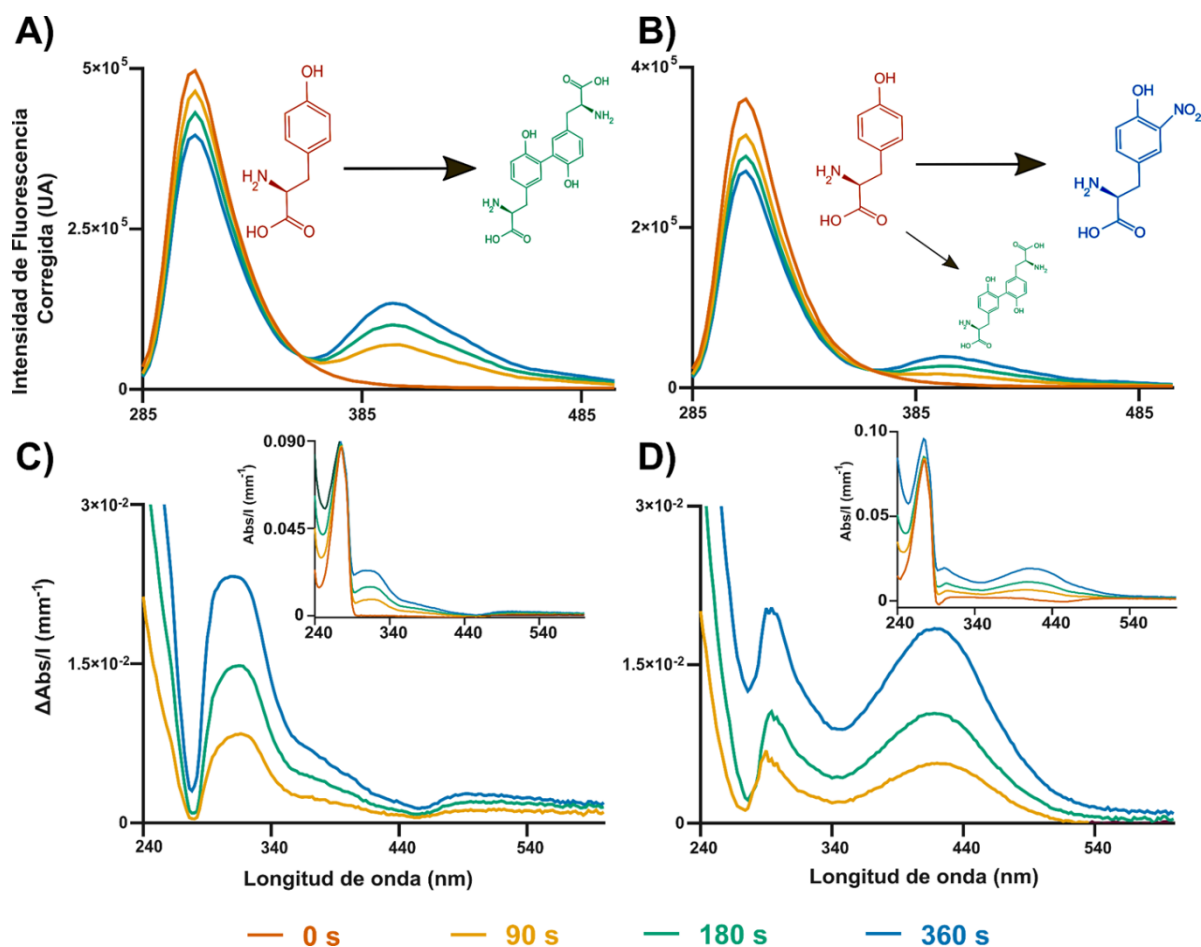


Figura 4-1. Seguimiento de la reacción foto dependiente de modificación de Tyr. Tyr libre fue oxidada por el fotosensibilizador $\text{Ru}(\text{bpy})_3\text{Cl}_2$ utilizando APS como aceptor de electrones, tanto en ausencia (A y C) como en presencia de NaNO_2 (B y D). Las reacciones fueron monitoreadas por emisión de fluorescencia (λ_{exc} 275 nm) (A y B), y absorbancia UV-Vis (C y D).

No se detectaron entrecruzamientos Tyr-Tyr o nitración en muestras no irradiadas o que carecían del fotosensibilizador (Fig. 4-2B y 4-2C). Se ha reportado que, en ausencia de APS, $\text{Ru}(\text{bpy})_3\text{Cl}_2$ puede mediar la foto-oxidación a través de un mecanismo que involucra la generación de oxígeno singlete (reacciones Tipo II) [205]. Sin embargo, en nuestro caso, los controles sin APS no mostraron cambios detectables en los espectros. En este sentido, vale la pena notar que NaNO_2 no actuaría como aceptor de electrones alternativo para la forma excitada del fotosensibilizador (Fig. 4-2B). Sin embargo, los aniones NO_2^- sí actúan como *quencher* colisional de la fluorescencia de Tyr con una $K_{\text{sv}} = 0.1 \text{ mM}^{-1}$ a pH 7,4, calculada usando el modelo clásico de la ecuación de Stern-Volmer (Fig. 4-2D) [206].

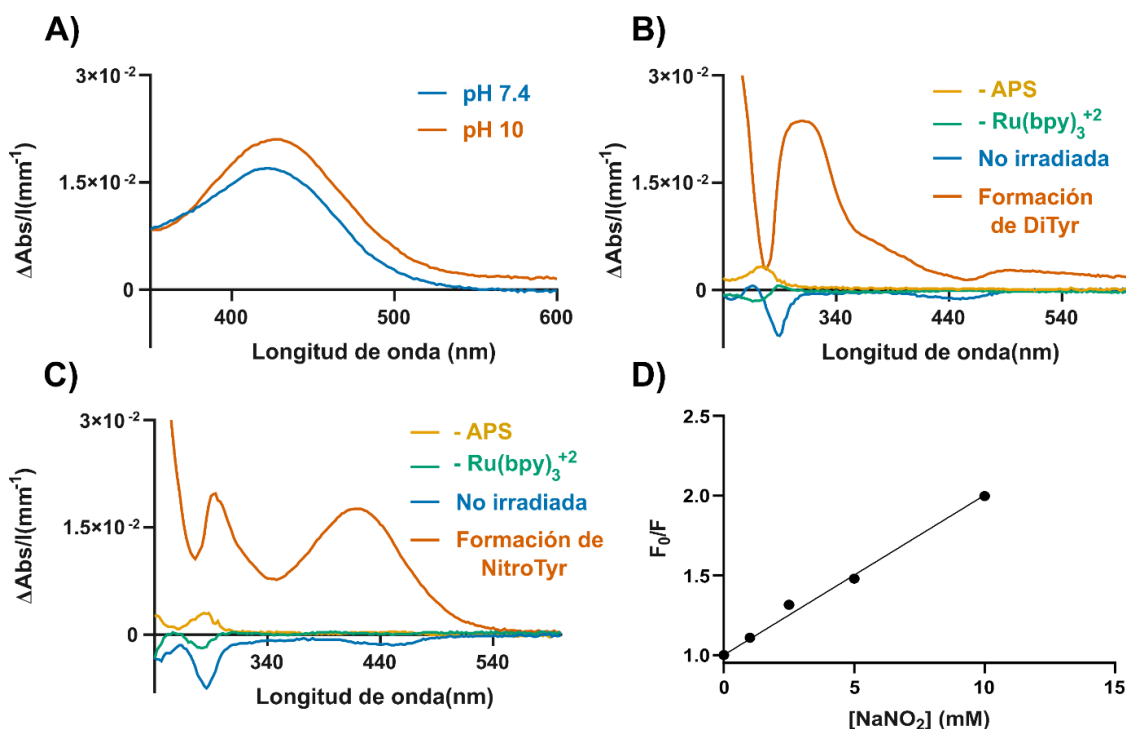


Figura 4-2. Reacciones control. (A) Espectros diferenciales de absorbancia UV-Vis ($\Delta\text{Abs}/l = \text{Abs}/l_{360s} - \text{Abs}/l_{0s}$) para la reacción de nitración a pH 7,4 y luego de la alcalinización hasta pH 10. Experimentos control para la reacción de formación de DiTyr (B) y NitroTyr (C) realizadas en ausencia de APS (+Ru(bpy)₃Cl₂), fotosensibilizador (+APS) o luz (no irradiada). (D) La constante de *quenching* colisional de NaNO₂ ($K_{sv} = 0.1 \text{ mM}^{-1}$) fue estimada empleando la relación Stern-Volmer, teniendo en cuenta la emisión de fluorescencia de Tyr inicial a pH 7,4, variando la concentración de NaNO₂ desde 0 mM (F_0) hasta 10 mM.

4.2.2- La eficiencia de las reacciones foto-inducibles es dependiente del pH

Considerando el potencial uso del sistema foto-inducible para introducir PTM relacionadas al estrés oxidativo en proteínas, investigamos los posibles factores que podrían afectar la velocidad y el rendimiento de las reacciones. Las reacciones de oxidación de Tyr catalizadas por el fotosensibilizador Ru(bpy)₃⁺² mostraron ser dependientes de las condiciones de pH. Así, la acidificación del pH mostró una disminución en la formación de DiTyr (expresado en términos de la relación DiTyr/Tyr, teniendo en cuenta los máximos de fluorescencia de cada fluoróforo), efecto que fue exacerbado por la adición de concentraciones crecientes de NaNO₂ (Fig. 4-3A). Además, la disminución de la producción de DiTyr en presencia de concentraciones crecientes de NO₂⁻ se correlacionó directamente con la aparición de la banda de absorción a 430 nm correspondiente a NitroTyr (Fig. 4-3B). Particularmente, la formación de NitroTyr fue más eficiente a pH 5,4. Estos resultados coinciden con experimentos usando riboflavina como fotosensibilizador [207]. Por el contrario, la reacción de entrecruzamiento de Tyr estuvo claramente favorecida por sobre la reacción de nitración a pH básico, incluso en presencia de la concentración más alta de NaNO₂ utilizada en este estudio.

Se ha propuesto que los radicales $\cdot\text{NO}_2$ podrían proveer una vía alternativa para formar los radicales Tiro-silo (Ec. 4-8), aunque esta reacción tiene una constante de velocidad baja a pH neutro

($k=3,2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) en comparación con la reacción de nitración de Tyr ($k=3,0 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, Ec. 4-7) [27]. Sin embargo, en álcali, la reacción entre la forma básica de Tyr y el radical $\cdot\text{NO}_2$ (Ec. 4-9) cobra relevancia ($k=2 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $\text{pH}>9$) [208]. Por lo tanto, el aumento destacado de la razón DiTyr/Tyr a pH 8,4, puede deberse parcialmente a la reacción entre los radicales $\cdot\text{NO}_2$ y la forma ionizada de Tyr (Ec. 4-9), la cual favorecería la formación de DiTyr por sobre la de NitroTyr.

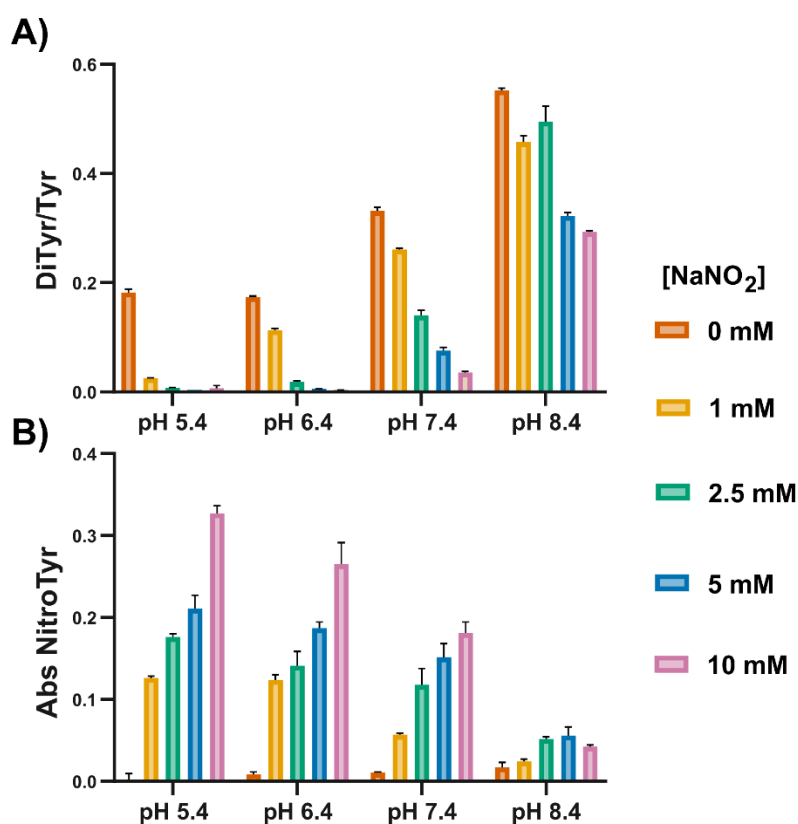


Figura 4-3. Análisis de la dependencia de pH de las reacciones foto-inducibles. Se evaluó el entrecruzamiento (A) y la nitración (B) de Tyr libre a un tiempo de irradiación fijo (360 s) en función de la concentración de NaNO₂ (0-10 mM). Los valores de absorbancia fueron medidos luego de la alcalinización con NaHCO₃ hasta un pH-10.

4.2.3- Buffer fosfato y baja concentración salina maximizan la nitración de Tyr

Por otro lado, también evaluamos cómo *buffers* con diferentes propiedades químicas afectan la modificación de Tyr catalizada por el Ru(bpy)₃⁺². Con *buffer* fosfato (PB) se obtuvieron resultados óptimos, probablemente debido a que no es reactivo en un amplio rango de condiciones, en comparación a Tris-base o MOPS. Estos compuestos contienen grupos aminos o sulfonatos con pares de electrones libres, importantes para la interacción con cationes, tales como Fe⁺² o Cu⁺² [209]. Es conocido que el Rutenio forma una gran variedad de complejos, principalmente con compuestos

heterocíclicos a través de átomos de nitrógeno aromáticos, incluyendo los grupos indol e imidazol; pero también se pueden unir a grupos sulfuro o sulfóxido, o coordinarse con grupo hidroxilo fenólicos [210,211]. Sin embargo, para ninguno de los *buffers* evaluados se han reportado casos de formación de complejos con el catión Rutenio. Aun así, los resultados obtenidos muestran que las reacciones llevadas a cabo con 20 mM MOPS o Tris-HCl afectaron sólo la formación de DiTyr (**Tabla 4-1**). Se ha reportado que los *buffers* morfolino (similares a MOPS), pueden actuar como donores de electrones en reacciones fotoquímicas [212] y podrían ser responsables por el descenso en el rendimiento de la producción de las especies de DiTyr. Un efecto intermedio se observó para las reacciones en presencia de Tris-HCl, el cual también se ha reportado que podría actuar como removedor de radicales hidroxilo [213]. Sorprendentemente, la generación de NitroTyr no se vio significativamente afectada en ninguno de los casos. Una posible explicación a este fenómeno podría radicar en el hecho que la velocidad formación de DiTyr a partir de la reacción de 2 radicales Tiroxilo es menor ($k = 2,3 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, Ec. 4-6) que la nitración a través del radical $\bullet\text{NO}_2$ ($k = 3,0 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, Ec. 4-8) [27]. Sin embargo, estas comparaciones nos permitieron confirmar que los efectos observados en la reacción de oxidación no son consecuencia de la desestabilización del fotosensibilizador.

Finalmente, se evaluó la influencia de la fuerza iónica en la formación de Dityr y NitroTyr. La adición de NaCl afectó claramente ambas reacciones de manera concentración dependiente. Ese resultado podría ser causado principalmente por el apantallamiento de las interacciones electrostáticas, capaz de reducir la interacción de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{+2}$ con APS, Tyr y/o aniones NO_2^- .

Tabla 4-1. Efecto de aminoácidos libres, *buffers* y concentración salina sobre la oxidación y la nitración de Tyr catalizada por $\text{Ru}(\text{bpy})_3\text{Cl}_2$

	Oxidación		Nitración	
	%DiTyr/Tyr ^a	% $\Delta\text{Abs}/l$ (1/mm) ^b	%Tyr ^c	% $\Delta\text{Abs}/l$ (1/mm) ^d
Buffers (20 mM, pH 7.4)				
K-Fosfato (PB)	100,0 ± 0,5	100 ± 2	100 ± 7	100 ± 4
MOPS	26 ± 2 *	51 ± 2 *	98 ± 12	87 ± 7
Tris-HCl	66 ± 3 *	83 ± 3 *	82 ± 4	96 ± 4
Aminoácidos				
Tyr	100,0 ± 0,5	100 ± 2	100 ± 7	100 ± 4
Tyr + Glu	84 ± 12	97 ± 4	123 ± 12	90 ± 9
Tyr + Lys	105 ± 7	109 ± 5	92 ± 5	91 ± 3
Tyr + Cys	9 ± 1 *	26 ± 4 *	62 ± 3 *	22 ± 5 *
Concentración de NaCl en PB				
0 mM	100,0 ± 0,5	100 ± 2	100 ± 7	100 ± 4
10 mM	75 ± 3 *	79 ± 6 *	87 ± 8	87 ± 7
150 mM	75 ± 2 *	64 ± 6 *	67,6 ± 0,6*	65 ± 2 *
500 mM	61 ± 3 *	54 ± 3 *	27 ± 8 *	44 ± 13 *

Los valores fueron normalizados a la condición basal para cada caso (800 μM Tyr, 20 mM PB, pH 7,4, y 0 mM NaCl) y expresados como el promedio \pm SEM. * Indica diferencias estadísticamente significativas comparado con la condición basal, con $p < 0.05$.^{a,c} Los parámetros % DiTyr/Tyr y % Tyr (señal consumida) fueron calculados luego de 360 s de irradiación a partir de los espectros de emisión de fluorescencia con excitación a 275nm. ^{b,d} % $\Delta\text{Abs}/l$ (1/mm) fue calculada a partir de los espectros UV-Vis considerando las bandas de absorción 310-320 nm (oxidación) o 410-430 nm (nitración).

4.2.4- Los residuos Trp y Cys, pero no los aminoácidos polares, interfieren con las reacciones catalizadas por $Ru(bpy)_3^{+2}$

Además del pH, otros factores podrían también modular las reacciones fotoquímicas, con lo que investigamos la influencia de aminoácidos en las reacciones de modificación de Tyr. En el caso de los aminoácidos, evaluamos el efecto de L-Glu, L-Lys y L-Cys. Tanto el aminoácido ácido como el básico no mostraron efecto alguno, mientras que L-Cys disminuyó dramáticamente la producción de NitroTy y DiTyr a pH neutro (**Tabla 4-1**). Este resultado es consistente con el hecho de que los compuestos tiol son conocidos removedores de radicales (*scavengers*) [214]. El pK_a de Tyr juega un papel fundamental en su sensibilidad a ser oxidado. Al respecto, se ha reportado que la velocidad de foto-oxidación de pequeños péptidos conteniendo Tyr junto con residuos ácidos o básicos es altamente dependiente de las cargas vecinas, afectando el pK_a del grupo fenólico [215]. Por lo tanto, a pesar de no haber observado ningún efecto de los aminoácidos iónicos libres, estos podrían afectar la eficiencia de las reacciones fotoquímicas cuando se las emplea para modificar péptidos o proteínas. Este efecto es evaluado oportunamente en la siguiente sección con proteínas modelo.

Dado que el Trp también es susceptible a la modificación mediante mecanismos de tipo I y II, evaluamos su susceptibilidad a ser modificado de manera independiente, monitoreando las reacciones foto-inducibles mediante emisión de fluorescencia y absorbancia UV-Vis luego de la excitación de $Ru(bpy)_3^{+2}$. Como resultado, se observó una disminución progresiva en la intensidad de emisión a 360 nm ($\lambda_{exc} = 295$ nm) que se correlacionó con la aparición de una banda de absorción, dependiente del tiempo de irradiación, centrada en 310 nm (**Fig. 4-4A**). Esto es compatible con lo reportado para especies oxidadas de Trp, como productos hidroxilados y N-formilquinurenina [216]. La adición de $NaNO_2$ también indujo cambios en los espectros UV-Vis, en los cuales el pico a 390 nm se asoció a la formación de la especie 6-Nitro Trp [217]. Sin embargo, otros isómeros nitrados también han sido identificados *in vitro* usando peroxinitrito como agente de nitración [218].

La modificación conjunta de los aminoácidos Tyr y Trp libres en solución también se estudió mediante las reacciones foto-inducidas con $Ru(bpy)_3^{+2}$. Debido al solapamiento de las propiedades espectroscópicas de ambos, las modificaciones foto-dependientes de las mezclas de Tyr y Trp se debieron evaluar de manera diferente. Dado que la emisión de fluorescencia ($\lambda_{exc} = 275$ nm) es dominada por Trp, y considerando que las formas oxidadas de Tyr y Trp absorben luz en un rango de longitudes de onda similar, la reacción de foto-oxidación de soluciones equimolares de Tyr y Trp se monitorearon sólo mediante la emisión selectiva de DiTyr y Trp (**Fig. 4-4C y 4-4D**) luego de la excitación a 340 y 295 nm, respectivamente. En ambos casos, la modificación de cada aminoácido se redujo en aproximadamente un 30 % comparado con las reacciones con cada aminoácido por separado. Por lo tanto, la oxidación foto-inducible afectó ambos aminoácidos aromáticos de forma similar. Esto fue también confirmado para la reacción de nitración (**Fig. 4-4E**) dónde los espectros

UV-Vis mostraron una nueva banda de absorción centrada en 405 nm. Esto podría estar relacionado a la generación de nuevas especies; pero, dado que el espectro puede ser regenerado por la combinación lineal de los espectros individuales de NitroTyr (70%) y NitroTrp (30%), esto sugiere que los radicales Tyr y Trp son neutralizados de forma independiente para formar las mismas variantes nitradas. Vale la pena destacar que la mayor contribución de la especie NitroTyr al espectro resultante podría sugerir que Tyr es más susceptible a ser nitrado por esta técnica que Trp. Esta sensibilidad diferencial se evaluó también con proteínas, lo que será abordado en la siguiente sección.

El análisis espectral de fasores es una alternativa a la elaboración de modelos para evaluar cambios espectrales, por lo que empleamos este método para comparar la nitración y oxidación de Tyr, Trp y su mezcla. El uso de los espectros de emisión de fluorescencia para el análisis de fasores no mostró diferencias entre ambas reacciones dado que se observa, de forma general, un fenómeno de *quenching* de la señal en función del tiempo de irradiación para todos los casos. No fue así para los espectros de absorbancia entre 260 y 510 nm, los cuales exhibieron dos tendencias bien marcadas. Mientras que los productos de nitración de Tyr, Trp y su mezcla empujan los fasores espectrales hacia el centro del gráfico del espacio de fasores, la oxidación lo hace hacia arriba, lo que provee una herramienta intuitiva para diferenciar cuando las muestras están siendo nitradas u oxidadas (**Fig. 4-4F**).

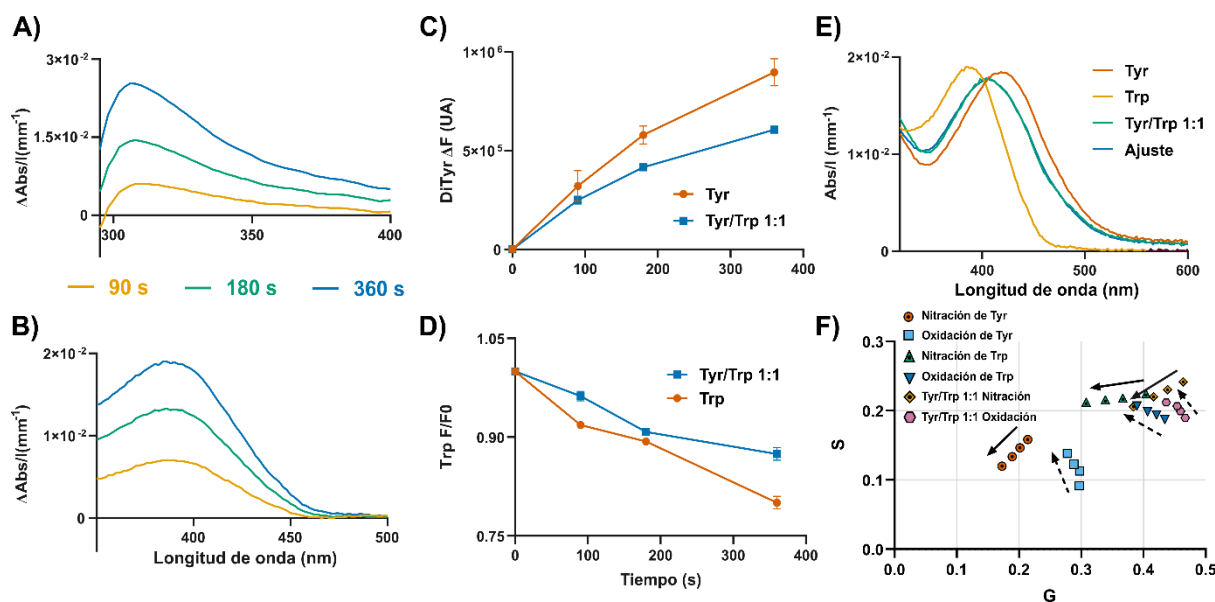


Figura 4-4. Modificación foto-dependiente de Tyr y Trp libres catalizada por $\text{Ru}(\text{bpy})_3\text{Cl}_2$. Espectros diferenciales de la oxidación (A) y nitración (B) de Trp luego de 90, 180 y 360 s de irradiación. Se monitoreó la oxidación de la mezcla 1:1 de Tyr y Trp mediante la excitación selectiva de DiTyr (ΔF , λ_{exc} 340 nm) (C) y Trp (F/F_0 , λ_{exc} 295 nm) (D). La nitración de Tyr y Trp fue confirmada por la aparición de los espectros característicos de las especies nitradas en el rango de 370 a 500 nm. El espectro UV-Vis resultante de la nitración de la mezcla Tyr/Trp 1:1 fue reconstituido mediante la combinación lineal de los espectros de cada aminoácido nitrado por separado (ajuste), con una contribución del 70 % de NitroTyr y 30 % de NitroTrp. Los cambios espectrales de Absorbancia UV-Vis durante las modificaciones foto-inducidas se representan como tendencias obtenidas a partir del análisis de fasores para las reacciones de nitración (flechas continuas) y oxidación (flechas discontinuas) de Tyr y Trp, así como también para la mezcla Tyr/Trp 1:1 (F).

Teniendo en cuenta el objetivo de aplicar el sistema foto-inducible adaptado para la nitración de proteínas, basándonos en los resultados obtenidos, las condiciones óptimas de reacción pueden ser resumidas al empleo de *buffer* fosfato, la menor fuerza iónica compatible con el sistema de estudio (idealmente menor a NaCl 150 mM) y pH 5,4 para maximizar la incorporación del grupo Nitro a los residuos de Tyr. Sin embargo, considerando que el rendimiento de la reacción a pH 7,4 no fue menor al 50 % del obtenido a pH 5,4, priorizamos la estabilidad proteica trabajando en condiciones más cercanas a las *in vivo*.

4.3- Nitración de proteínas

4.3.1- La reacción de foto-nitración de proteínas es rápida y puede ser monitoreada por métodos espectroscópicos

El sistema de modificación de proteínas Ru(bpy)₃Cl₂/APS/luz, conocido como método PICUP (entrecruzamiento de proteínas no modificadas inducido por luz o *Photo-Induced Crosslinking of Unmodified Proteins*), se empleó anteriormente en estudios de interacción proteína-proteína, particularmente en el contexto de enfermedades amiloides [219]. Sin embargo, tal como se especificó al inicio de este capítulo, su aplicabilidad para la nitración de proteínas no había sido explorada. Así, luego de analizar la nitración de Tyr y Trp como aminoácidos libres, el sistema PICUP modificado mediante el agregado de NaNO₂ se empleó en proteínas. Estas reacciones se realizaron a pH 7,4, donde las modificaciones de residuos aromáticos pueden ser detectadas y evaluadas en proteínas en condiciones más cercanas a las *in vivo*. En este sentido, 4 proteínas modelo fueron seleccionadas para las cuales se cuenta con detallada información estructural: Glutamato deshidrogenasa (GdH), Proteína de unión a ácidos grasos intestinal (I-FABP), Lactato deshidrogenasa (LdH) y Lisozima (HEWL). En todos los casos, la concentración de proteína empleada fue fijada en 250 µg/mL y la nitración, con 10 mM NaNO₂, fue inicialmente evaluada por espectroscopia de fluorescencia, donde la emisión está dominada por Trp (λ_{exc} 275 nm). En relación con los máximos de emisión de Trp, GdH e I-FABP mostraron picos centrados en 336 nm, indicando que los residuos de Trp están parcialmente escondidos dentro de núcleos hidrofóbicos; mientras que en los casos de LdH y HEWL, los residuos de Trp están levemente más expuestos a un ambiente polar, dado que presentaron máximos de emisión a 342 nm. De manera similar a lo ocurrido con aminoácidos libres, la irradiación con luz azul indujo una reducción progresiva de la intensidad de emisión a lo largo de tiempo, sin corrimientos de la posición de los máximos (**Fig. 4-5A-D**). Esto sugiere un consumo uniforme de los fluoróforos de las proteínas o, al menos, de los residuos de Trp. Tampoco se evidencia una desnaturalización de las proteínas por las PTM introducidas, lo que se observaría como un corrimiento hacia el rojo por una mayor exposición al solvente de los fluoróforos remanentes. A pesar

de que ambos aminoácidos pueden ser modificados, los espectros de absorbancia están dominados por un pico con máximo a 430 nm, compatible con la formación de NitroTyr (**Fig. 4-5A-D**, gráficos internos). En sintonía, el análisis de fasores indica que la nitración es la reacción predominante durante la foto modificación en presencia de NaNO_2 , como sugiere el movimiento de las muestras hacia el centro del gráfico, similar a lo observado para aminoácidos libres (**Fig. 4-5E**).

Luego de 360 s de irradiación total, la cuantificación de NitroTyr ($\epsilon^{430\text{nm}} = 4400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, a $\text{pH} \sim 10$) mostró rendimientos desiguales, siendo $\sim 15\text{-}17$ y $\sim 6\text{-}7 \mu\text{M}$ NitroTyr para proteínas monoméricas y oligoméricas, respectivamente (**Tabla 4-2**). Es importante destacar que, a pesar de que las proteínas presentan concentraciones similares de Tyr, la eficiencia de nitración varió desde 7 al 33 %, no correlacionándose con la concentración de sustrato, sino más bien mostrando una relación inversa con el estado oligomérico de las proteínas. Esto sugiere una sensibilidad diferencial a la nitración basado en la exposición de los residuos de Tyr, lo que aporta evidencia de que la foto-nitración actuaría a través de la generación de radicales Tiroso (mecanismo tipo I).

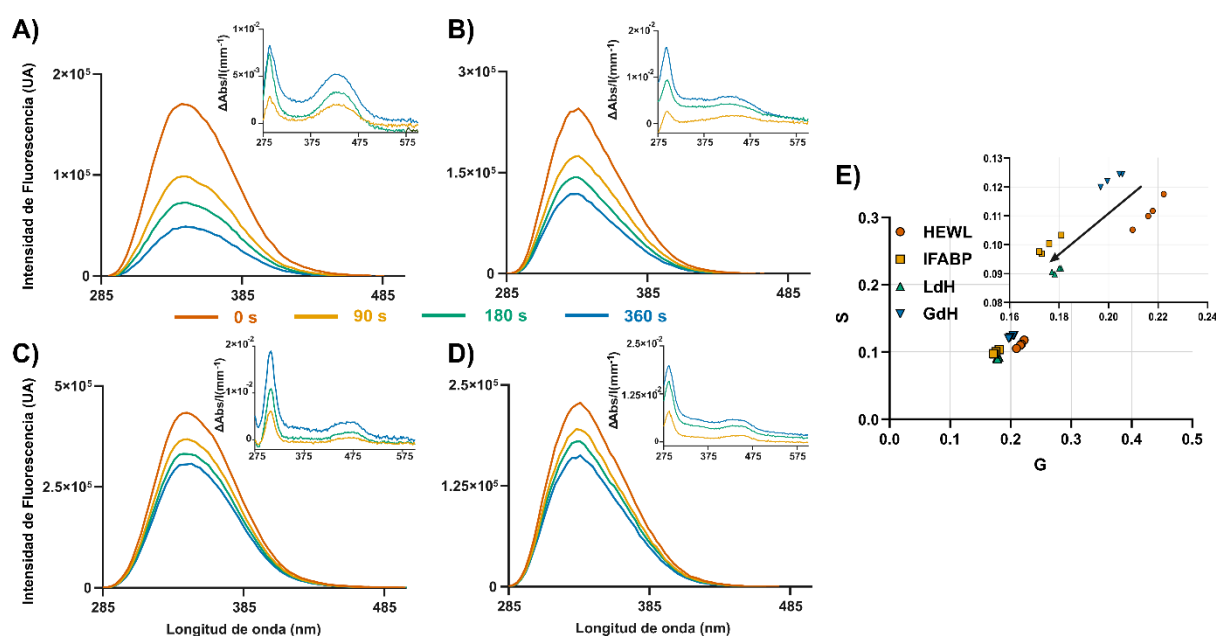


Figura 4-5. Foto-nitración de proteínas catalizada por el sistema $\text{Ru}(\text{bpy})_3\text{Cl}_2/\text{APS}/\text{NaNO}_2$. Espectros de emisión de fluorescencia ($\lambda_{\text{exc}} 275 \text{ nm}$) y diferenciales de absorbancia (gráficos internos) registrados durante la reacción de nitración de $250 \mu\text{g}/\text{ml}$ de HEWL (**A**), I-FABP (**B**), LDH (**C**) y GDH (**D**). Análisis de fasores de la nitración de proteínas (**E**).

Tabla 4-2. Composición de las proteínas modelo y estimación de la eficiencia de nitración

Proteína	Tyr/monómero	[Prot] (μM)	[Tyr] (μM)	$\Delta[\text{NitroTyr}]$ (μM)	$\Delta[\text{NitroTyr}] / [\text{Tyr}]$ (%)
HEWL	3	17,5	52,5	$17,3 \pm 0,7$	33 ± 2
I-FABP	4	16,6	66,4	$15,8 \pm 1,3$	24 ± 2
LdH (4)	7	1,7	47,6	$6,9 \pm 2,2$	14 ± 5
GdH (6)	18	0,8	86,4	$6,0 \pm 2,4$	7 ± 3

La nitración de residuos de Tyr se estimó basado en los cambios espectrales. El contenido de Tyr para cada proteína se indica por monómero. Los estados tetraméricos y hexaméricos para LdH y GdH, respectivamente, se indican entre paréntesis. La concentración de NitroTyr se estimó luego de 360 s de reacción y alcalinización 1:1 con NaHCO_3 . La concentración inicial de proteína fue $250 \mu\text{g}/\text{mL}$. Los resultados están expresados como media \pm SEM.

4.3.2- La nitración de proteínas fue confirmada y cuantificada mediante espectrometría de masas

Las modificaciones oxidativas de las proteínas fueron confirmadas por MS a nivel de aminoácidos. Las muestras irradiadas se digirieron con las proteasas Tripsina o Glu-C, y se analizaron luego mediante LC-MS/MS. Para este fin, se corrieron duplicados técnicos. Es importante destacar que la nitración de las muestras no afectó la cobertura de secuencia obtenida del análisis por MS. Las secuencias de las proteínas monoméricas (HEWL e I-FABP) fueron cubiertas por completo, mientras que para las proteínas multiméricas (LdH y GdH) se logró una cobertura del 78 % (Esquema 4-1).

HEWL (P00698, de *Gallus gallus*, fuente natural, forma madura: 3 Tyr, 6 Trp, 1 His, 8 Cys, 2 Met)
 Secuencia cubierta por MS/MS: **Tripsina** (99,3%); **Glu-C** (21,7%); Combinado (99,3%)

KVFGRC**EL**AAAM**KR**HGLDN**Y**R**G**Y**SLGN**W**VCAAKFESNFNTQATNRNTD**G**STD**Y**GILQINSR**W**WC**NDG**RTPGSRNL**C**NI**P**C**SA
 LLSSDITASV**N**CA**KKIVSDGNG**M**NA**W**Va**W**RNRCKGTDVQA**W**IRG**C**RL**

I-FABP (P02693, de *Rattus norvegicus*, recombinante : 4 Tyr, 2 Trp, 1 His, 0 Cys, 4 Met)
 Secuencia cubierta por MS/MS: **Tripsina** (71,2%); **Glu-C** (99,2%); Combinado (99,2%)

(M)AFDGT**W**KVDR**NEN**Y**EKF**ME**K**M**G**IN**VV**K**R**KL**GA**H**D**N**L**KL**TT**Q**E**GN**K**FT**V**K**ESS**N**FR**N**ID**V**F**EL**G**V**D**FA**Y**SL**AD**G**T**EL**T**GT**W**T
MEGNKLVGKFKRVDNGKELIAVREISGNELIQTY**T**Y**EG**VE**AK**RI**FK**KE

LdH (P13491, de *Oryctolagus cuniculus*, fuente natural: 7 Tyr, 6 Trp, 11 His, 5 Cys, 10 Met)
 Secuencia cubierta por MS/MS: **Tripsina** (78,0%); **Glu-C** (31,9%); Combinado (78,3%)

(M)A**AL**KD**QL**I**H**N**LL**K**EE**H**V**P**Q**N**K**IT**V**G**V**G**AV**G**MA**C**A**IS**L**M**K**D**L**A**DEL**A**L**V**D**V**M**E**D**K**L**K**G**E**MM**D**L**Q**H**G**S**L**FL**R**T**P**K**I**V**S**G**K**D**Y
 SVT**AN**SK**L**VI**T**A**G**A**R**Q**Q**E**G**E**S**R**L**N**L**V**Q**R**N**V**N**I**F**K**I**P**N**V**V**K**Y**SP**H**C**K**L**L**V**S**N**P**V**D**I**L**T**Y**V**A**W**K**I**S**G**F**P**K**N**R**V**I**G**S**G**C**N**L**D**S**A**R**F**R**Y**L**
MG**ER**L**G**V**H**A**L**S**CH**G**W**I**L**G**E**H**G**D**S**S**V**P**V**W**S**G**M**N**V**A**G**V**S**L**K**T**L**H**P**E**L**G**T**D**A**D**K**E**Q**W**K**Q**V**H**K**Q**V**D**S**A**Y**E**V**I**K**L**K**G**Y**T**T**W**A**I**G**
 L**S**V**A**D**L**A**E**S**I**M**K**N**L**R**R**V**H**P**I**S**T**M**L**K**G**L**Y**G**I**K**E**D**V**F**L**S**V**P**C**V**L**G**Q**N**G**I**S**D**V**V**K**V**T**L**T**S**E**E**E**A**H**L**K**K**S**A**D**T**L**W**G**I**Q**K**E**L**Q**F

GdH (P00366, de *Bos taurus*, fuente natural, forma madura: 18 Tyr, 4 Trp, 14 His, 6 Cys, 13 Met)
 Secuencia cubierta por MS/MS: **Tripsina** (69,9%); **Glu-C** (45,2%); Combinado (78,0%)

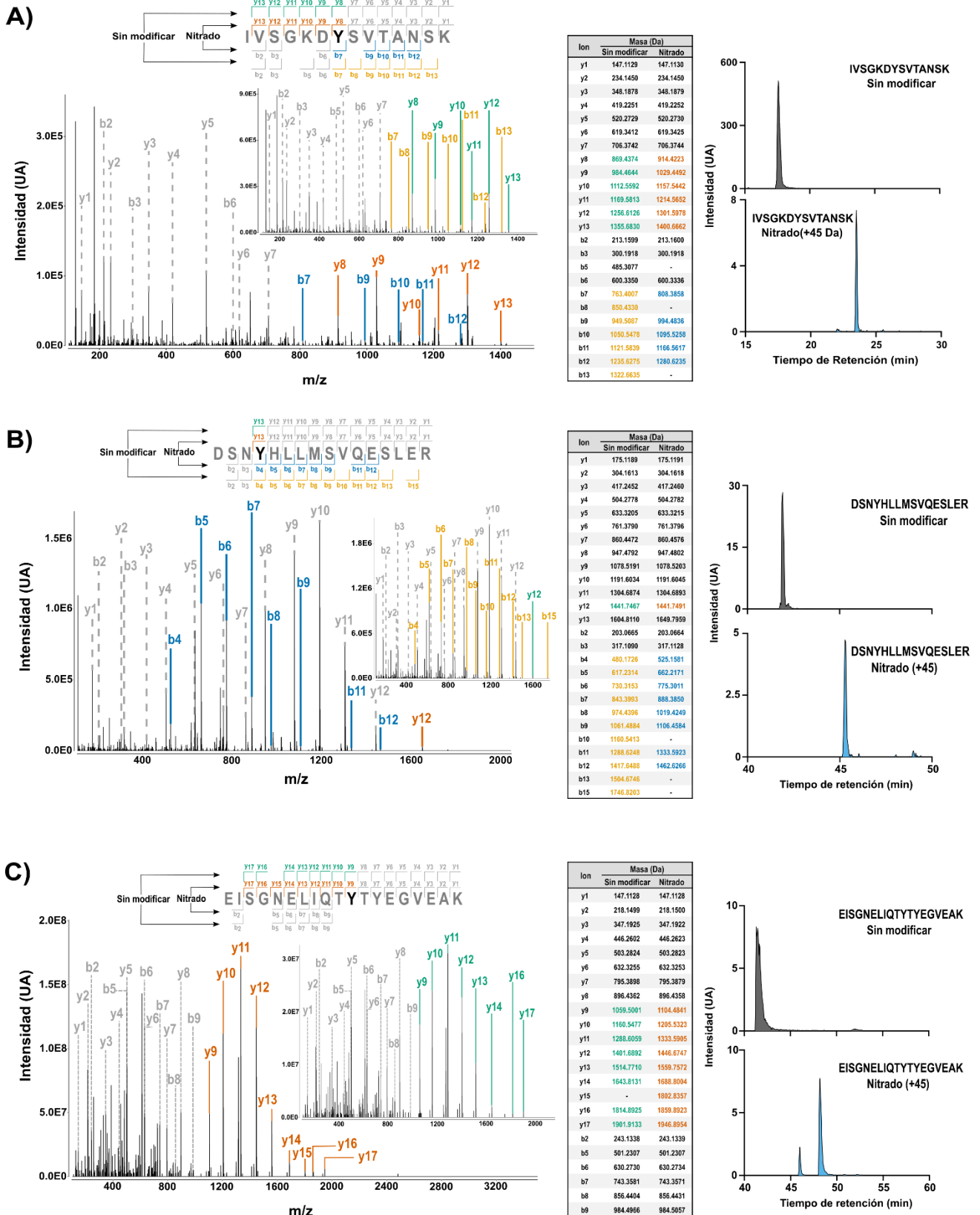
AA**A**D**R**E**D**D**P**N**F**F**K**M**V**E**G**F**F**D**R**G**A**S**I**V**E**D**K**L**V**E**D**L**K**T**R**E**T**E**E**Q**K**R**N**R**V**R**S**I**L**R**I**I**K**P**C**N**H**V**L**S**L**S**F**P**I**R**R**D**D**G**S**W**E**V**I**E**G**Y**R**A**Q**H**S**Q**H**R
TP**C**K**G**G**I**R**Y**S**T**D**V**S**V**D**E**V**K**A**L**A**S**L**M**T**Y**K**C**A**V**V**D**V**P**F**G**G**A**K**A**G**V**K**I**N**P**K**N**Y**T**D**N**E**L**E**K**I**T**R**R**F**T**M**E**L**A**K**K**G**F**I**G**P**G**V**D**V**P**A**P**D**M**S**T**G**E**
RE**M**S**W**I**A**D**T**Y**A**S**T**I**G**H**Y**D**I**N**A**H**A**C**V**T**G**P**I**S**O**G**G**I**H**G**R**I**S**A**T**G**R**G**V**F**H**G**I**E**N**F**I**N**E**A**S**Y**M**S**I**L**G**M**T**P**G**F**G**D**K**T**F**V**Q**G**F**G**N**V**L**H**S**
MR**Y**L**H**R**F**G**A**K**C**I**T**V**G**E**S**D**G**S**I**W**N**P**D**G**I**D**P**K**E**L**E**D**F**K**L**Q**H**G**T**I**L**G**F**P**K**A**K**I**Y**E**G**S**I**L**E**V**D**C**D**I**L**I**P**A**A**S**E**K**Q**L**T**K**S**N**A**P**R**V**K**A**K**I**A**E**G**A**N**
GP**T**T**E**A**D**K**I**F**L**E**R**N**I**M**V**I**P**D**L**Y**L**N**A**G**G**V**T**V**S**Y**F**E**W**L**N**L**N**L**N**H**V**S**Y**G**R**L**T**F**K**Y**E**R**D**S**N**Y**H**L**L**M**S**V**Q**E**S**L**E**R**K**F**G**K**H**G**G**T**I**P**I**V**P**T**A**E**F**
QD**R**I**S**G**A**S**E**K**D**I**V**H**S**G**L**A**Y**T**M**E**R**S**A**R**Q**I**M**R**T**A**M**K**Y**N**L**G**L**D**L**R**T**A**A**Y**V**N**A**I**E**K**V**F**R**V**Y**N**E**A**G**V**T**F**T**

Esquema 4-1. Secuencias cubiertas por el análisis MS/MS para proteínas tratadas y no tratadas. Las proteínas fueron digeridas con las proteasas Tripsina (**azul**) y Glu-C (**subrayado**). Las secuencias cubiertas se destacan, además, en negrita. La cobertura de secuencia combinada fue 99 % para las proteínas monoméricas y 78 % para las multiméricas. Para I-FABP y LdH, la primer Met (indicada entre paréntesis) no fue identificada, probablemente debido a la remoción del residuo del N-terminal luego de la síntesis. Por otro lado, se destacan los aminoácidos potencialmente sensibles a la oxidación y nitración con un mayor tamaño de letra.

Los residuos nitrados se identificaron debido a la diferencia de masa de +45 Da en los fragmentos de iones *y* y *b* derivados de los péptidos producidos por la digestión con proteasas. Se identificaron péptidos nitrados en todas las proteínas, conteniendo NitroTyr o NitroTrp. Así, los diferentes paneles de la **Fig. 4-6** muestran ejemplos de péptidos identificados como nitrados en LdH,

GdH, LdH y HEWL. Como ejemplo, la diferencia de masa de +45 Da especificadas para los fragmentos *y8-y13* (naranja) y *b7, b9-b12* en el péptido de LdH I⁷⁷VSGKDYSVTANSK⁹⁰ modificado (**Fig. 4-6A**), confirman la nitración de Y₈₃. Además, los cromatogramas de iones extraídos para las versiones nitrada y no modificada de este péptido mostraron una clara diferencia en el tiempo de retención (>6 min), lo que está relacionado con un incremento en la hidrofobicidad del péptido debido a la presencia del residuo nitrado [220]. Todos los péptidos nitrados eluyeron a tiempos de retención mayores (>3 min) que la versión no modificada.

Calculamos el grado de modificación a nivel de residuo en todas las proteínas usando el área bajo la curva de los cromatogramas de iones extraídos (XICs) [190]. Los resultados se grafican en la **Fig. 4-7** y se encuentran resumidos en la **Tabla 4-3**. Para muestras de 300 µg/mL proteína que fueron irradiadas por 200 s, el grado de nitración de los residuos de Tyr (RNR) fue menor al 20 % con la excepción de Y₇₁ e Y₁₅ en I-FABP (29,8 % y 23,1 %, respectivamente) e Y₃₈/Y₄₁ (23,5 %) en HEWL. Sin embargo, el grado de nitración varió ampliamente en cada una de las proteínas; y, para ciertas posiciones, no se detectó que fueran sensibles al tratamiento. Por ejemplo, en LdH los residuos con grado mayor y menor de modificación fueron Y₂₃₉ (13,5 %) e Y₈₃ (<1 %), respectivamente. Con la excepción de los descritos antes, encontramos valores similares para otros residuos de Tyr en el resto de las proteínas: Y₇₁, 4,1 % (HEWL); Y₁₁₈/Y₁₂₀, 17,3 % (I-FABP); Y₄₆₄, 18,2 %, e Y₁₅₂, menos de 1 % (GdH). En el caso de péptidos isobáricos (misma masa, M+45 Da) que contenían dos residuos posiblemente nitrados, no fue posible cuantificar el grado de modificación por separado debido a que estos péptidos co-eluyen. Así, se observó un grado de modificación aparente con valores elevados para los residuos Y₃₈/Y₄₁ 47,1 % en HEWL e Y₁₁₈/Y₁₂₀ 34,6 % en I-FABP, en comparación con péptidos con 1 sólo residuo nitrado. Sin embargo, si asumimos una contribución equivalente para cada residuo al cálculo del grado de modificación total, los resultados se ajustan al rango de grado de modificación obtenido para los demás residuos de Tyr en estas proteínas.



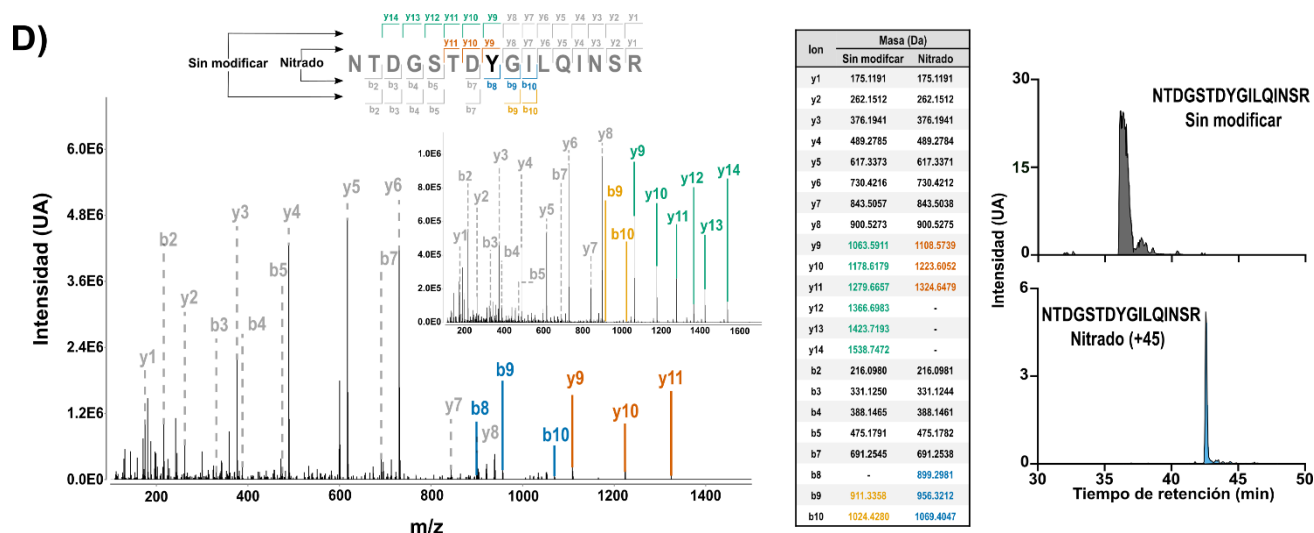


Figura 4-6. Identificación de residuos nitrados por LC-MS/MS. Espectros MS/MS representativos de muestras nitradas y no tratadas, tabla de comparación de masas de los fragmentos *y* y *b* y cromatogramas extraídos para péptidos seleccionados: **(A)** LdH, ⁷⁷IVSGKDYSVTANSK⁹⁰; **(B)** GdH, ⁴⁶¹DSNYHLLMSVQESLER⁴⁷⁶; **(C)** I-FABP, ¹⁰⁸EISGNELIQTYYEGVEAK¹²⁷; y **(D)** HEWL, ⁶⁴NTDGSTDYGILAINSR⁷⁹. Los residuos de Tyr destacados en negrita fueron identificado como nitrados.

También investigamos la nitración de los residuos de Trp en detalle, y los péptidos y residuos identificados y cuantificados se listan en la **Tabla 4-3**. En general, la nitración de Trp fue menos eficiente que la de Tyr, con valores de RNR no mayores al 5 % en todas las proteínas evaluadas. Los residuos de Trp más nitrados para cada una de las proteínas fueron: W₃₃₈ 3,8 % en GdH; W₇ <1 % in I-FABP; W₃₂₄ 1,5 % en LdH; y W₁₄₁ 4 % en HEWL. Además, para el caso del péptido ¹²⁵DDGSWEVIEGYR¹³⁶ en GdH, se encontró evidencia de que este puede nitrarse tanto en Tyr como en Trp, con un grado de modificación total del 7,5 %. Sin embargo, el grado de modificación de Y₁₃₅ equivale al 90 % del grado de modificación total, y sólo el 10 % restante al RNR de W₁₂₉ (**Tabla 4-3**). De acuerdo con Nuriel y col., la nitración de Trp es menos eficiente que la de los residuos de Tyr debido a tres factores principales. Además de su baja frecuencia en proteínas (aproximadamente 1 %) y su mayor hidrofobicidad (que conlleva una menor exposición al solvente), un mayor potencial redox de los residuos de Trp (1,015 V) comparado con el de Tyr (0,93 V) sería parcialmente responsable de una menor susceptibilidad al tratamiento [218].

Tabla 4-3. Identificación y cuantificación libre de marca del grado de modificación de proteínas sometidas a la foto-oxidación en presencia de Ru(bpy)₃Cl₂, APS y NaNO₂

Proteína / Secuencia peptídica	Proteasa	Secuencia cubierta (clivaje errado)	Aminoácido modificado	Modificación de Residuo (%)	
				No tratada	Tratada (RNR %)
Glutamato deshidrogenasa (GdH)					
MVEGFFDR	Tripsina	69-76	M ₆₉	9,6 ± 0,1	25,4 ± 0,5
DDGSWEVIEGYR	Tripsina	125-136	W ₁₂₉ Y ₁₃₅	13 ± 2 -	25 ± 1 (0,6 ± 0,1) 7 ± 1 (7 ± 1)
YSTDVSVDEVK	Tripsina	152-162	Y ₁₅₂	-	0,5 ± 0,1 (0,5 ± 0,1)
ALASLMTYK	Tripsina	163-171	M ₁₆₈ Y ₁₇₀	18,0 ± 0,3 0,4 ± 0,0	27 ± 2 2,5 ± 0,3 (0,2 ± 0,1)
NYTDNELEK	Tripsina	192-200	Y ₁₉₃	-	1,2 ± 0,2 (1,2 ± 0,2)

Optimización de protocolos de modificación fotoquímica

RFTMELAKK	Tripsina	204-212 (2)	M ₂₀₇	1,9 ± 0,8	12,2 ± 0,2
LAKKGFIGPVDVPAADMSTGERE	Glu-C	209-232 (3)	M ₂₂₆	20,6 ± 0,7	19,1 ± 0,5
EMSWIADTYASTIGHYDINAHACVTGKPISQGGIHDR	Tripsina	232-268	M ₂₃₃	2,8 ± 0,7	7,3 ± 0,2
			W ₂₃₅	12,1 ± 0,6	20 ± 1 (NN)
			Y ₂₄₇	-	1,9 ± 0,1 (1,9 ± 0,1)
YLHRFGAK	Tripsina	319-326 (1)	Y ₃₁₉	-	11,7 ± 0,6 (11,7 ± 0,6)
SDGSIWNPDPGIDPKELE	Glu-C	333-349 (3)	W ₃₃₈	10,6 ± 0,1	21,0 ± 0,2 (3,8 ± 0,1)
DFKLQHGTLGFPKAKIYE	Glu-C	350-368 (1)	Y ₃₆₇	<0,1	18 ± 2 (18 ± 2)
LTFKYER	Tripsina	454-460 (1)	Y ₄₅₈	-	0,5 ± 0,1 (0,5 ± 0,1)
DSNYHLLMSVQESLERKFGKHGGTIPIVPTAEFQDR	Tripsina	461-496 (3)	Y ₄₆₄	-	18 ± 1 (18 ± 1)
			M ₄₆₈	11 ± 1	42 ± 3
			Y ₅₁₂	1,0 ± 0,1	6,3 ± 0,1 (5,7 ± 0,1)
ISGASEKDIVHSGLAYTMER	Tripsina	497-516 (1)	M ₅₁₄	7,3 ± 0,1	14,2 ± 0,1
			M ₅₂₆	18 ± 1	15,9 ± 0,4
TAMKYNLGLDLR	Tripsina	524-535 (1)	Y ₅₂₈	-	1,6 ± 0,2 (1,6 ± 0,2)
TAAYVNAIEK	Tripsina	536-545	-	-	-
VYNEAGVTFT	Tripsina	549-558	Y ₅₅₀	-	1,7 ± 0,2 (1,7 ± 0,2)
Proteína de unión a ácidos grasos Intestinal (I-FABP)					
AFDGTWK	Tripsina	2-8	W ₇	13 ± 3	14,3 ± 2,9 (0,61 ± 0,01)
NYEKFME	Glu-C	14-20 (1)	Y ₁₅	-	23,1 ± 0,9 (23,1 ± 0,9)
			M ₁₉	4 ± 2	18,2 ± 0,6
MGINVVK	Tripsina	22-28	M ₂₂	5,8 ± 0,1	18,1 ± 0,1
LGVDFAVSLADGTE	Glu-C	65-78 (2)	Y ₇₁	-	31,6 ± 0,7 (29,8 ± 0,5)
LTGTWMEGNKLVGKFKRVDNGKE	Glu-C	79-102 (2)	W ₈₃	12,9 ± 0,3	20 ± 1 (NN)
			M ₈₅	19 ± 2	14 ± 3
			Y ₁₁₈	(<0,1)	(17,5 ± 0,3) (17,3 ± 0,3)
EISGNELIQTYYEGVEAK	Tripsina	108-127	Y ₁₂₀	(<0,1)	(17,5 ± 0,3) (17,3 ± 0,3)
Lactato deshidrogenasa (LdH)					
DLADELALVDVMEDKLK	Tripsina	43-59 (1)	M ₅₄	48 ± 8	16 ± 4
LKGEMDLQHGSLFLR	Tripsina	58-73 (1)	M ₆₂	(15,2 ± 0,3)	(16 ± 3)
			M ₆₃	(15,2 ± 0,3)	(16 ± 3)
IVSGKDYSVTANSK	Tripsina	77-90 (1)	Y ₈₃	-	0,9 ± 0,1 (0,5 ± 0,1)
NVNIFKFIIPNVVYSPHCK	Tripsina	113-132 (2)	Y ₁₂₇	2,8 ± 0,6	6,7 ± 0,5 (4,1 ± 0,1)
FRYLMGER	Tripsina	170-177	Y ₁₇₂	-	0,5 ± 0,1 (0,5 ± 0,1)
			M ₁₇₄	7,2 ± 0,5	9,1 ± 0,2
LGVHALSCHGWILGEHGDSSVPVWSGMNVAGVSLK	Tripsina	178-212	W ₂₀₁	5,5 ± 0,1	15,4 ± 0,1 (NN)
			M ₂₀₄	9 ± 1	18 ± 2
TLHPELGTDADKEQWK	Tripsina	213-228 (1)	W ₂₂₇	11,6 ± 0,8	14,4 ± 0,4 (0,1 ± 0,0)
QVVDSEYEVK	Tripsina	233-243	Y ₂₃₉	-	13,5 ± 0,5 (13,5 ± 0,5)
VHPISTMLK	Tripsina	270-278	-	-	-
SADTLWGIQK	Tripsina	319-328	W ₃₂₄	14,3 ± 0,4	18,4 ± 0,6 (1,5 ± 0,1)
Lisozima (HEWL)					
CELAAAMKR	Tripsina	24-32 (1)	M ₃₀	6 ± 2	10 ± 2
HGLDNYRGLSLGNWVCAAKFESNFNTQATNR	Tripsina	33-63 (2)	Y ₃₈	-	(23,5 ± 0,5) (23,5 ± 0,5)
			Y ₄₁	-	(23,5 ± 0,5) (23,5 ± 0,5)
			W ₄₆	6,3 ± 0,5	12,9 ± 0,4 (NN)
NTDGSTDYGIQINSR	Tripsina	64-79	Y ₇₁	-	4,3 ± 0,1 (4,1 ± 0,1)
WVCNDGRTPGSR	Tripsina	80-91 (1)	W ₈₀	(14 ± 2)	(21 ± 1) (3,9 ± 0,1)
			W ₈₁	(14 ± 2)	(21 ± 1) (3,9 ± 0,1)
			M ₁₂₃	11,2 ± 0,2	22 ± 3
KIVSDGNGMNAVWAVRNR	Tripsina	115-132 (2)	W ₁₂₆	(2,3 ± 0,3)	(14,2 ± 0,9) (0,3 ± 0,0)
			W ₁₂₉	(2,3 ± 0,3)	(14,2 ± 0,9) (NN)
			W ₁₄₁	6,5 ± 0,1	17,7 ± 0,6 (4,0 ± 0,1)

La numeración de los péptidos y residuos para cada proteína está basada en la secuencia completa de acuerdo con los archivos FASTA obtenidos de la base de datos de Uniprot. Las modificaciones variables consideradas para la cuantificación fueron: +45 Da (nitrición, +1N +2O), y +16 Da (hidroxilación, +1O) para Tyr; +45 Da, +16 Da, +32 Da (oxidación, +2O), +14 Da (Oxolactona, -2H +1O) and +4 Da (quinurenina, +1O -1C) para Trp; y +16 Da para Met. No se detectaron modificaciones de Cys luego del tratamiento con DTT+IAA. Tampoco se detectó nitrición en residuos de His. Se asociaron espectros MS/MS a la oxidación de His (+1O), pero estos fueron pocos, esporádicos y su cuantificación fue difícil. En los casos que fue posible, no se observaron diferencias entre la muestra tratada y no tratada. Los valores que se muestran entre corchetes corresponden a residuos dentro de un mismo péptido para los que no fue posible cuantificar grados de modificación individuales; con lo cual se considera una contribución equitativa de cada residuo. Los valores entre paréntesis y en negrita indican el RNR (%) calculado luego de la aplicación del sistema foto-inducible. También indican residuos de Trp para los que no se detectó la nitrición (NN).

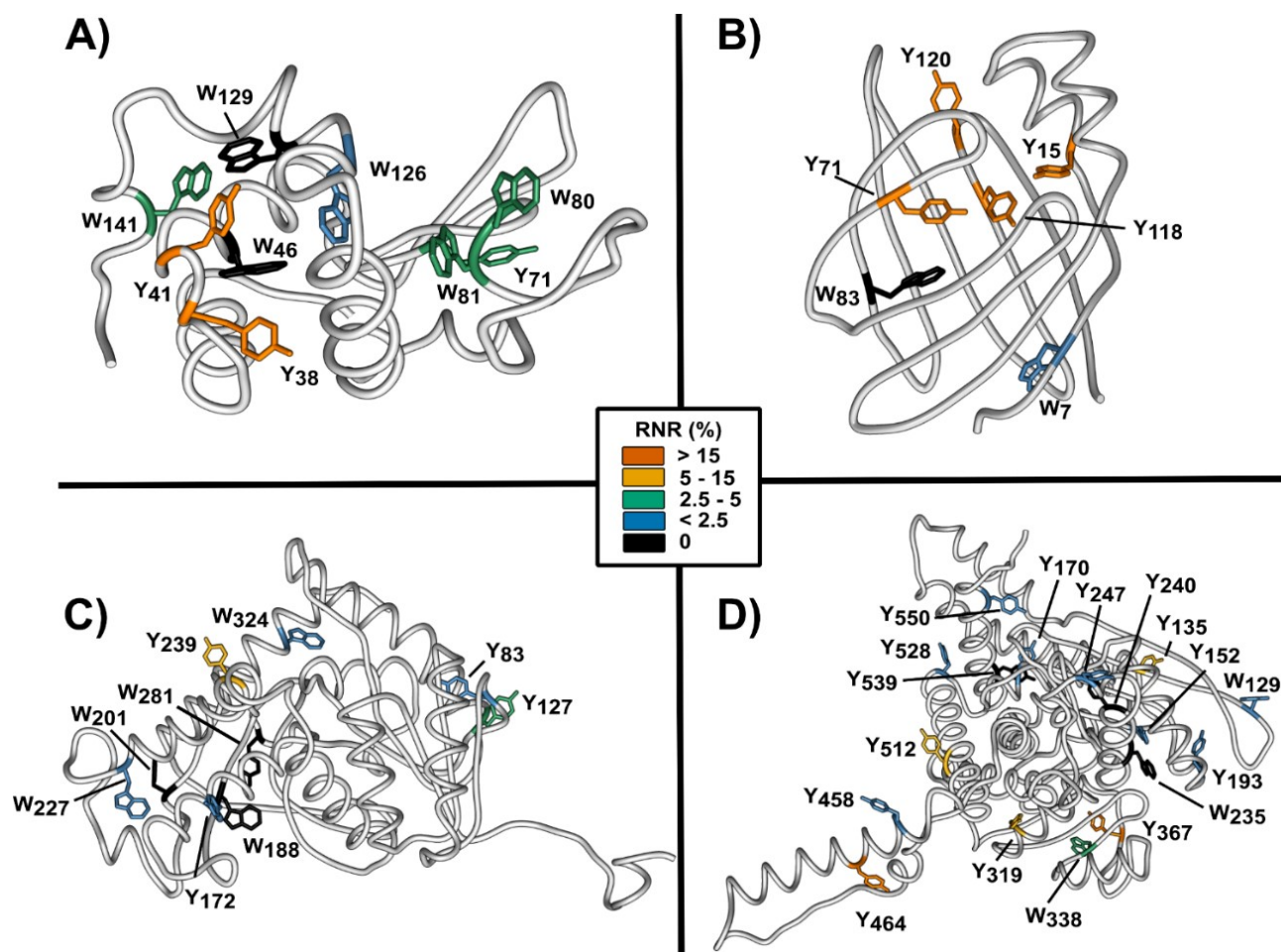


Figura 4-7. Representación gráfica de la estimación del grado de nitración. Los residuos de Tyr y Trp se muestran coloreados de acuerdo al RNR (%) estimado para las cuatro proteínas: **(A)** HEWL (PDB 6RXI); **(B)** I-FABP (PDB 1IFB); **(C)** LdH (PDB 5NQQ); y **(D)** GdH (PDB 6DHD). Para GdH y LdH, se muestra un sólo monómero componente de la estructura oligomérica.

4.3.3- Características estructurales modulan el grado de nitración de residuos específicos

Para explorar otros factores que pueden explicar la susceptibilidad de los residuos al sistema foto-inducible, evaluamos la relación entre el RNR y la accesibilidad o la exposición de los residuos, estimada como el área superficial accesible al solvente relativa (RSA). De esta forma obtuvimos la superficie accesible al solvente (SASA) a partir de las estructuras del PDB 6DHD (GdH), 1IFB (I-FABP), 5NQQ (LdH) y 6RXI (HEWL) y estimamos la RSA a partir de ella, para todos los residuos de Tyr y Trp. A modo de ejemplo, se muestra la visualización de la relación entre la RSA y RNR para HEWL (**Fig. 4-8A**) y se detallan los valores obtenidos para las cuatro proteínas en la **Tabla 4-4**. Como se muestra en la **Fig. 4-8B**, se observó que la nitración de Tyr presenta una buena correlación con la RSA para los casos de HEWL y LdH. A pesar de que los residuos de I-FABP presentaron valores de RNR mayores a los esperados, esto puede ser explicado por su estructura hueca y por presentar alta flexibilidad conformacional. Por otro lado, GdH mostró resultados más dispersos, con algunos

residuos, aparentemente inaccesibles al solvente según su RSA (como Y₂₄₇ e Y₃₁₉), con mayor grado de modificación que otros más expuestos (Y₁₉₃ e Y₅₂₈). Para el caso de Trp, la nitración fue, en términos generales, menos eficiente que la modificación de Tyr, aún en casos con residuos con RSA similares (como en los pares Y_{38/41} y W_{80/81}, HEWL). Sin embargo, se observó una fuerte correlación entre RNR y RSA en HEWL, LdH y GdH (Fig. 4-8C).

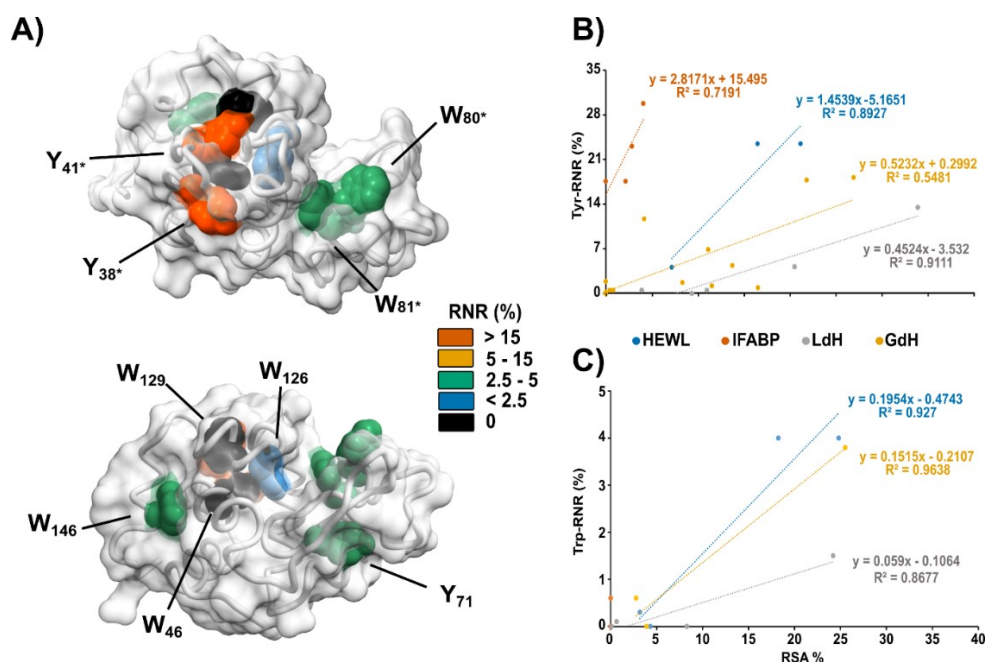


Figura 4-8. Relación entre RNR (%) y la superficie expuesta al solvente de residuos aromáticos. (A) Visualización de la correlación entre RNR y SASA para residuos de HEWL. La superficie expuesta al solvente estimada se muestra con un 50 % de transparencia. Para los residuos de Tyr y Trp se representan sus respectivos radios de Van de Waals, siguiendo el código de color según su RNR. * indica residuos cuyo RNR no fue cuantificado individualmente. La correlación entre RNR y RSA (%) se presenta para Tyr (B) y Trp (C) para las proteínas modelo. Sólo se grafican residuos identificados en los experimentos de LC-MS/MS.

Tabla 4-4. Comparación entre los RNR (%) de Tyr y Trp y su superficie expuesta al solvente (SASA y RSA)

Prot./Aminoácido	SASA Promedio (Å ²)	RSA %	RNR %
GdH			
Y ₁₃₅	29,9	11,4	6,9
Y ₁₅₂	1,2	0,4	0,5
Y ₁₇₀	0	0	0,2
Y ₁₉₃	31	11,8	1,2
Y ₂₄₀	0	0	NN
Y ₂₄₇	0	0	1,9
Y ₂₈₉	7,6	2,9	NI
Y ₃₁₉	11,2	4,3	11,7
Y ₃₆₇	58,7	22,3	17,8
Y ₄₂₉	0	0	NI
Y ₄₃₉	2,2	0,8	NI
Y ₄₅₁	4,8	1,8	NI

Y ₄₅₈	2,1	0,8	0,5
Y ₄₆₄	72,4	27,5	18,2
Y ₅₁₂	37	14,1	5,7
Y ₅₂₈	44,4	16,9	0,9
Y ₅₃₉	0	0	NN
Y ₅₅₀	22,4	8,5	1,7
W ₁₂₉	8,1	2,9	0,6
W ₂₃₅	11,5	4	NN
W ₃₃₈	75,1	26,3	3,8
W ₄₄₂	2,7	1	NI

I-FABP

Y ₁₅	7,6	2,9	23,1
Y ₇₁	11	4,2	29,8
Y ₁₁₈	0	0	(17,6)
Y ₁₂₀	6,3	2,2	(17,6)
W ₇	0	0	0,6
W ₈₃	0	0	NN

LdH

Y ₈₃	10,5	4	0,5
Y ₁₂₇	55,1	21	4,2
Y ₁₄₅	12,3	4,7	NI
Y ₁₇₂	29,5	11,2	0,5
Y ₂₃₉	91,1	34,6	13,5
Y ₂₄₇	79,6	30,3	NI
Y ₂₈₁	25,1	9,6	NN
W ₁₄₈	37,4	13,1	NI
W ₁₈₈	0,3	0,1	NN
W ₂₀₁	24,4	8,6	NN
W ₂₂₇	1,9	0,7	0,1
W ₂₅₀	17,6	6,2	NI
W ₃₂₄	71,2	25	1,5

HEWL

Y ₃₈	56,9	21,6	(23,5)
Y ₄₁	44,3	16,9	(23,5)
Y ₇₁	19,3	7,3	4,1
W ₄₆	0	0	NN
W ₈₀	118,7	41,6	(3,9)
W ₈₁	27,4	9,6	(3,9)
W ₁₂₆	9,4	3,3	0,3
W ₁₂₉	12,7	4,5	NN
W ₁₄₁	53,7	18,8	4,0

Los parámetros SASA y RSA fueron calculados para residuos de Tyr y Trp usando el software Surface Racer 5.0 basado en las estructuras obtenidas del PDB 6DHD (GdH), 1IFB (I-FABP), 5NQQ (LdH) y 6RXI (HEWL). Para el caso de las proteínas oligoméricas, los valores de SASA informados son el promedio de todos los monómeros reportados. Para la estimación de RSA %, los valores SASA fueron normalizados por las áreas máximas accesibles teóricas calculadas por Tien y col. [191] y expresados como porcentaje. NI indica residuos no cubiertos por el análisis por LC-MS/MS. NN indica residuos que fueron identificados en el análisis, pero no como nitrados en las muestras tratadas. Valores entre paréntesis indican residuos cuyos RNR no fue posible estimarlos individualmente.

A pesar de que el contacto entre el fotosensibilizador y el sustrato pareciera ser crítico, nuestros resultados sugieren que, además de las características estructurales, otros factores también podrían ser relevantes para explicar la susceptibilidad de los residuos aromáticos al sistema foto-inducible. Por ejemplo, Souza y col. han propuesto que la estructura secundaria y la carga de los aminoácidos vecinos pueden jugar un rol decisivo en la nitración de HEWL con peroxinitrito [221]. Dado que estos factores son específicos de cada proteína y dependientes del ambiente que rodea los residuos aromáticos, así como también de su secuencia, un análisis más detallado del impacto de estos factores en las proteínas modelo se detalla a continuación.

- *Lisozima (Uniprot P00698, Gallina)*

Es una proteína monomérica pequeña con actividad 1,4- β -N-acetilmuramidasa que se pliega en una estructura compacta y globular. Con 129 residuos, su forma madura muestra una estructura secundaria que involucra 6 α -hélices y 3 hojas- β , unidas por giros y vueltas, que constituyen los dominios α y β . La forma madura posee 6 Trp, 3 Tyr, una His, 2 Met e incluso 8 residuos de Cys, los cuales forman 4 puentes disulfuro, estabilizando la estructura nativa de esta proteína. HEWL fue una de las primeras proteínas cristalizadas [222] y, dado que es fácilmente obtenible, ha sido una proteína modelo empleada en numerosos estudios de estructura y fotoquímica [223–225]. En relación con su nitración *in vitro*, ha sido evaluada utilizando otros sistemas de nitración como peroxinitrito, peroxinitrito/CO₂, mieloperoxidasa (MPO)/H₂O₂/NO₂⁻ y tetranitrometano [221,226–228], con resultados similares a los obtenidos en este trabajo en términos del patrón de nitración de Tyr y Trp. En particular, el uso del sistema Ru(bpy)₃⁺²/APS/NO₂⁻ permitió la nitración de los 3 residuos de Tyr (con altos grados de modificación para 2 de ellos), y de 4 (de 6) residuos de Trp (**Fig. 4-7A**). Como se mencionó anteriormente, las diferencias en la nitración pueden ser explicadas en términos de la accesibilidad al solvente, la estructura secundaria y las cargas de los aminoácidos cercanos [221]. En nuestro análisis, se observó que los residuos Y₃₈ e Y₄₁, situados en una vuelta expuesta al solvente, son más susceptibles a la nitración que Y₇₁. Específicamente, el grado de nitración del par Y₃₈/Y₄₁ se correlaciona directamente con una mayor área expuesta al solvente (~50 Å², en promedio); mientras que Y₇₁, al estar localizado en una hoja- β con accesibilidad del solvente reducida (19 Å²), presentó un menor grado de modificación (**Fig. 4-7A** y **Tabla 4-4**). Además, la interferencia electrostática por el residuo R₈₅ (el cual fue previamente asociado a la baja efectividad de nitración de Y₇₁ usando peroxinitrito), puede ser también responsable de la repulsión del Ru(bpy)₃⁺² y, por lo tanto, del bajo RNR obtenido en este estudio.

Por otro lado, los cálculos de SASA (y RSA) para los residuos de Trp mostraron una correlación directa con RNR, siendo W₈₀ y W₁₄₁ los residuos más nitrados, mientras que W₄₆, marginado al interior de la estructura proteica, no fue identificado como nitrado. A pesar de que no fue posible cuantificar los valores individuales de RNR de los residuos W₈₀ y W₈₁, el mayor número

de eventos de secuenciación (espectros de MS/MS) asociados a W_{80} sugiere que este residuo podría ser más susceptible que W_{81} . Esto también se correlaciona con los valores de SASA (118 y 27 Å², respectivamente). Una vez más, la accesibilidad al solvente podría no ser el único factor que dicta la nitración de los residuos mediante el sistema foto-inducible que aplicamos. Aunque fueron identificados como nitrados, los residuos de Trp presentaron bajos valores de RNR, incluso cuando el RSA calculado fue similar al de residuos de Tyr (ver Tabla 4-4). La proximidad de residuos cargados, como R_{79} a W_{80} y W_{81} o R_{127} a W_{126} (de manera similar que R_{85} e Y_{71}), puede ser un factor determinante para los bajos RNR observados. Sin embargo, un estudio más detallado muestra que la oxidación de estos residuos parece prevalecer por sobre la nitración (ver más adelante). Es importante destacar que, basados en datos cristalográficos, W_{80} , W_{81} y W_{126} han sido propuestos como residuos involucrados en el sitio de unión a sustrato vía la interacción anillo aromático-azúcar [229], lo que podría indicar que estos residuos serían más accesibles de lo estimado gracias a cierta flexibilidad conformacional. Por lo tanto, la modificación de estos residuos merece una atención especial.

- *Proteína de Unión a ácidos grasos intestinal (Uniprot P02693, Rata)*

Es una proteína intracelular pequeña (14 kDa) presente en enterocitos intestinales de mamíferos e involucrada en la absorción, transporte y metabolismo de ácidos grasos [230]. Al contrario que HEWL, adopta una estructura hueca, caracterizada por un barril β , que consiste en 10 hojas- β antiparalelas, con una tapa formada por un segmento de hélice-giro-hélice que cierra el sitio de unión del ácido graso [231,232]. Particularmente, la secuencia de I-FABP de rata incluye 2 Trp, 4 Tyr, y 3 residuos de Met, pero ninguno de Cys. Dado que los residuos aromáticos están principalmente localizados en el barril, como parte del núcleo hidrofóbico y/o del sitio de unión a ligando, con sus cadenas laterales mirando la cavidad interna, no sorprende que los residuos de Tyr y Trp son, en principio, inaccesibles al solvente (Tabla 4-4) y teóricamente no disponibles para nitración. Sin embargo, Koeck y col. reportaron la nitración de FABP de adipocito de ratón usando peroxinitrito [233]. En nuestro estudio, la aplicación del sistema foto-inducible de nitración permitió la nitración de todos los residuos de Tyr y W_7 , a pesar de su aparente inaccesibilidad (**Fig. 4-7B**). Esto puede ser explicado basándonos en la alta flexibilidad que se cree que es necesaria para la entrada y salida del ligando/ácido graso a la cavidad. El movimiento de la región portal, que incluye el segmento hélice-giro-hélice y los giros- β CD y EF, y/o la hendidura en la estructura del barril entre las hojas βE and βD , actuarían como puertas dinámicas [234] y facilitarían la accesibilidad a los residuos aromáticos y el contacto con $Ru(bpy)_3^{+2}$ y radicales $\bullet NO_2$, promoviendo su nitración. Por ejemplo, Y_{71} , el cual presenta una alta susceptibilidad a la nitración (RNR 30 %), está localizado en la hoja βE . Además, Y_{118} e Y_{120} también presentaron altos grados de nitración. Estos resultados podrían ser atribuidos a la presencia del residuo E_{121} , expuesto al solvente (80 Å²) y localizado en el

giro entre las hojas β I y J, cuya carga negativa podría incrementar la concentración local de iones $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{+3}$.

-Lactato deshidrogenasa (Uniprot P13491, Subunidad cadena A/M, Conejo)

La isoforma de músculo de conejo es una oxidoreductasa homotetramérica que cataliza la oxidación reversible de L-lactato a piruvato, empleando NAD^+ como cofactor. Está caracterizada por presentar una estructura secundaria conocida como plegamiento de Rossmann (importante para la unión del dinucleótido), que involucra 2 hojas- β rodeadas por α -hélices en cada monómero [235]. Presenta numerosos residuos aromáticos, 6 Tyr y 7 Trp, así como también 5 Cys reducidas (no involucradas en puentes disulfuro) y 9 residuos de Met. Debido a su rol central en el metabolismo celular manteniendo la homeostasis del par redox NADH/NAD^+ , algunas PTM han sido asociadas al desarrollo de condiciones patológicas. Por ejemplo, la fosforilación de Tyr y la acetilación de Lys han sido asociadas a la reprogramación metabólica en células cancerosas [236] y la nitración de Tyr ha sido identificada en muestras de pacientes con Alzheimer [237]. Además, el modelado *in vitro* de condiciones de nitración en células PC12 tratadas con peroxinitrito mostró que la LdH es susceptible a la nitración, donde se identificaron varios residuos aromáticos nitrados como Y_{83} , Y_{145} , W_{227} , Y_{239} , Y_{247} y W_{324} [238]. En nuestro estudio, la nitración foto-inducida por $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{+2}$ mostró grados de modificación que se correlacionan con la superficie expuesta al solvente (SASA) para cada residuo, resultado que es particularmente notorio para Y_{239} (13,5 %) e Y_{127} (4,1 %), los cuales presentan valores de SASA de 91,1 y 55,1 \AA^2 , respectivamente (**Fig. 4-7C** y **Tabla 4-4**). Se ha sugerido que la nitración de residuos de Tyr podría ser promovida por aminoácidos ácidos cercanos [239]. Por lo tanto, E_{240} podría ser responsable del grado de nitración de Y_{239} , junto con el área de exposición al solvente elevado de este último residuo. Por el contrario, a pesar de que Y_{83} se encuentra adyacente a D_{82} , su bajo valor de SASA (10,5 \AA^2) podría ser un factor decisivo para la baja efectividad de nitración observada. Tal como se mencionó antes, los residuos básicos podrían tener un efecto negativo. Como ejemplo, la nitración de Y_{172} se vio particularmente afectada, a pesar de estar parcialmente accesible al solvente. Su bajo grado de nitración podría ser explicado por la presencia de R_{170} , probablemente repeliendo iones $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{+3}$. De manera similar a lo que se describió para el caso de HEWL e I-FABP, la nitración de residuos de Trp no fue detectada o los valores de RNR fueron significativamente menores a los de Tyr. Sin embargo, aunque los valores de RSA de W_{324} e Y_{239} son comparables (34,6 % y 25 %, respectivamente), el último residuo presentó un grado de modificación aproximadamente 10 veces superior (1,5 % vs. 13,5 %), lo que sugeriría que los residuos de Tyr podrían ser más sensibles al tratamiento con el sistema $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{+2}/\text{APS}/\text{NO}_2^-/\text{luz azul}$.

-Glutamato deshidrogenasa (Uniprot P00366, Bovino)

Es una proteína homohexamérica mitocondrial que convierte L-Glu en α -cetoglutarato. Está compuesto por 3 dominios principales: el sitio de unión de Glu (mayormente organizado como hojas- β), el sitio de unión de NAD(P)⁺ y un dominio regulatorio. Protruyendo del dominio de unión de NAD⁺, una larga región helicoidal, conocida como “antena”, puede sufrir cambios conformacionales que abren y cierran el sitio activo, lo que provee a GdH con una gran flexibilidad estructural [240,241]. Cada monómero maduro es rico en residuos de Tyr (18) y Met (13), e incluso posee 4 Trp y 6 residuos de Cys. Varias PTM han sido descritas en diferentes isoformas de GdH: ADP-ribosilación en residuos de Cys [242], fosforilación [243] y acetilación de Lys [244]. Mediante el análisis de LC-MS/MS, pudimos detectar 14 residuos de Tyr, de los cuales 12 estaban modificados y 3 residuos de Trp (2 modificados), los cuales presentaban grados de nitración variados (**Fig. 4-7D**) a pesar de que los residuos de Tyr no presentaban una buena correlación con RSA (**Table 4-4, Fig. 4-8A**). Reportes previos, empleando diferentes agentes de nitración, han descrito la modificación en Y₃₁₉, Y₅₂₈ (hemina-H₂O₂-NO₂⁻), Y₄₅₈, Y₅₅₀ (SIN-1) y Y₄₆₄ (tetranitrometano), aportando evidencia adicional que incluso residuos de Tyr no expuestos pueden ser modificados [174,245]. El hecho que GdH pueda adoptar conformaciones abiertas o cerradas con una gran flexibilidad intrínseca, particularmente en el dominio de unión a nucleótido [241], podría explicar los valores de RNR de residuos que presentan bajo SASA en las estructuras cristalográficas, como Y₁₃₅ e Y₃₁₉. Otro residuo interesante es Y₂₄₇ (RNR 1,9 %), el cual, a pesar de encontrarse en una cavidad interna, puede ser modificado por análogos de nucleótidos, afectando el sitio alostérico de unión a NADH [246]. Por lo tanto, debido a los cambios conformacionales necesarios para acomodar los sustratos y cofactores, no es sorpresa que, a pesar de los valores SASA calculados, estos residuos puedan ser nitrados.

4.3.4- Modificaciones oxidativas secundarias del sistema foto-inducible

Una de las características de las reacciones radicalarias es su baja selectividad. Típicamente, estas reacciones están asociadas a procesos oxidativos durante los cuales, los residuos de Met son comúnmente modificados. Además, se sabe que el sistema de ionización empleado para el análisis por MS (ESI, *electrospray ionization*) también dispara la oxidación de Met [247], generando Met sulfóxido. Dado esto, es una modificación presente incluso en muestras no tratadas, por lo que se la usó para evaluar los resultados de oxidación de péptidos obtenidos en las muestras tratadas. La oxidación de Met en GdH e I-FABP pareciera que pudiese ser inducida por el tratamiento con Ru(bpy)₃⁺²/APS/NO₂/luz azul (**Tabla 4-3**). Sin embargo, en el caso de LdH observamos una falta de uniformidad con relación al efecto sobre los residuos de Met. El grado de oxidación de M₂₀₄ pareciera ser mayor en las muestras nitradas que en la no tratada, pero ocurre lo opuesto para el caso de M₂₇₆. De manera similar, no hay una evidencia clara de un aumento en la oxidación de Met en HEWL.

Tabla 4-5. Comparación entre la nitración e hidroxilación de residuos de Tyr y Trp

Proteína / Secuencia peptídica	Aminoácido Modificado	RMR (%)		
		Nitración	Hidroxilación	
			No tratada	Tratada
Glutamato deshidrogenasa (GdH)				
DDGSWEVIEGYR	W ₁₂₉	0,6 ± 0,1	0,2 ± 0,1	8,4 ± 0,8
	Y ₁₃₅	7 ± 1	NH	NH
YSTDVSVDEVK	Y ₁₅₂	0,5 ± 0,1	NH	<0,1
ALASLMTYK	Y ₁₇₀	0,2 ± 0,1	0,4 ± 0,1	2,3 ± 0,2
NYTDNELEK	Y ₁₉₃	1,2 ± 0,2	NH	NH
EMSWIADTYASTIGHYDINAHACVTGKPISQGGIHGR	W ₂₃₅	NN	0,1 ± 0,0	7,4 ± 0,2
	Y ₂₄₇	1,9 ± 0,1	NH	NH
YLHRFGAK	Y ₃₁₉	11,7 ± 0,6	NH	NH
SDGSIWNPDPGIDPKELE*	W ₃₃₈	3,8 ± 0,1	0,8 ± 0,1	6,2 ± 0,2
DFKLQHGTLGFPKAKIYE	Y ₃₆₇	18 ± 2	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0
LTFKYER	Y ₄₅₈	0,5 ± 0,1	NH	NH
DSNYHLLMSVQESLERKFGKHGGTIPIVPTAEFQDR	Y ₄₆₄	18 ± 1	NH	NH
ISGASEKDIVHSGLAYTMER	Y ₅₁₂	5,7 ± 0,1	1,0 ± 0,1	0,6 ± 0,1
TAMKYNLGLDLR	Y ₅₂₈	1,6 ± 0,2	NH	NH
VYNEAGVTFT	Y ₅₅₀	1,7 ± 0,2	NH	NH
Proteína de unión a ácidos grasos intestinal (I-FABP)				
AFDGTWK	W ₋	0,6 ± 0,1	0,7 ± 0,1	2,3 ± 0,1
NYEKFME	Y ₁₅	23,1 ± 0,9	NH	1,9 ± 0,2
LGVDFAVSLADGTE *	Y ₇₁	29,8 ± 0,5	NH	1,9 ± 0,2
LTGTWTMEGNKLVGKFKRVDNGKE	W ₈₃	NN	NH	3 ± 1
EISGNELIQTYTEGVEAK	Y ₁₁₈	(17,3 ± 0,3)	(0,1 ± 0,0)	(0,2 ± 0,0)
	Y ₁₂₀	(17,3 ± 0,3)	(0,1 ± 0,0)	(0,2 ± 0,0)
Lactato deshidrogenasa (LdH)				
IVSGKDYSVTANSK	Y ₈₃	0,5 ± 0,1	NH	0,4 ± 0,1
NVNIFKFIIPNVVKYSPHCK	Y ₁₂₇	4,1 ± 0,1	2,8 ± 0,6	2,5 ± 0,3
FRYLMGER	Y ₁₇₂	0,5 ± 0,1	NH	NH
LGVHALSCHGWILGEHDSSVPVWSGMNVAGVSLK	W ₂₀₁	NN	8,7 ± 0,8	0,7 ± 0,7
TLHPELGTADADKEQWK	W ₂₂₇	0,1 ± 0,0	1,8 ± 0,2	3,1 ± 0,2
QVDSAYEVIK	Y ₂₃₉	13,5 ± 0,5	NH	NH
SADTLWGIQK	W ₃₂₄	1,5 ± 0,1	2,0 ± 0,1	5,2 ± 0,1
Lisozima (HEWL)				
HGLDNYRGYSLGNWVCAAKFESNFNTQATNR	Y ₃₈	(23,5 ± 0,5)	NH	NH
	Y ₄₁	(23,5 ± 0,5)	NH	NH
	W ₄₆	NN	1,8 ± 0,3	4,7 ± 0,2
NTDGSTDY GILQINSR	Y ₇₁	4,1 ± 0,1	NH	0,2 ± 0,1
WWCNDGRTPGSR	W ₈₀	(3,9 ± 0,1)	(5,5 ± 0,5)	(8,9 ± 0,4)
	W ₈₁	(3,9 ± 0,1)	(5,5 ± 0,5)	(8,9 ± 0,4)
KIVSDGNGMNAVVAWRNR	W ₁₂₆	0,3 ± 0,0	(1,3 ± 0,3)	(7,9 ± 0,4)
	W ₁₂₉	NN	(1,3 ± 0,3)	(7,9 ± 0,4)
CKGTDVQAWIR	W ₁₄₁	4,0 ± 0,1	2,0 ± 0,2	5,5 ± 0,4

La numeración de los péptidos y residuos está basada en la secuencia completa de aminoácidos de cada proteína de acuerdo a los archivos FASTA obtenidos de la base de datos de Uniprot. Todos los péptidos derivan de muestras tratadas con Tripsina, excepto aquellos marcados (*) que corresponden a péptidos nitrados identificados y cuantificados luego del tratamiento con Glu-C. Los valores reportados entre paréntesis corresponden a residuos para los cuales no fue posible la cuantificación individual. NH (No Hidroxilado) indica residuos que no fueron detectados como hidroxilados; y NN (No Nitrado) aquellos no detectados como nitrados.

Por otro lado, en los casos de péptidos conteniendo Tyr o Trp junto con Met, tal como F¹⁷⁰RYLMGER¹⁷⁷ (Y₁₇₂/M₁₇₄, LdH), generalmente la oxidación de Met contribuyó en mayor medida al cálculo de modificación total del péptido, aunque una gran proporción de la oxidación de Met se encuentra también en la muestra no tratada. No tenemos actualmente una explicación para este fenómeno debido a que no puede ser totalmente atribuido al sistema foto-inducible, pero tampoco podemos descartar en este punto que no haya una promoción de la oxidación de residuos de Met por las reacciones foto-inducidas.

También se realizó un análisis exhaustivo de potenciales modificaciones oxidativas que pudieran surgir a partir de la aplicación del sistema de nitración sobre otros residuos de aminoácidos. La nitración de Phe y His no pudo ser detectada. Encontramos evidencia de la oxidación de Tyr y Trp (+10, +16 Da) en numerosos péptidos de las cuatro proteínas modelo. Como se detalla en la **Tabla 4-5**, la hidroxilación de Tyr es minoritaria en comparación a su nitración, siendo Y₁₇₀ en GdH la excepción donde del 2,5 % de modificación total del péptido, la nitración representa sólo el 0,2 %, mientras que el resto corresponde a la hidroxilación. Por el contrario, los residuos de Trp fueron más sensibles a modificaciones oxidativas, aunque estas PTM también fueron identificadas en las muestras no tratadas. Junto con la hidroxilación, otras modificaciones comunes también fueron exploradas: +4 Da (Quinurenina, +1O -1C), +14 Da (Oxolactona, +1O-2H), y +32 Da (N-formilquinurenina, dioxindolilalanina o dihidroxitriptofano, +2O). Los resultados se muestran en la **Figura 4-9**. Particularmente, el producto de oxidación +16 Da y, en menor medida, +32 Da parecen ser inducidos por el sistema fotoinducible; mientras que +4 y +14 Da mostraron niveles relevantes ya en las muestras no tratadas. En este sentido, se ha reportado que el sistema Ru(bpy)₃⁺²/APS/aire podría promover la oxidación de residuos por dos vías: a través de la formación de radicales y mediante la formación de oxígeno singlete. La generación de este último podría explicar la mayor susceptibilidad de los residuos de Trp a ser oxidados que los residuos de Tyr a pH 7,4 [248]. Asimismo, se ha reportado el aumento de la oxidación de residuos de Trp luego de la fotosensibilización con Rosa de Bengala, en reacciones de modificación promovidas a partir de la generación de oxígeno singlete. Sin embargo, a diferencia de lo observado en nuestro estudio, la oxidación de Tyr (+16 Da) también aumento sensiblemente luego de la fotosensibilización [249]. Por último, vale la pena destacar que, al contrario de la nitración de Trp libre, la nitración de Trp en proteínas fue minoritaria en comparación al resto de las modificaciones.

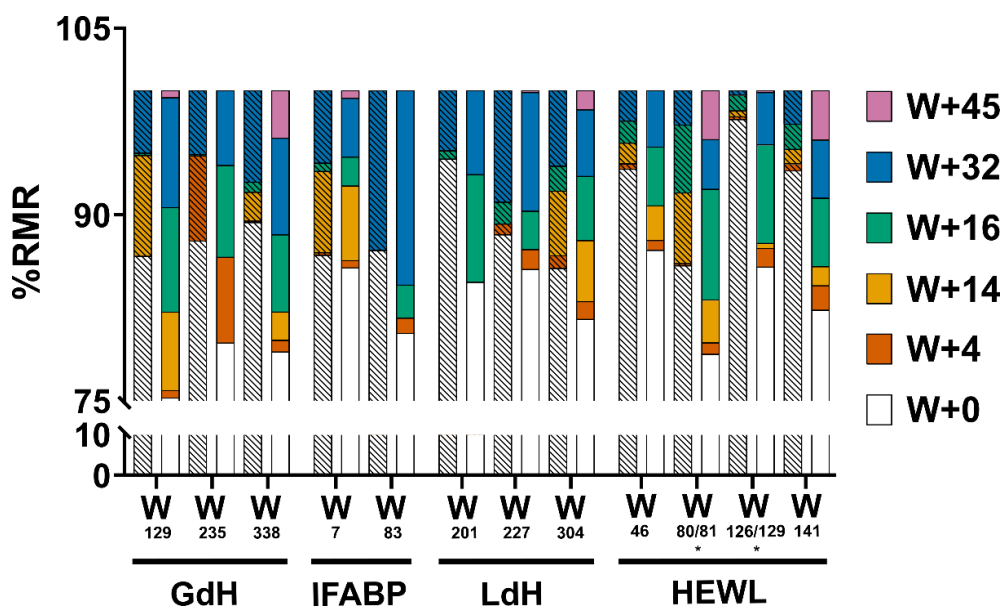


Figura 4-9. Oxidación de residuos de Trp. Las contribuciones individuales de diferentes modificaciones oxidativas de Trp en las muestras no tratada (barra rayada) y tratada (barra sólida) se expresan como porcentaje del total de los péptidos identificados basado en la cuantificación libre de marca a partir de los cromatogramas extraídos. *Los pares 80/81 y 126/129 en HEWL corresponden a residuos que pertenecen al mismo péptido y cuyos niveles de modificación no pudieron ser cuantificados individualmente. Se asume una contribución equivalente de cada residuo y sólo una de estas contribuciones está representada en el gráfico.

Cualquier modificación oxidativa de los residuos de Cys, si ocurren, fueron revertidas con el tratamiento con DTT durante la preparación de las muestras para el análisis de MS, ya que no se observaron versiones oxidadas de este residuo. Por otro lado, se analizó también la oxidación de residuos de His (+10, +16 Da). Se asociaron espectros MS/MS a esta modificación, pero estos fueron escasos y esporádicos, como en el caso de H₃₁₅ en LdH. La cuantificación de esta modificación sólo fue posible en muy pocos casos y no mostró diferencias entre la muestra tratada y no tratada. Por último, dado que la oxidación de residuos de Tyr a DiTyr compite con la formación de NitroTyr, es posible que esta modificación también se encuentre presente. Sin embargo, bajo las condiciones de nitración, no se detectó fluorescencia de Dityr mediante la excitación selectiva a 340 nm. Teniendo en cuenta estos resultados, el método presentado muestra una preferencia a la nitración de residuos de Tyr, junto con la oxidación de Trp, la cual debe ser considerada.

4.4- Conclusión

El modelado de PTM relacionadas al estrés oxidativo es una tarea desafiante, dado que muchos sistemas de oxidación llevan a la aparición de modificaciones no deseadas (tales como el entrecruzamiento con las mismas proteínas accesorias), y requieren desde horas a días para generar las especies oxidadas. El método foto-inducido con Ru(bpy)₃⁺²/APS/NO₂⁻ descrito en esta sección

es una alternativa viable para introducir sistemáticamente modificaciones oxidativas y para nitrar residuos de Tyr en particular. Anteriormente se había probado el uso del sistema foto-inducible a base de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{+2}$ para generar variantes entrecruzadas de proteínas [200]. Sin embargo, hasta el día de hoy no se había empleado para nitrar proteínas. Nuestro estudio provee evidencia de que el sistema foto-inducible de nitración ofrece una estrategia rápida (segundos a minutos), eficiente y fácilmente ajustable para la modificación de residuos aromáticos. Dado que las reacciones de formación de DiTyr y NitroTyr compiten entre sí, diversos factores se pueden manipular para maximizar la eficiencia de generación de ambas especies, tales como el pH y la concentración de NaNO_2 . Particularmente, para direccionar la neutralización de radicales Tiroxilo hacia la formación de la especie nitrada se puede disminuir el pH (si la proteína es estable) y aumentar la concentración de NaNO_2 , evitando el uso de *buffers* amino o morfolino y concentraciones de NaCl mayores a 100 mM.

A pesar de que este método puede nitrar residuos de Trp, en el caso de proteínas, Tyr sigue siendo el principal blanco. Sin embargo, en el caso de Trp debe tenerse en cuenta que pueden sufrir oxidaciones con mayor susceptibilidad que los residuos de Tyr. Tal como se demostró con diferentes proteínas modelo, el grado de modificación de cada residuo depende de la topología estructural, la flexibilidad y la carga de residuos cargados cercanos. En este sentido, la accesibilidad es un factor importante dado que el contacto entre los residuos modificados y el fotosensibilizador o los radicales $\bullet\text{NO}_2$ pareciera ser decisivo.

Por otro lado, la combinación de este método con la espectrometría de masas y su posterior cuantificación por métodos libre de marca podría ser una herramienta muy útil para evaluar la flexibilidad estructural de proteínas y los cambios conformacionales, por ejemplo, debido a la unión de ligandos. Aun así, también existen otros métodos disponibles que podrían proveer información complementaria, empleando un enfoque similar pero con menos selectividad en relación a los patrones de modificación, como el marcado con Diazirina de residuos accesibles al solvente [250].

Finalmente, es válido destacar que el método de nitración foto-inducible basado en el sistema $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{+2}/\text{APS}/\text{NO}_2^-$ es una estrategia efectiva para evaluar las consecuencias de introducir el grupo $-\text{NO}_2$ en relación con la estructura y función de proteínas, y así determinar su rol en patologías asociadas al estrés oxidativo, como enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas.

Capítulo 5

Modificación Foto-inducible de α -Sinucleína

5.1- Introducción

Entender el rol de las PTM de aSyn podría permitir el desarrollo de herramientas de diagnóstico, monitoreo y/o tratamiento de la EP y las Sinucleopatías. Basándonos en los resultados obtenidos en el capítulo anterior y en estudios previos [200], la aplicación de sistemas foto-inducibles de modificación de proteínas constituye una herramienta potente para modelar potenciales modificaciones tóxicas en aSyn, con ventajas sobre otras técnicas de introducción de PTM. En particular, aSyn posee 4 residuos de Tyr y ninguno de Trp ni Cys en su secuencia, lo que la convierte en un modelo ideal para la aplicación de los sistemas de modificación basados en la fotosensibilización de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{+2}$, tanto para el entrecruzamiento, como para la nitración de residuos de Tyr.

El sistema PICUP fue anteriormente aplicado con éxito en aSyn por Borsarelli y col. [182], observándose la generación de variantes entrecruzadas de forma rápida y específica. Tomando ese trabajo como punto de partida, este capítulo se centra en profundizar la caracterización de variantes oxidadas por métodos espectroscópicos y MS, extendiendo el análisis a especies nitradas de aSyn.

Por otro lado, aSyn es considerada una proteína intrínsecamente desordenada, la cual adopta diferentes conformaciones de acuerdo con el entorno o estructuras con las que interacciona. Por lo tanto, analizamos la susceptibilidad de los residuos de Tyr a ser modificados si aSyn está en diferentes conformaciones, es decir cuando interacciona con vesículas unilamelares pequeñas (SUV), adoptando una estructura helicoidal en los primeros dos tercios de su secuencia, o cuando forma parte de fibrillas amiloides generadas *in vitro*, que presenta una estructura *cross- β* .

5.2- Modificación foto-inducible de aSyn libre en solución

5.2.1- Las reacciones de foto-modificación de aSyn pueden ser caracterizadas por métodos espectroscópicos

Las reacciones de entrecruzamiento (para la formación de variantes oligoméricas covalentes generadas por oxidación) y de nitración de 150 μM aSyn libre en solución se realizaron mediante la aplicación de los sistemas foto-inducibles detallados los capítulos anteriores. Estos sistemas se pueden optimizar fácilmente ajustando la intensidad de luz, el tiempo de irradiación y las concentraciones del fotosensibilizador, aceptor de electrones y, en el caso de la nitración, de NaNO_2 . En ambos casos, las reacciones fueron monitoreadas inicialmente por métodos espectroscópicos luego de la irradiación de luz a 450 nm empleando el espectrofluorómetro Fluorolog 3. La emisión de muestras no irradiadas exhibió un pico bien definido con un máximo a 305 nm ($\lambda_{\text{exc}} = 275$ nm) correspondiente al fluoróforo Tyr. Para el caso de la reacción de entrecruzamiento de aSyn, la

excitación del fotosensibilizador ($\lambda_{exc}= 450$ nm), promovió la aparición de una nueva banda de emisión con máximo en 405 nm, observada luego de la excitación de la muestra tanto a 275 nm como a 340 nm (**Fig. 5-1A y 5-1C**). Como se ha reportado antes, esta banda corresponde a la formación de enlaces covalentes Tyr-Tyr, para dar la especie oxidada DiTyr, a expensas de la reducción de la señal de Tyr, a través de una conversión directa como lo sugiere la presencia de un punto isoemisivo [182]. También se visualizaron cambios en los espectros de absorbancia registrados en función del tiempo de irradiación (**Fig. 5-1E**), con un aumento progresivo de la intensidad del pico a 297 nm y la aparición de un hombro alrededor de los 320 nm, consistente con lo reportado en relación a la especie DiTyr a pH neutro [251,252]. Asimismo, la alcalinización de la solución provocó el corrimiento del pico de absorción, presentando un máximo a 315-320 nm (**Fig. 5-1G**), coincidente con lo descrito en la bibliografía [252]. Usando los coeficientes de extinción $\epsilon_{315nm}= 5 \times 10^3$ M⁻¹ cm⁻¹ (pH 7,5) y $\epsilon_{315nm}= 8,4$ M⁻¹ cm⁻¹ (pH 9,9) [252,253] se estimó la concentración de la especie oxidada usando los valores de absorbancia diferenciales ($\Delta Abs_{\lambda}=A_t-A_0$) obtenidos de la reacción realizada a pH 7,4 (**Fig. 5-1E**) y luego de la alcalinización con NaHCO₃ (**Fig. 5-1G**). Luego de 240 segundos de irradiación, se alcanzó una concentración aproximada de DiTyr de 50 μ M. Por otro lado, en sintonía con lo descrito en el capítulo 4, no se observó degradación del Ru(bpy)₃⁺², tal como se deduce de la ausencia de alteración de la banda de absorción por encima de los 400 nm.

Por otro lado, de manera similar a lo observado con aminoácidos libres en solución, la presencia de iones NO₂⁻ cambia radicalmente los espectros tanto de emisión de fluorescencia como los de absorbancia UV-Vis. Así, el incremento del tiempo de irradiación hasta un total de 240 segundos en presencia de 10 mM NaNO₂, fomentó la disminución progresiva en la intensidad de la señal de Tyr ($\lambda_{exc}= 275$ nm) (**Fig. 5-1B**). A pesar de que también se observó un leve aumento de señal a 400 nm correspondiente a DiTyr, la intensidad del máximo de emisión luego de la excitación a 340 nm mostró ser de dos órdenes de magnitud menor (aproximadamente un 2 %) que el obtenido en la reacción en ausencia de NaNO₂ (**Fig. 5-1D**). Asimismo, la **Fig. 5-1F** muestra los cambios en los espectros UV-Vis a pH 7,4 a lo largo de la reacción, donde se destaca la aparición de un pico ancho centrado alrededor de los 400 nm luego de la obtención de los espectros diferenciales. La alcalinización de la solución provocó el corrimiento del máximo de absorción (~430 nm) y un aumento significativo de la intensidad de absorbancia (**Fig. 5-1H**), característico de la aparición de la especie no fluorescente NitroTyr [203,204]. Así, empleando el coeficiente de extinción molar $\epsilon_{430nm}= 4400$ M⁻¹cm⁻¹ (pH 10) [254] se estimó que la concentración de NitroTyr luego de 240 segundos de irradiación fue de 134 μ M.

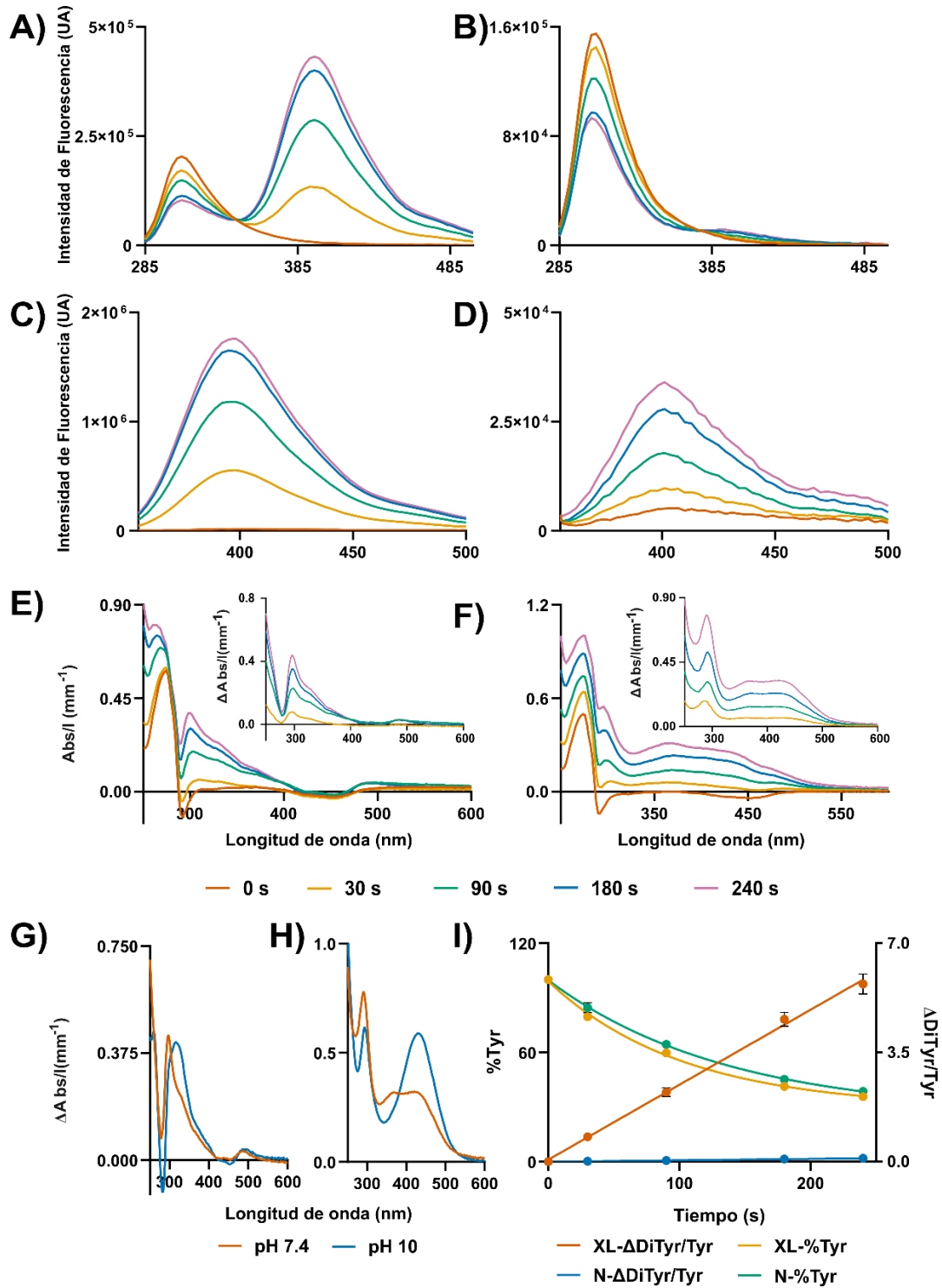


Figura 5-1. Monitoreo de las reacciones de modificación de aSyn por espectroscopia. Los cambios espectrales de las reacciones de Entrecruzamiento (A) y Nitricación (B) de aSyn se siguieron por emisión de fluorescencia ($\lambda_{\text{exc}}=275\text{nm}$). Asimismo, la formación de la variante oxidada DiTyr se monitoreó mediante la emisión específica luego de la excitación a 340 nm para las reacciones en ausencia (C) y presencia de NaNO_2 (D). Por otro lado, se registraron también los cambios en los espectros UV-Vis (E y F) y se calcularon los espectros diferenciales ($\Delta \text{Abs}_t = A_t - A_0$) (gráficos internos en E y F). Las propiedades espectroscópicas de las especies generadas son dependientes del pH del medio. Los espectros registrados a pH 7.4 y pH 10 se muestran para la reacción de Entrecruzamiento (G) y Nitricación (H). I) Seguimiento de las reacciones de modificación mediante el cálculo de la relación de DiTyr/Tyr (expresado de manera diferencial, Δ) y el %Tyr para la reacción de Entrecruzamiento (XL) y Nitricación (N) de aSyn. Los resultados están expresados como media \pm SEM. Los datos de %Tyr y $\Delta \text{DiTyr}/\text{Tyr}$ para las reacciones en presencia (N) y ausencia de NaNO_2 (XL) se usaron para ajustar ecuaciones monoexponenciales y lineales (líneas sólidas), respectivamente, que describen el consumo y la proporción de señal de fluorescencia entre el producto DiTyr y el sustrato durante las reacciones foto-inducidas.

Finalmente, ambas reacciones pueden ser monitoreadas de forma relativa mediante el cálculo de la relación de las intensidades de emisión de fluorescencia DiTyr/Tyr (400 nm/305 nm) y el porcentaje de señal remanente de Tyr (% Tyr) luego de la excitación a 275 nm (**Fig. 5-1I**). Los valores de %Tyr de las reacciones en presencia (N) y ausencia de NaNO_2 (XL) se emplearon para ajustar un modelo que describe el consumo de Tyr como una caída monoexponencial, y exhibieron constantes muy similares, 7×10^{-3} y $9 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, respectivamente. Asimismo, mostraron un consumo similar de la señal de Tyr luego de 240 segundos de excitación del fotosensibilizador (aproximadamente 70 %). Sin embargo la formación de la especie DiTyr (seguido por el cálculo de $\Delta\text{DiTyr/Tyr}$) es mucho mayor en la reacción de entrecruzamiento que en la de nitración. Esto se evidencia al comparar los ajustes lineales realizados, siendo la pendiente de la reacción en ausencia de NaNO_2 ($2,4 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$) 2 órdenes de magnitud mayor que la correspondiente a la reacción de nitración ($4,4 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$). Así, a pesar de que el % Tyr no es una medida directa de la presencia de la formación de NitroTyr, nuestros ensayos muestran que la caída en la señal está directamente relacionada con la formación de la variante nitrada, siendo, además, la formación de DiTyr mínima en las condiciones del ensayo.

5.2.2- Los entrecruzamientos entre Tyr del N- y C-terminal son los más favorables

Para profundizar en la determinación de los residuos involucrados en los entrecruzamientos de Tyr se implementó un protocolo para el seguimiento de la reacción por espectrometría de masas en tándem (MS/MS). Para esto se realizó la reacción con 40 μM aSyn, 20 μM $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{+2}$ y 600 μM APS, empleando el dispositivo de foto-activación desarrollado en el MPIIbpc (Göttingen, Alemania) y fijando una intensidad de 0,8 mW/cm^2 . Se la caracterizó inicialmente por emisión de fluorescencia ($\lambda_{\text{exc}}=275 \text{ nm}$) durante 140 segundos de irradiación (**Fig. 5-2A**), seguido del cálculo la relación DiTyr/Tyr (**Fig. 5-2B**). Como se comentó anteriormente, aSyn tiene 4 residuos de Tyr, uno en la región N terminal (N-term), Y_{39} , y el resto en la región C terminal (C-term), Y_{125} , Y_{133} , e Y_{136} . El análisis previo de la reacción de oxidación de aSyn empleando el sistema $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{+2}/\text{APS}/\text{luz}$ por MS/MS, mostró que Y_{39} estaba involucrado en todos los entrecruzamientos identificados, como por ejemplo $\text{Y}_{39}\text{-Y}_{39}$ e $\text{Y}_{39}\text{-Y}_{\text{Cterm}}$, aunque en este último no fue posible identificar cuál de los Tyr del C-term estaban implicados [182]. Resultados similares se obtuvieron con los sistemas de oxidación que emplean Hemoglobina/ H_2O_2 , $\text{Cu}^{+1}/\text{O}_2$, y $\text{Cu}^{+2}/\text{H}_2\text{O}_2$ [164,199,255], en donde se destaca la tendencia de Y_{39} de formar entrecruzamientos. Para el estudio actual se tomaron muestras a diferentes tiempos de reacción y luego fueron digeridas con Tripsina o Glu-C. Posteriormente fueron analizadas por MS/MS y la identificación de los entrecruzamientos (-2H) entre residuos de Tyr se realizó mediante el empleo del software pLink2 [189]. A modo de ejemplo, en la **Fig. 5-2C** se muestra un espectro MS/MS en el cual la presencia de los fragmentos $y5_x$, $b5_x$ y $b6_x$ lleva a la identificación del entrecruzamiento entre los péptidos $^{36}\text{GVLY}_{39}\text{VGSKTKE}^{46}$ y $^{132}\text{GYQDY}_{136}\text{EPEA}^{140}$ ($\text{Y}_{39}\text{-Y}_{136}$). Tanto el empleo de Tripsina

como de Glu-C permitió la identificación de varios péptidos entrecruzados, tal como se detalla en la Tabla de la **Fig. 5-2D**. Estos péptidos son los que presentaron el mayor número de eventos de secuenciación (espectros MS/MS) validados para cada tipo de entrecruzamiento. Vale la pena destacar que el residuo Y₃₉ forma parte de la mayor parte de los entrecruzamientos, ya sea con otro Y₃₉ o con uno de los residuos de Tyr del C-term. Además, la digestión con Glu-C permitió la asignación de unos pocos espectros de entrecruzamientos entre residuos del C-term, como Y₁₃₆-Y₁₂₅. Sin embargo, basado en el número de espectros MS/MS adjudicados, así como también en el *score* asignado por el software y la validación manual realizada a cada asignación de espectro, los entrecruzamientos entre los residuos del C-term están sumamente restringidos. En este sentido, la región del C-term es rica en aminoácidos ácidos, donde la repulsión de cargas negativas podría ser responsable del bajo número de entrecruzamientos entre Y_{C-term} identificados. Dado que la formación del enlace covalente depende del contacto directo entre los residuos de Tyr, las cargas negativas netas en la vecindad de estos residuos podrían constituir un factor decisivo que podría disminuir la efectividad del sistema foto-inducible en esta región por las repulsiones electrostáticas intercatenarias. De manera análoga, la región N-term es rica en residuos de Lys lo que le confiere carga positiva neta a pH neutro. Esto podría afectar la formación de entrecruzamientos Y₃₉-Y₃₉. El hecho que los entrecruzamientos Y₃₉-Y_{C-term} sean los más frecuentes podría resaltar la importancia de las cargas en la vecindad de los residuos protagonistas de las reacciones inducidas por el sistema Ru(bpy)₃⁺²/APS/luz, así como posibles determinantes que participan en las interacciones entre monómeros de aSyn.

Dada la flexibilidad conformacional de aSyn y la distribución de cargas a lo largo de su secuencia, sería factible la formación de entrecruzamientos intracatenarios entre Y₃₉ y alguna de las Tyr del C-term. La digestión en solución con proteína libre de marca no permite distinguir entre entrecruzamientos inter e intracatenarios. Para esto, se realizó la digestión, a partir de gel de SDS-PAGE, de la banda de monómero luego de la irradiación y se la analizó mediante MS. Muy pocos espectros con *scores* muy bajos fueron asociados a péptidos entrecruzados, lo que sugeriría que los entrecruzamientos identificados mediante la digestión en solución son esencialmente intercatenarios. A una conclusión similar llegaron Mukherjee y col., quienes, a partir del análisis por MS de muestras conteniendo aSyn marcada con ¹⁵N y sin marcar oxidadas con el sistema Hemoglobina/H₂O₂, observaron que predomina el mecanismo de formación de entrecruzamientos intercatenarios [199]. Sorpresivamente, entrecruzamientos intracatenarios empleando el sistema Cu⁺¹/O₂ se identificaron en aSyn H50Q, y en menor medida en la proteína *wild type* [255]. Esto sugiere que las condiciones de oxidación y las mutaciones de aSyn podrían ser decisivas a la hora de la formación de entrecruzamientos inter e intracatenarios, probablemente debido a la alta flexibilidad y cambios estructurales de la proteína cuando está libre en solución.

Posteriormente a la identificación de los residuos entrecruzados, se cuantificó la reacción usando una estrategia libre de marca basada en la extracción de cromatogramas a partir de los espectros MS (MS1). Para esto se configuró un archivo .ss/ el cual incluye la secuencia lineal de los péptidos entrecruzados identificados (ver Materiales y Métodos) y se utilizó el software Skyline. Este protocolo permitió verificar un incremento progresivo en la intensidad de los cromatogramas extraídos (área bajo la curva) de los entrecruzamientos Tyr-Tyr identificados, en función del tiempo de irradiación. Como ejemplo, la **Fig. 5-2E** muestra los cromatogramas extraídos para el entrecruzamiento $Y_{39}-Y_{133/136}$ ($^{36}\text{GVLY}_{39}\text{VGSKTKE}^{46}-^{132}\text{GY}_{133}\text{QDY}_{136}\text{EPEA}^{140}$, +1068 Da) durante los 140 segundos de excitación del fotosensibilizador, empleando la enzima Glu-C. La cuantificación de los cambios en la intensidad de los cromatogramas del péptido sin modificar $^{36}\text{GVLY}_{39}\text{VGSKTKE}^{46}$ se utilizaron para normalizar los valores obtenidos para los entrecruzamientos cuantificables ($Y_{39}-Y_{133/136}$, $Y_{39}-Y_{125}$) y así estimar el grado de modificación a nivel del residuo Y_{39} (RMR%) para cada entrecruzamiento, expresado como valores diferenciales ($\Delta\text{RMR}\% = \text{RMR}_t - \text{RMR}_0$) (**Fig. 5-2F**). A pesar de haber sido identificado, el entrecruzamiento $Y_{136}-Y_{125}$ no pudo ser cuantificado dado que los cromatogramas presentaban una relación señal/ruido (S/N) muy baja. Es importante mencionar que no fue posible cuantificar valores individuales de RMR (%) para los péptidos entrecruzados isobáricos $Y_{39}-Y_{133}$ e $Y_{39}-Y_{136}$, resultando en valores elevados de RMR (> 25 %). Sin embargo, de acuerdo con el valor de RMR calculado y al conteo de los espectros asignados, los entrecruzamientos $Y_{39}-Y_{133/136}$ estarían más favorecidos que el entrecruzamiento $Y_{39}-Y_{125}$. Además, el análisis a tiempo final (140 segundos de exposición) de muestras digeridas con Tripsina nos permitió confirmar que existe una tendencia mucho mayor de que se formen entrecruzamientos $Y_{39}-Y_{\text{c-term}}$ ($^{33}\text{TKEGVLY}_{39}\text{VGSK}^{43}-^{103}\text{NEEGAPQEGILEDMPVDPDNEAY}_{125}\text{EMPSEEGY}_{133}\text{QDY}_{136}\text{EPEA}^{140}$, +4284,7 Da) a que se forme la unión covalente entre dos Y_{39} ($^{33}\text{TKEGVLY}_{39}\text{VGSK}^{43}-^{35}\text{EGVLY}_{39}\text{VGSK}^{43}$, +949,5 Da) (**Fig. 5-2G**).

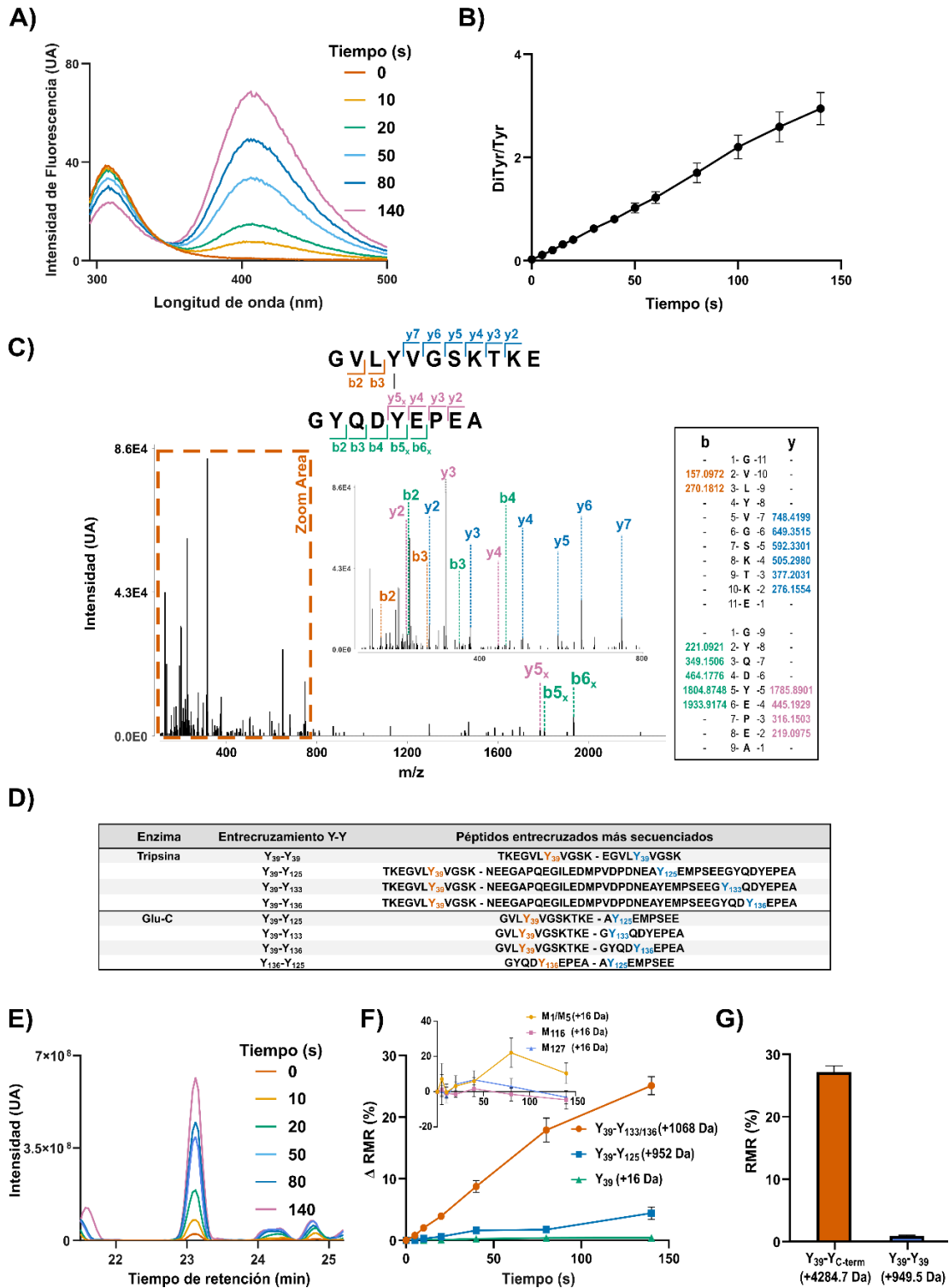


Figura 5-2. Entrecruzamiento de α Syn catalizado por el sistema Ru(bpy)₃⁺²/APS/luz. **A)** Caracterización de la reacción de entrecruzamiento mediante emisión de fluorescencia. La formación rápida y eficiente de DiTyr se estimó mediante el cálculo de la relación DiTyr/Tyr (**B**). **C)** Asignación de un espectro MS/MS del entrecruzamiento Tyr-Tyr entre los péptidos ³⁶GVLV₃₉VGSKTKE⁴⁶ y ¹³²GY₁₃₃QDY₁₃₆EPEA¹⁴⁰. Como se detalla en la tabla de masas conjunta al espectro, y_{5x}, b_{5x} y b_{6x} son fragmentos que confirman el entrecruzamiento Tyr-Tyr. **D)** Tabla donde se listan los péptidos entrecruzados mejor secuenciados identificados luego del análisis por MS, la asignación de espectros por parte de pLink y la validación manual de muestras digeridas con Tripsina o Glu-C. **E)** Cromatogramas extraídos para el entrecruzamiento Y₃₉-Y_{133/136} (³⁶GVLV₃₉VGSKTKE⁴⁶ y ¹³²GY₁₃₃QDY₁₃₆EPEA¹⁴⁰). **F)** Gráfico del cálculo del grado de modificación (RMR %) en función del tiempo de reacción, expresados como diferenciales ($\Delta = t_1 - t_0$), de entrecruzamientos Tyr-Tyr, la hidroxilación de Y₃₉ y la oxidación de Met (gráfico interno). **G)** Cuantificación a tiempo final de los entrecruzamientos Y₃₉-Y_{C-term} e Y₃₉-Y₃₉ de muestras digeridas con Tripsina. Los resultados en **B**, **F** y **G** están expresados como media \pm SEM.

Por otro lado, también analizamos la posibilidad de la generación de modificaciones distintas a las descritas por efecto de los radicales generados en el sistema foto-inducible. A pesar de que se identificaron péptidos conteniendo la variante hidroxilada de Tyr, conocida como DOPA (+10, +16 Da), la cuantificación libre de marca de la hidroxilación de Y₃₉ mostró que es una modificación mínima, la cual representa menos del 0,5 % del total de modificación del péptido ³⁶GVLY₃₉VGSKTKE⁴⁶ (**Fig. 5-2F**). La doble hidroxilación de Tyr (TOPA, +20, +32 Da) también fue identificada en la posición 39, pero la cuantificación mostro valores de Δ RMR con una variación nula a lo largo de la reacción. Como se especificó en el capítulo anterior, el empleo del sistema de ionización por *electrospray* puede disparar la oxidación de residuos de Met, con lo que es una modificación esperable, incluso en la muestra sin tratar. Así, la aparición de variantes oxidadas de Met (+10, +16 Da) podrían ser también favorecidas por el sistema foto-inducible. Sin embargo, el seguimiento de esta modificación en función de tiempo de irradiación no mostró evidencia que el sistema empleado fomente la aparición de Met Sulfoxido para ninguno de los residuos de Met (1, 5, 116 y 127) presentes en la secuencia de aSyn (gráfico interno en la **Fig. 5-2F**).

5.2.3- Todos los residuos de Tyr son susceptibles a la nitración

La adición de un grupo -NO₂ al grupo fenólico de los residuos de Tyr llevan a la formación de 3-NitroTyr, la cual se ha asociado ampliamente con el estrés oxidativo y es una modificación recurrente vinculada, a su vez, a procesos neurodegenerativos [256]. Por lo tanto, procuramos verificar la aplicabilidad del sistema Ru(bpy)₃⁺²/APS/NaNO₂/luz para nitrar aSyn. De forma análoga a las reacciones de oxidación selectiva de aSyn, profundizamos el estudio de su nitración mediante MS. Para esto, a la solución de reacción (aSyn 40 μ M en PBS con Ru(bpy)₃⁺² y APS) se le suplementó con 10 mM final de NaNO₂ y se la monitoreó el avance de la reacción mediante emisión de fluorescencia y el cálculo de señal de Tyr remanente (Tyr %), y tomando muestras a distintos tiempos a lo largo de 300 segundos de irradiación total, con una intensidad de 0,8 mW/cm² (**Fig. 5-3A y 5-3B**). A diferencia de lo indicado en la sección 5.1.1 para reacciones de 150 μ M aSyn y 10 mM NaNO₂, más allá de que se verificó la pérdida progresiva de señal de Tyr, no se observó formación de DiTyr por emisión a 400 nm (λ_{exc} 275 nm). Esto destaca la relevancia de mantener una relación de concentraciones [NaNO₂]/[Tyr] alta para favorecer específicamente la formación de la especie NitroTyr sin alterar otras condiciones, como el pH. Asimismo, para obtener un consumo similar de la señal de Tyr a la observada en la reacción de entrecruzamiento, se debió irradiar la muestra por aproximadamente el doble de tiempo. Esto podría estar relacionado con que por cada entrecruzamiento se consumen dos residuos de Tyr, contra sólo uno en la formación de NitroTyr. A su vez, otra explicación posible, no excluyente, sería el paso adicional de generación de ^{*}NO₂ (Ec. 4-6) a partir de la fotosensibilización del Ru(bpy)₃⁺², que competiría con la formación de Tirosilo.

La confirmación de la nitración de residuos de Tyr de aSyn se obtuvo mediante el análisis por MS luego de la digestión con Glu-C, empleando el software MaxQuant. La diferencia de masa de +45 Da que corresponde a la adición de un grupo Nitro junto con la pérdida de un átomo de H (+1N,+2O,-1H) se utilizó para la validación de los espectros de MS/MS asignados por el software. Así, como se observa en el espectro MS/MS de la **Fig. 5-3C**, la diferencia de +45 Da entre los fragmentos *y8-y9* y *b4* y *b9* del péptido $^{36}\text{GVLY}_{39}\text{VGSKTKE}^{46}$ sin modificar y modificado, confirman la nitración en Y_{39} . Siguiendo el mismo procedimiento, todos los residuos de Tyr de aSyn fueron identificados como nitrados. Estos resultados están en sintonía con lo anteriormente descrito en relación a la susceptibilidad de los residuos de aSyn a ser nitrados mediante otras estrategias [162,168].

De manera equivalente a lo realizado con la reacción de entrecruzamiento, se procedió a la cuantificación del grado de nitración a nivel de cada residuo de Tyr. Como primer paso se extrajeron los cromatogramas a partir de los espectros de MS (MS1) mediante Skyline, en donde se pudo comprobar un aumento progresivo del área bajo la curva directamente relacionado con el tiempo de excitación del fotosensibilizador para los péptidos nitrados $^{36}\text{GVLY}_{39}\text{VGSKTKE}^{46}$, $^{124}\text{AY}_{125}\text{EMPSEE}^{131}$ y $^{132}\text{GY}_{133}\text{QDY}_{136}\text{EPEA}^{140}$ (**Fig. 5-3D**). Por otro lado, la presencia de un grupo hidrofóbico como $-\text{NO}_2$ en la cadena lateral de los residuos de Tyr de péptidos modificados provoca un cambio en el tiempo de retención, al igual que fue observado para las proteínas modelo que se analizaron en el Capítulo 4. Como se observa en el gráfico insertado en la **Fig. 5-3D**, la nitración de Y_{125} generó un corrimiento del tiempo de retención del péptido $^{124}\text{AY}_{125}\text{EMPSEE}^{131}$ de aproximadamente 8 minutos, en comparación con el péptido sin modificar. Similares resultados se obtuvieron para los otros dos péptidos nitrados. Para el caso del péptido $^{132}\text{GY}_{133}\text{QDY}_{136}\text{EPEA}^{140}$, se encontró evidencia de la doble nitración (Y_{133} e Y_{136}) lo que generó un mayor corrimiento del tiempo de retención (aproximadamente 13 minutos). Posteriormente se calculó el grado de nitración de cada residuo de Tyr, expresado como diferencial ($\Delta\text{RMR} \%$) a lo largo de la reacción de nitración. Como se observa en la **Fig. 5-3E**, durante los 300 segundos de irradiación se confirmó el aumento del nivel de nitración para los 4 residuos de Tyr. Cabe destacar que a pesar de que la nitración de Y_{133} y Y_{136} forma péptidos isobáricos, sus cromatogramas pudieron resolverse (el tiempo de retención de los péptidos difiere en aproximadamente 1,5 min), con lo que fue posible calcular valores individuales de modificación para cada residuo. A nivel de péptido, el grado de nitración total fue relativamente homogéneo para los 3 casos ($^{36}\text{GVLY}_{39}\text{VGSKTKE}^{46}$, $^{124}\text{AY}_{125}\text{EMPSEE}^{131}$ y $^{132}\text{GY}_{133}\text{QDY}_{136}\text{EPEA}^{140}$), variando entre un 20-30 % aproximadamente. Por otro lado, a nivel de residuo, se observó que Y_{125} presentó valores de RMR% mayores que el resto de los residuos de Tyr. Se ha hipotetizado que la carga negativa de residuos vecinos a Y_{125} , Y_{133} e Y_{136} podría favorecer la concentración del fotosensibilizador y eventualmente promover la modificación de estos residuos. A pesar de que esto podría explicar el grado de modificación de Y_{125} , sorpresivamente los valores de RMR% de los residuos Y_{133} e Y_{136}

luego de 300 segundos de irradiación no superaron el 12 %. Además, estos valores fueron menores al calculado para la nitración de Y₃₉, el cual está localizado en una zona rica en cargas positivas debido a los residuos de Lys cercanos. Por lo tanto, las cargas vecinas podrían no ser el único factor decisivo para la nitración de residuos de Tyr y, dada la flexibilidad conformacional de α Syn, otros factores podrían estar modulando este fenómeno.

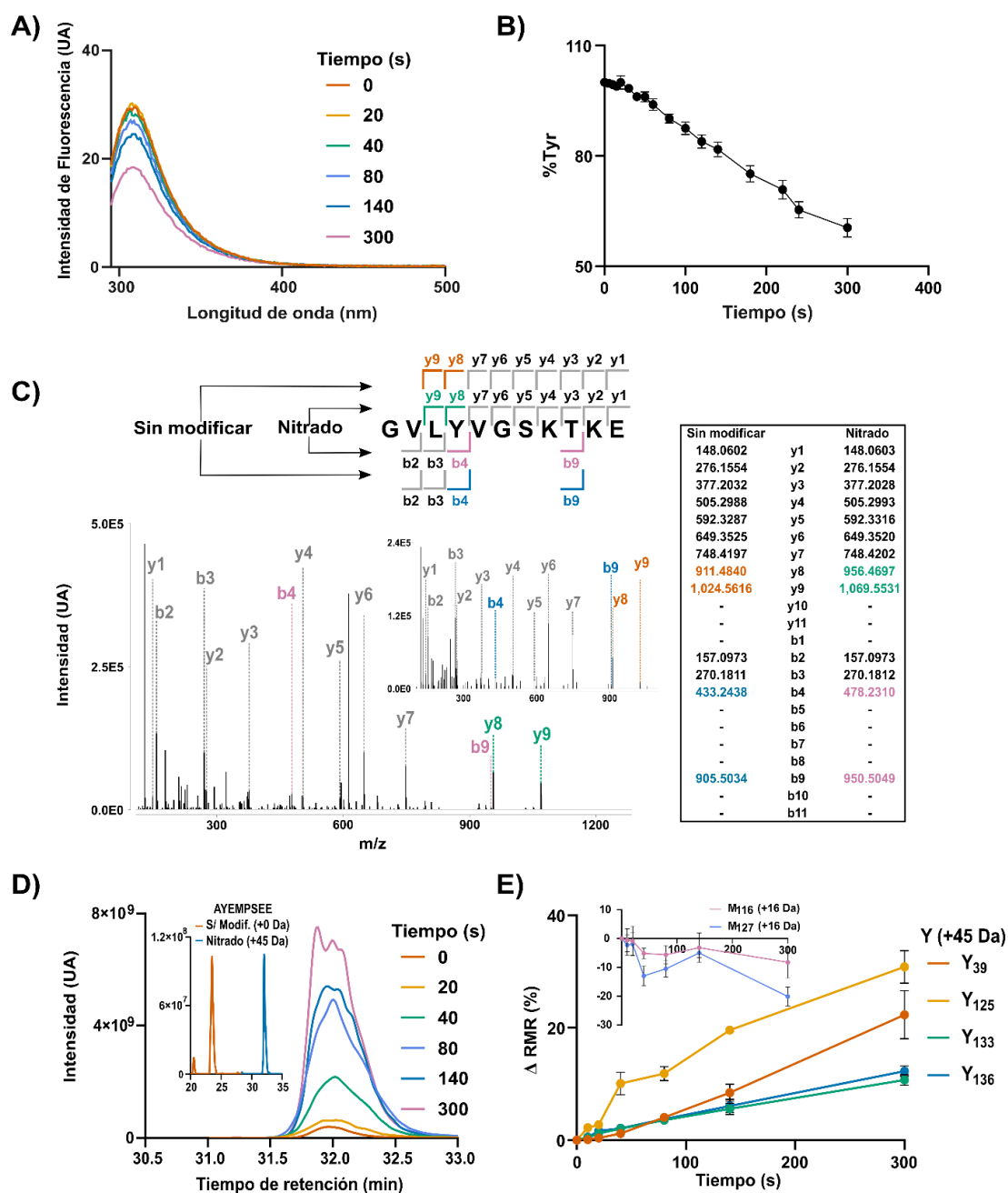


Figura 5-3. Nitración α Syn catalizado por el sistema Ru(bpy)₃²⁺/APS/NaNO₂/luz. Seguimiento de la reacción de nitración por emisión de fluorescencia (λ_{exc} 275 nm) (A) y cálculo del porcentaje de señal remanente de Tyr (Tyr %) (B). C) Espectro MS/MS de la nitración de Y₃₉ en el péptido ³⁶GVLY₃₉VGSKTKE⁴⁶. En color se destacan los fragmentos y b donde se observa una diferencia de masa de +45 Da, detallado en la tabla contigua. D) Cromatogramas extraídos para la nitración de Y₁₂₅ (¹²⁴AY₁₂₅EMPSEE¹³¹) en función del tiempo de irradiación. El gráfico insertado detalla la diferencia en el tiempo de retención entre el péptido nitrado y sin modificar. E) Gráfico del cálculo del grado de modificación (ΔRMR%) en función del tiempo de reacción, para la nitración de los residuos de Tyr y la oxidación de Met (gráfico interno). Los resultados están expresados como media ± SEM.

También se investigó la oxidación de residuos de Tyr (+10 y +20, +16 y +32 Da, respectivamente) y Met (+10, +16 Da). En el caso de la formación de las variantes oxidadas de Tyr, DOPA y TOPA, las modificaciones no pudieron ser identificadas (DOPA) o el grado de modificación fue despreciable (TOPA) en comparación a la nitración de los mismos residuos. Por otro lado, a pesar de que la oxidación de residuos de Met fue identificada en los espectros MS/MS, para el caso de los residuos M_1 y M_5 no fue encontrada en todas las muestras, con lo que no fue posible su cuantificación. Para los casos de M_{16} y M_{127} , el cálculo de diferencial de RMR% mostró alta variabilidad a lo largo de la reacción. Sin embargo, no se observó evidencia concreta de que el método foto-inducible empleado promueva la oxidación de estos residuos.

5.3- Efecto de la conformación de aSyn sobre la modificación de los residuos de Tyr

5.3.1- La presencia de aSyn altera el tamaño de las vesículas

Para modelar la estructura de hélice por parte de aSyn, preparamos SUV de diferente composición y carga (ver Materiales y Métodos). Se obtuvieron vesículas de fosfatidilcolina (100 % EPC), fosfatidilserina (50 % PS) y cardiolipina (50 % CL). En los últimos dos tipos de SUV, el resto de la composición porcentual se completó con fosfolípidos de EPC. La comprobación del tamaño de las vesículas generadas por sonicado se llevó a cabo mediante el análisis de tamaño de partículas por dispersión dinámica de la luz (DLS). Para todas las preparaciones de vesículas se observó una distribución unimodal y los tamaños (expresados como Z-promedio) presentaron valores por debajo de los 100 nm, típico para SUV [257], con índices de polidispersión menores a 0,3, lo que indica una distribución homogénea de vesículas fosfolipídicas (**Fig. 5-4A**) [258].

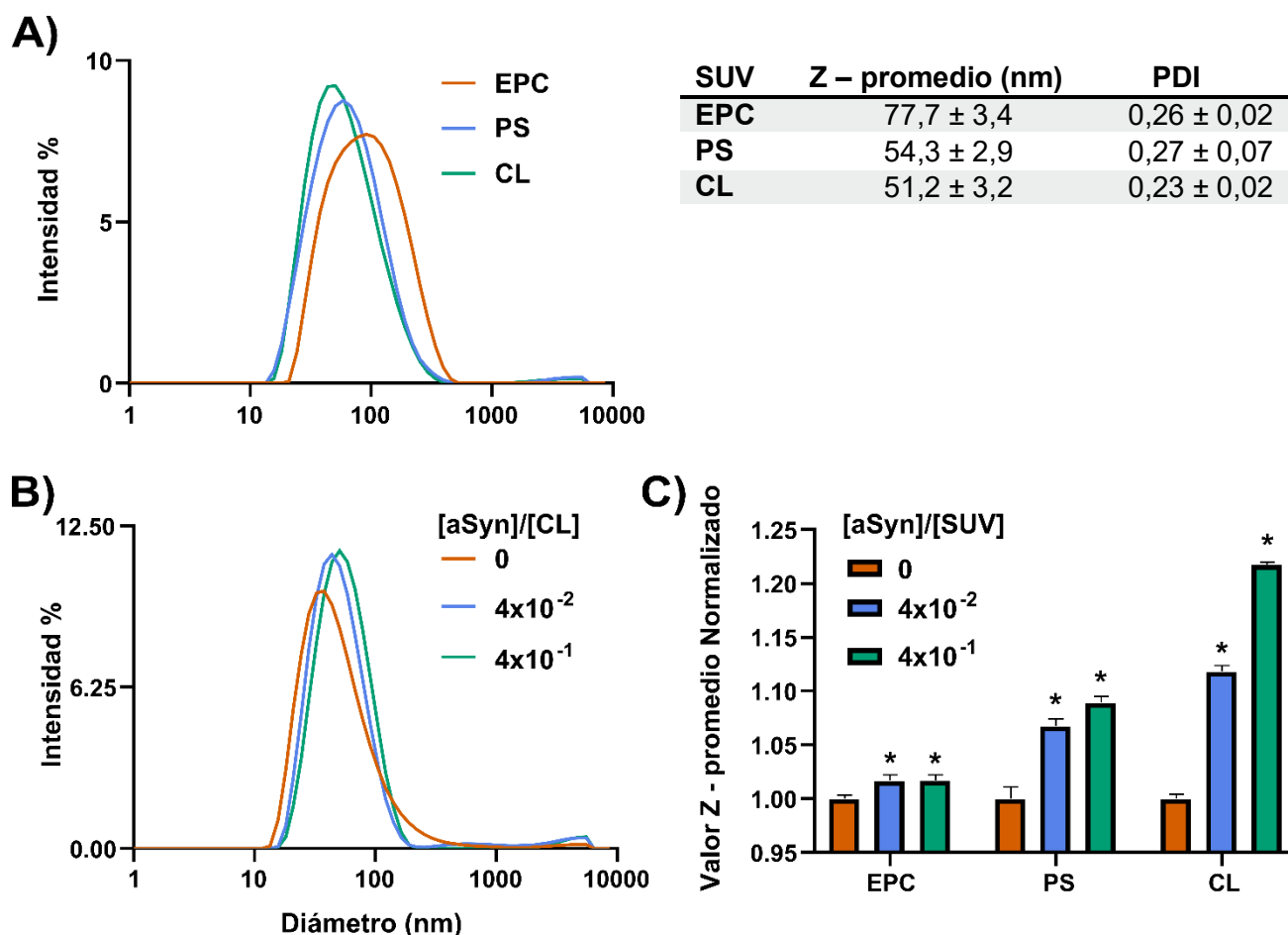


Figura 5-4. Caracterización de las SUV y efecto de la presencia de aSyn por DLS. A) Gráfico de la distribución de intensidad para cada una de las preparaciones de vesículas acompañado por la tabla que resume los valores obtenidos por el análisis de cumulantes: Z-promedio e índice de polidispersión (PDI). **B)** Cambios en la distribución de tamaños de vesículas de CL a relaciones crecientes de $[aSyn]/[CL]$. **C)** Análisis de los cambios en el tamaño de las SUV en presencia de aSyn a diferente relación $[aSyn]/[SUV]$. Los valores Z se normalizaron por el valor presentado por cada tipo de SUV en ausencia de proteína. En todos los casos, los resultados están expresados como media \pm SEM. * indica diferencias estadísticas comparado con el valor Z-promedio normalizado de las vesículas en ausencia de aSyn, con $P < 0,05$.

La capacidad de interacción de aSyn con vesículas de diferente composición lipídica, cabezas polares fosfolipídicas, tamaños y superficies ha sido ampliamente estudiada y es una de los aspectos mejor caracterizados para esta proteína (revisado por [55]). En este contexto, analizamos el efecto de la presencia de aSyn sobre el tamaño de las vesículas preparadas mediante DLS. Para esto se incubó proteína por 10 min a temperatura ambiente con las vesículas preparadas empleando dos relaciones molares $[aSyn]/[SUV]$ diferentes. Así se observó que, para el caso de las vesículas de CL con una carga neta de -1 se evidenció un aumento de tamaño proporcional al incremento de la relación $[aSyn]/[SUV]$ (**Fig. 5-4B**). La normalización de los valores Z-promedio para CL mostró un aumento de tamaño mayor a un 20% para la máxima relación $[aSyn]/[SUV]$ evaluada, en comparación con las vesículas de CL en ausencia de aSyn. Un comportamiento similar se observó para el caso de la incubación de aSyn con vesículas de PS, aunque con aumentos relativos menores. Finalmente, incluso la incubación de aSyn con las vesículas de EPC mostró cambios significativos en el tamaño relativo de las vesículas (**Fig. 5-4C**). En este sentido, se ha observado que, a pesar de

presentar constantes de disociación mayores que las vesículas aniónicas, aSyn puede interactuar con vesículas zwitteriónicas preparadas a partir de lípidos puros [259].

Existe amplia evidencia que indica que aSyn participa en la fusión de vesículas sinápticas con la membrana plasmática para permitir la liberación de neurotransmisores y/o su reciclado. Uno de los modelos establece que aSyn interactúa con las proteínas SNARE para permitir el correcto ensamblado de los complejos y promover así la fusión de las vesículas [260,261]. Por otro lado, también se ha hipotetizado que aSyn podría modificar su estructura secundaria, de una conformación de una única hélice extendida a una de dos hélices (*broken helix*), permitiendo la interacción entre las vesículas y la membrana plasmática de forma independiente al ensamblado de proteínas SNARE [262]. En línea con esto último, Fusco y col, empleando ensayos *in vitro*, observaron mediante microscopía de alta resolución, Cryo-EM y DLS un aumento progresivo del tamaño de las SUV (DOPE:DOPS:DOPC 5:3:2) en presencia de aSyn. Particularmente propusieron un modelo de doble anclaje en el cual aSyn interactuaría vía el extremo N-terminal con una de las vesículas (aa 1-25), mientras que la región 65-97 se asociaría a la restante, adoptando ambos segmentos la estructura de hélice [263]. En este sentido, el aumento del tamaño de las vesículas en presencia de aSyn observado en nuestros ensayos podría sugerir que la proteína estaría actuando como puente, promoviendo la agregación y/o fusión de estas. Finalmente, se ha descrito que la proteína presenta una afinidad superior por SUV que por LUV (vesículas unilamelares grandes) y se une más fuertemente a vesículas que contienen fosfolípidos aniónicos [55,259]. Esto último está en línea con nuestros resultados, donde además se observó un efecto creciente en términos de tamaño de vesícula relativos en presencia de proteína a medida que aumentamos la carga neta negativa de las SUV empleadas (EPC < PS < CL).

En conclusión, basándonos en la bibliografía y en los resultados obtenidos, existiría una interacción entre aSyn y las SUV, con un efecto más marcado en el caso de las vesículas aniónicas.

5.3.2- La modificación de aSyn está limitada en presencia de SUV

La reacción de entrecruzamiento se monitoreó mediante el cálculo de la relación de intensidades de fluorescencia DiTyr/Tyr para reacciones de 80 segundos de irradiación total a una intensidad de 1,1 mW/cm². Como se observa en la **Fig. 5-5A**, nuestros resultados sugieren que la presencia de vesículas podría proveer un efecto protector, disminuyendo la susceptibilidad de aSyn a formar oligómeros por entrecruzamientos de Tyr, en comparación con la proteína libre en solución, incluso en presencia de vesículas zwitteriónicas. Por otro lado, se pudo constatar que la disminución de la relación DiTyr/Tyr observada en presencia de SUV, varía de manera proporcional con el aumento de la concentración de las vesículas. También se observaron diferencias significativas en el efecto de la carga neta entre las vesículas. Así, las vesículas aniónicas con PS y CL, con cargas netas promedio de -0,5 y -1, respectivamente, mostraron un mayor efecto protector que las SUV

zwitteriónicas de EPC. El mismo resultado se observó al comparar las SUV aniónicas entre sí, siendo las de CL las que mayormente restringieron la formación de entrecruzamientos.

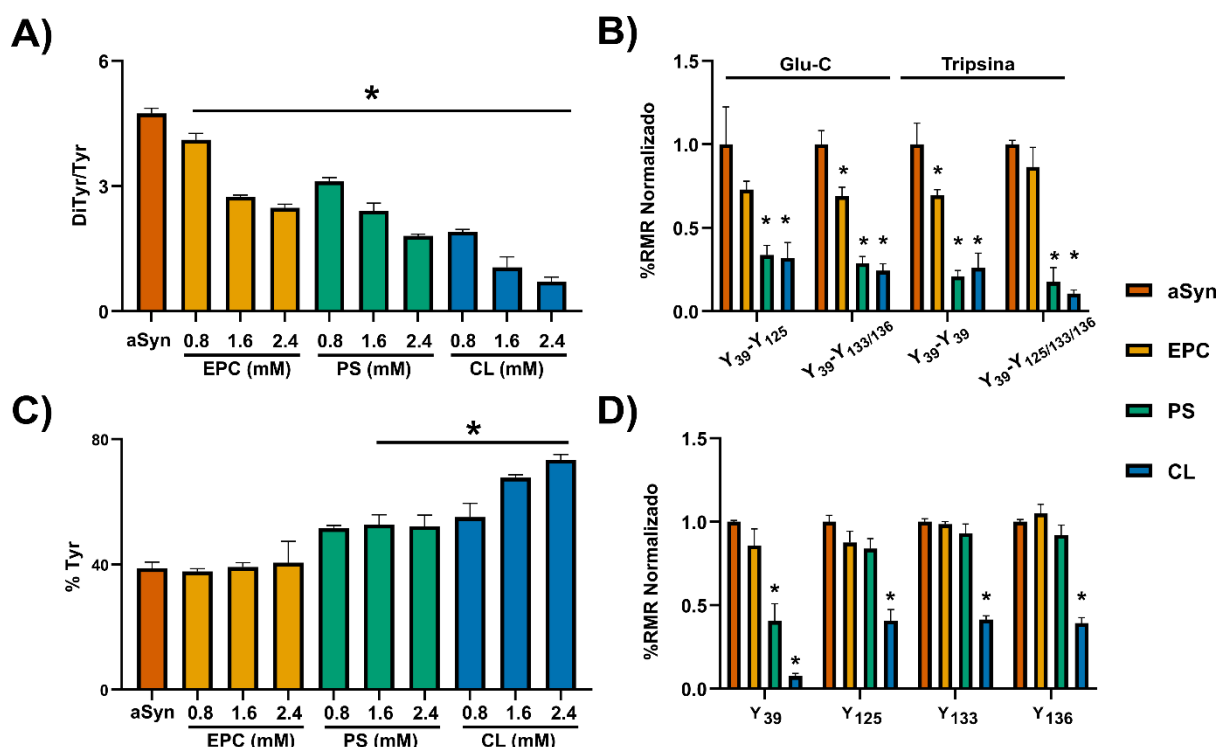


Figura 5-5. Modificación de aSyn en presencia de SUV. A) Análisis de la reacción de entrecruzamiento de Tyr, luego de 80 segundos de irradiación, mediante emisión de fluorescencia, expresada como la relación DiTyr/Tyr. **B)** Estimación del grado de modificación a nivel de residuo (Y₃₉), para cada uno de los entrecruzamientos identificados, luego de la digestión con Tripsina y Glu-C, para las reacciones en ausencia (aSyn) y en presencia de las diferentes SUV (EPC, PS y CL). **C)** Reacción de nitración de aSyn monitoreada por emisión de fluorescencia luego de 200 segundos de irradiación en ausencia o presencia de vesículas. Los resultados se expresan de forma relativa como porcentaje de señal de Tyr remanente (%Tyr). **D)** Estimación del grado de nitración para los 4 residuos de Tyr de aSyn. Los valores de %RMR tanto en **(B)** como en **(D)** fueron normalizados a la condición control, sin SUV (aSyn). En todos los casos, los resultados están expresados como media \pm SEM. * indica diferencias estadísticas comparado con las reacciones de aSyn libre en solución (aSyn), con $P < 0,05$.

Las diferencias entre la oxidación de aSyn libre en solución y en presencia de vesículas (2,4 mM) luego de 80 segundos de irradiación también se investigó mediante MS y se cuantificó mediante los métodos previamente descriptos. A pesar de que los péptidos entrecruzados anteriormente descriptos fueron identificados tanto en ausencia como en presencia de vesículas luego de la digestión con Glu-C (Y₃₉-Y₁₂₅ +952 Da, Y₃₉-Y_{133/136} +1068 Da) y Tripsina (Y₃₉-Y₃₉ +949.5 Da, Y₃₉-Y_{125/133/136} +4284,7 Da), se observaron diferencias significativas en el cálculo del %RMR normalizado a la reacción de aSyn libre en solución (**Fig 5-5B**). De manera similar a lo observado mediante emisión de fluorescencia, la tendencia de aSyn a formar entrecruzamientos Tyr-Tyr está altamente restringida en presencia de vesículas aniónicas de PS y CL. A pesar de observarse resultados dispares entre los diferentes entrecruzamientos en la comparación entre la reacción de aSyn libre en solución y en presencia de vesículas de EPC, se evidenció por este método el efecto de la carga entre las vesículas zwitteriónicas y aniónicas para todos los entrecruzamientos

analizados. Anteriormente se reportó que aSyn interacciona con una mayor afinidad con vesículas ricas en fosfolípidos ácidos [56]. Además, Y₃₉ se encuentra en la región central propuesta por Fusco y col. (V₂₆-K₉₇), cuya interacción con membranas depende de la composición de la misma [58]. En conjunto, nuestros resultados se ajustan al modelo propuesto de interacción con membrana, donde Y₃₉ estaría inhabilitada para reaccionar con otros residuos de Tyr, particularmente en presencia de vesículas de PS y CL.

La nitración de aSyn en presencia y ausencia de SUV se monitoreó mediante el cálculo del porcentaje de señal de fluorescencia remanente de Tyr (**Fig. 5-5C**). De manera similar a lo observado para los entrecruzamientos Tyr-Tyr, la presencia de vesículas aniónicas (PS y CL) parece disminuir la eficiencia de nitración, lo que se tradujo en un mayor % Tyr remanente en comparación a la reacción con vesículas zwitteriónicas y con aSyn libre en solución, luego de 200 segundos de irradiación. A pesar de que no se evidenció un efecto de la concentración mediante este método, nuevamente se pudo confirmar que la carga neta cumple un rol fundamental en la interacción de aSyn con las vesículas y, por lo tanto, modulando el grado de nitración de los residuos de Tyr.

La estimación del grado de modificación a nivel de residuo se realizó sobre reacciones con SUV 2,4 mM digeridas con Glu-C, luego de 200 segundos de excitación del fotosensibilizador. Mediante el cálculo de %RMR, normalizado al valor obtenido para la reacción de aSyn libre en solución, se pudo confirmar el efecto observado mediante emisión de fluorescencia por parte de vesículas aniónicas. Para las 4 Tyr de aSyn, se observó una disminución significativa en el grado de nitración en presencia de vesículas de CL. Tanto en presencia de vesículas de EPC y PS no se observaron diferencias respecto al control para la nitración de Y₁₂₅, Y₁₃₃ e Y₁₃₆. Sin embargo, es importante destacar que la modificación de Y₃₉ se vio afectada por la presencia de vesículas de PS. Nuevamente, esto podría deberse a que Y₃₉ está dentro de la región central (V₂₆-K₉₇) propuesta por Fusco y col. [58], lo que disminuiría la efectividad de nitración en presencia de vesícula aniónicas. A pesar de que se reconoce que en presencia de membranas el C-term de aSyn se mantiene desordenado, también se ha hipotetizado que esta parte de la secuencia podría interactuar con el N-term, modulando su afinidad por vesículas [171]. De esta forma la disminución en la eficiencia de nitración de los residuos del C-term en presencia de vesículas de CL sugieren que esta porción de la secuencia de aSyn podría tener un rol activo en la interacción con membranas, dependiente de la carga de estas. Sin embargo, no podemos asegurar si esta interacción con los fosfolípidos es directa (a través de atracción electrostática) o indirecta (por interacción con el N-term).

El efecto aparente de protección de la modificación de aSyn por las SUV podría tener también otras explicaciones. Una alternativa a la protección observada sería una dispersión de la luz de excitación del fotosensibilizador o de los fluoróforos de la proteína por las vesículas. Sin embargo, sabiendo que las SUV de distinta composición tienen tamaños comparables, no se podría explicar el porqué de las diferencias entre las distintas composiciones de fosfolípidos. Otra alternativa sería el

secuestro del fotosensibilizador por las vesículas fosfolipídicas, lo que disminuiría la concentración efectiva disponible para la proteína. Así se procedió a analizar la posible interacción fotosensibilizador-vesículas por métodos espectroscópicos. Los espectros de emisión de fluorescencia del $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{+2}$ (λ_{em} 550-750 nm) en presencia de vesículas de EPC y PS no mostraron diferencias con los espectros obtenidos a partir de la excitación del fotosensibilizador en *buffer* PBS (λ_{exc} 450 nm) (**Fig.5-6A**). Asimismo, tampoco se observaron corrimientos en los espectros de absorbancia en la zona de la transición de transferencia de carga metal ligando (MLCT, 410-470 nm). Sin embargo, en el caso de las vesículas de CL, se evidenció un corrimiento del máximo de emisión hacia mayores longitudes de onda (de 614 a 626 nm), sin modificación de la banda de absorción MLCT (**Fig.5-6A**). Este efecto batocrómico fue previamente descrito por Mielsen y col. en presencia de micelas de SDS, quienes atribuyeron el corrimiento hacia el rojo a la interacción del fotosensibilizador con las cadenas hidrocarbonadas [264]. En este contexto, dada la posible interacción entre el fotosensibilizador y las vesículas, particularmente de CL, profundizamos el estudio mediante mediciones de anisotropía y el tiempo de vida del $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{+2}$ en presencia y ausencia de SUV. El cálculo de la anisotropía no se vio modificado en ningún de los casos analizados (**Fig.5-6B**). Esto podría deberse al largo tiempo de vida de la sonda en solución (con valores que van desde los 160 a los 600 ns [265–267] que podría ser equivalente o superior al tiempo de rotación de las SUV. Dado esto, realizamos las mismas medidas en 20 % glicerol para ralentizar el movimiento de las vesículas y mejorar así la sensibilidad del ensayo para determinar cambios en la orientación del fotosensibilizador. Sin embargo, nuevamente no se determinaron diferencias significativas en los valores de anisotropía calculados (**Fig.5-6B**). Finalmente la tabla de la **Fig. 5-6C** resume los valores de tiempo de vida (τ , ns) para el fotosensibilizador en ausencia y presencia de las vesículas. Los datos registrados para el $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{+2}$ en solución acuosa se ajustaron a una caída monoexponencial, mientras que para la presencia de las vesículas se empleó un modelo biexponencial (**Fig. 5-6C**). El valor de τ calculado a partir del ajuste para la sonda en solución fue de 360 ns, similar a lo reportado en la bibliografía [265]. El ajuste biexponencial del perfil de caída de fluorescencia para las vesículas mostro que ~99 % de las especies exhiben tiempos de vida ligeramente mayores (EPC y CL) y menores (PS) a lo observado para la sonda en ausencia de SUV. Existen reportes del aumento en el tiempo de vida del $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{+2}$ en presencia de micelas de SDS y LUV aniónicas, con incrementos de entre el 15 y el 40 % que se asocian a la interacción entre el fotosensibilizador y los lípidos, ya sea con sus cabezas polares o las cadenas hidrocarbonadas. Sin embargo, nuestros resultados mostraron cambios relativos menores al 5 % (dentro del rango de error de las determinaciones) e incluso no se observaron variaciones entre la presencia de vesículas zwitteriónicas (EPC) y aniónicas (CL).

No podemos descartar completamente una interacción del $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{+2}$ con las vesículas, particularmente de CL. Sin embargo, a pesar del corrimiento observado en los espectros de

fluorescencia, no se observaron cambios significativos tanto en la anisotropía como en el tiempo de vida media en presencia de las vesículas. Por lo tanto, las diferencias observadas en el grado de modificación de residuos de Tyr podrían atribuirse mayormente a una interacción diferencial de aSyn con el fotosensibilizador, ya sea porque los residuos blanco se encuentran ocultos en las conformaciones helicoidales, o por una limitación a la interacción de los monómeros para que se formen los entrecruzamientos.

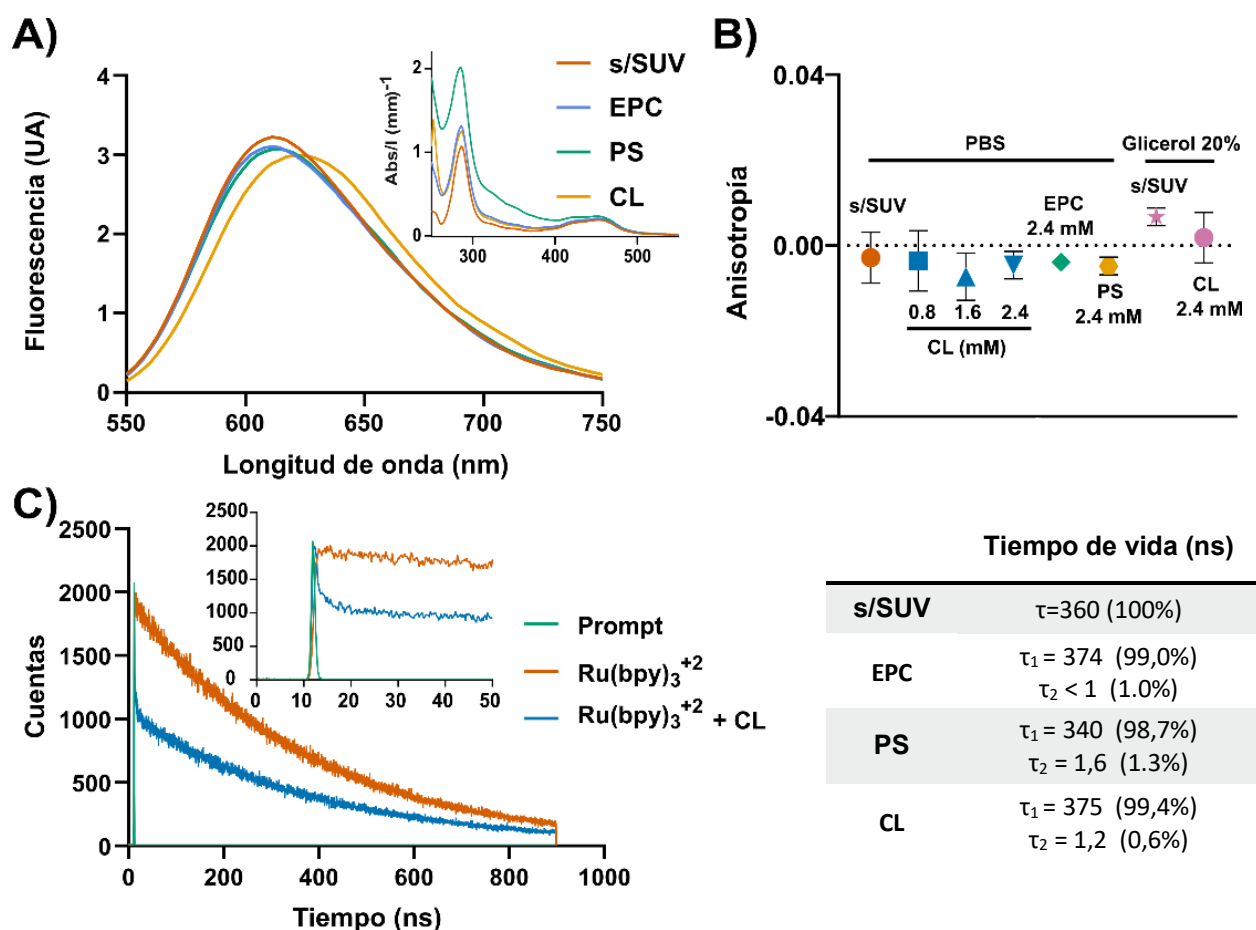


Figura 5-6. Análisis de la interacción del fotosensibilizador con las SUV. **A)** Espectros de emisión de fluorescencia y absorbancia (gráfico interno) **(A)** cálculo de la anisotropía **(B)** de 10 μM $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{+2}$ (λ_{exc} 450 nm) en ausencia (s/SUV) y presencia de 2,4 mM SUV. En este último caso, se evaluaron mezclas en PBS y en PBS con 20 % Glicerol. En todos los casos, se emplearon al menos 2 réplicas para el análisis y los resultados están expresados como media \pm SEM para el cálculo de anisotropía. **C)** Análisis de cambios en el tiempo de vida del fotosensibilizador en presencia de las vesículas. Se muestran los perfiles de caída de fluorescencia del fotosensibilizador en solución y en presencia de vesículas de CL. *Prompt* se refiere al perfil de respuesta del equipo, obtenido con una solución de vesículas 3,7 mM. La tabla adjunta detalla los valores de τ (ns) obtenidos luego del ajuste. Los valores entre paréntesis especifican la abundancia de las especies asociadas a los tiempos de vida calculados. Para estos ensayos se empleó 75 μM $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{+2}$ y 3,4 mM SUV.

5.3.3- La restricción de la Y₃₉ en las fibrillas limita su modificación

Cuando aSyn agrega formando fibrillas amiloideas, esta cambia radicalmente de estructura y adopta principalmente una conformación de hoja- β entrecruzadas entre monómeros, conocida como

cross- β , como se describió previamente. Para modelar esta conformación y analizar la susceptibilidad de los residuos de Tyr a ser modificados en este contexto, preparamos fibrillas de aSyn mediante incubación a 37 °C con agitación por 1 semana y se verificó la formación de estas estructuras mediante el ensayo específico con Tioflavina T. Previo a su oxidación o nitración, las fibrillas fueron aisladas de los restos de monómero no agregado y oligómeros solubles.

Como primer paso, las reacciones de entrecruzamiento para aSyn monomérica y fibrilar se estudiaron por emisión de fluorescencia, siguiendo la relación DiTyr/Tyr durante un tiempo total de irradiación de 80 segundos. Como se puede observar en la **Fig. 5-6A**, a pesar de que ambas reacciones durante los primeros 15 segundos siguen una cinética similar, la formación de Dityr en el caso de las fibrillas rápidamente se estanca y llega a una meseta que no se altera durante el tiempo de irradiación estudiado. Por el contrario, la reacción de aSyn monomérica alcanzó valores de DiTyr/Tyr aproximadamente 5 veces mayores que los obtenidos para la reacción con fibrillas. Posteriormente, se trataron las muestras con Cloruro de Guanidinio para desestabilizar las fibrillas amiloides, y se las sometió a digestión con Tripsina y Glu-C, seguido del análisis por MS. Luego de la asignación de espectros MS/MS por parte de pLink2 y su validación manual, se llegó a la identificación de péptidos entrecruzados en ambas muestras. Sin embargo, en el caso de las fibrillas de aSyn, los espectros validados fueron escasos y esporádicos, sólo encontrándose en muestras tratadas con Tripsina y exclusivamente para el entrecruzamiento $Y_{39}-Y_{C-term}$ ($^{33}TKEGVLY_{39}VGSK^{43-103}NEEGAPQEGILEDMPVDPDNEAY_{125}EMPSEEGY_{133}QDY_{136}EPEA^{140}$, +4284,7 Da). En sintonía, la estimación del grado de modificación a nivel del residuo Y_{39} debido a este último entrecruzamiento mostró valores de %RMR muy pequeños en comparación a los obtenidos para la reacción con aSyn monomérica (**Fig. 5-6B**).

Se repitió el estudio para la reacción de nitración para la cual se excitó el fotosensibilizador por 200 segundos. La modificación de la nitración de aSyn se monitoreó por emisión de fluorescencia y el cálculo relativo del % Tyr. No se observaron diferencias en la caída progresiva de señal de Tyr a lo largo de la reacciones con aSyn monomérica y fibrilar (**Fig. 5-6C**). A su vez, los 4 residuos de Tyr fueron identificados como nitrados en ambas muestras y el cálculo del grado de nitración normalizado para los residuos del C-terminal no mostró diferencias entre las variantes monomérica y fibrilar. Sin embargo, se observó una disminución estadísticamente significativa en la nitración de Y_{39} (**Fig. 5-6D**).

En conclusión, nuestros resultados sugieren que no existe una restricción conformacional que limite la accesibilidad del fotosensibilizador cuando aSyn forma parte de fibrillas amiloides y, por lo tanto, impida que los residuos del C terminal sean modificados. Sin embargo, dado que Y_{39} se encuentra próximo al núcleo que adopta la estructura *cross- β* en cada monómero constituyente de las fibrillas ($E_{46}-K_{96}$) [66], su susceptibilidad tanto a formar entrecruzamientos, como a ser nitrado se ve comprometida, particularmente en el primer caso. La estructura de las fibras impide la interacción

y formación de enlaces covalentes entre Y₃₉ y otros residuos, particularmente los del C-terminal desordenado. Sin embargo, la reducción en la accesibilidad del fotosensibilizador y radicales •NO₂ podría jugar un rol decisivo en la disminución de la eficiencia de nitración de Y₃₉.

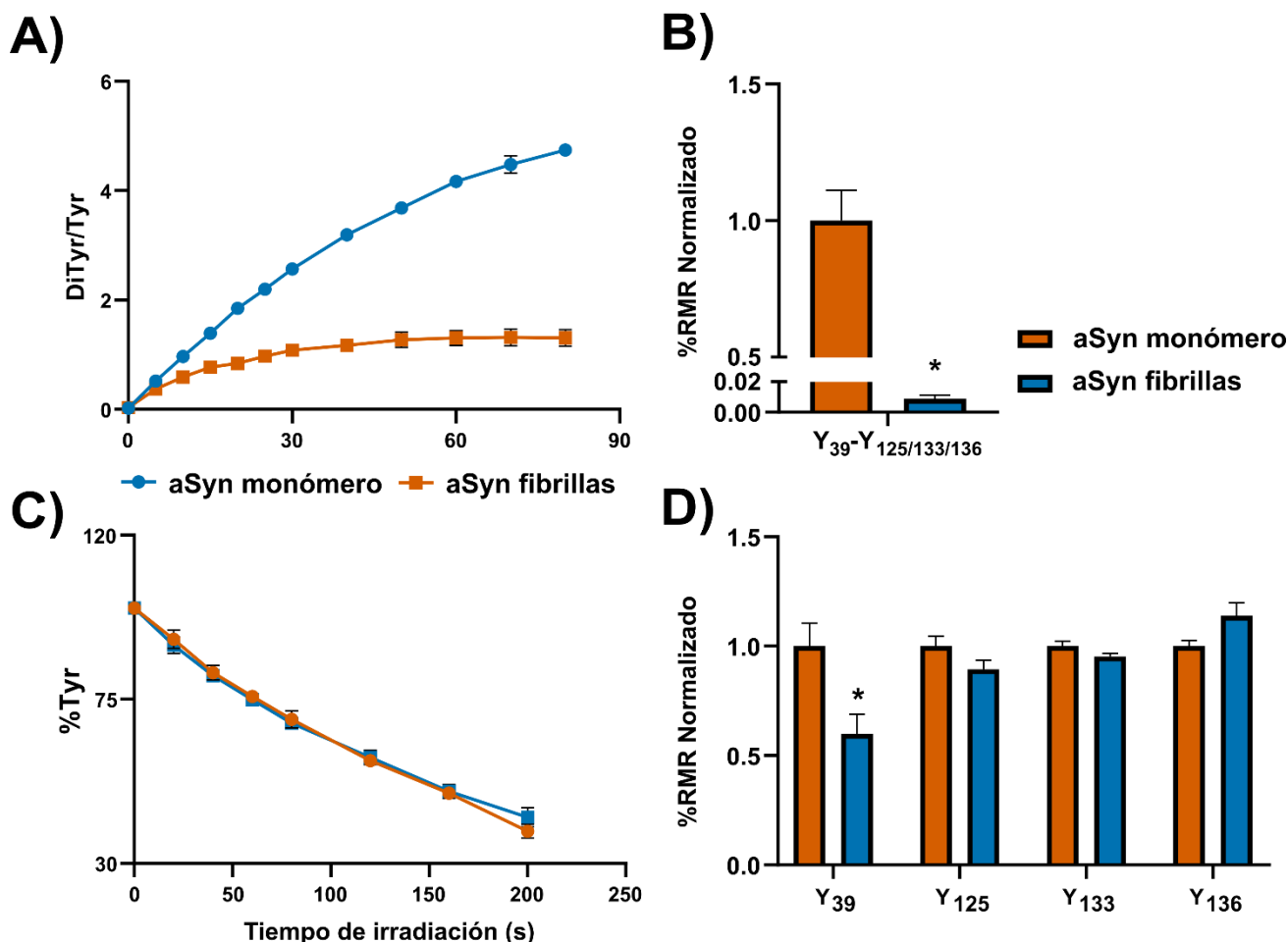


Figura 5-6. Modificación de aSyn cuando adopta conformación fibrilar. Tanto la reacción de entrecruzamiento (A), como la de nitración (C) de aSyn monomérica y fibrilar, se monitorearon por emisión de fluorescencia y analizaron mediante el cálculo relativo de la relación DiTyr/Tyr y %Tyr, respectivamente. B y D) Estimación del grado de modificación a nivel de residuo, expresado como %RMR. Para el caso de la reacción de formación de entrecruzamientos, sólo Y₃₉-Y_{125/133/136} pudo ser identificado y cuantificado en la muestra derivada de fibrillas de aSyn (B). Los valores de %RMR tanto en (B) como en (D) fueron normalizados a la condición control, aSyn monomérica. En todos los casos, los resultados están expresados como media \pm SEM. * indica diferencias estadísticas comparado con las reacciones de aSyn libre en solución (aSyn), con $P < 0.05$.

5.4- Conclusión

El modelado de modificaciones oxidativas de aSyn se ha abordado mediante diversas estrategias que incluyen los sistemas Hemoglobina/H₂O₂, Cu⁺¹/O₂, y Cu⁺²/H₂O₂ [164,199,255] para los entrecruzamientos, y el uso de peroxinitrito y tetranitrometano para la nitración [170,173]. Como alternativa de modificación selectiva, anteriormente se empleó el sistema foto-inducible

$\text{Ru}(\text{bpy})_3^{+2}/\text{APS}/\text{luz}$ para el estudio y caracterización de variantes entrecruzadas de aSyn [182]. En el presente estudio profundizamos la aplicación de este sistema para la caracterización de variantes entrecruzadas y lo extendimos a la producción y estudio de la nitración de residuos de Tyr mediante el agregado de NaNO_2 . De forma similar a lo expuesto en el capítulo anterior, se puede manipular la reacción y lograr la formación específica de NitroTyr mediante el control de la relación $[\text{NaNO}_2]/[\text{Tyr}]$. Este sistema resulta ideal para el caso de aSyn ya que no posee residuos de Trp o Cys en su secuencia que puedan interferir y, aunque menores, dar reacciones secundarias no deseadas.

Tanto la formación de los entrecruzamientos como la reacción de nitración se pueden monitorear mediante el empleo de métodos espectroscópicos, y posteriormente caracterizar a través del uso de MS. Finalmente, la cuantificación libre de marca basado en la extracción de los cromatogramas a partir de los espectros de MS provee una estrategia viable para evaluar el grado de modificación a nivel de residuo, para ambos sistemas de foto-oxidación. Así pudimos determinar que Y_{39} es determinante para la formación de entrecruzamientos, mientras que todos los residuos de Tyr son susceptibles a la nitración.

Las estrategias empleadas para el estudio de la proteína libre en solución son particularmente útiles para evaluar el efecto de cambios conformacionales sobre la modificación de residuos de Tyr. Así quedó demostrado al aplicar estas estrategias cuando aSyn adopta diferentes conformaciones. La formación de entrecruzamientos está altamente restringida tanto en presencia de vesículas (particularmente aniónicas), como cuando aSyn forma agregados amiloideos, mayormente debido al bloqueo de Y_{39} . Resultados similares se obtuvieron para la nitración de residuos de Tyr, donde se observó una disminución en la eficiencia de modificación principalmente en Y_{39} , para ambas conformaciones de aSyn. En conclusión, de correlacionarse modificaciones particulares, como la nitración de Y_{39} o el entrecruzamiento $\text{Y}_{39}\text{-Y}_{133/136}$, con algún mecanismo de toxicidad específico, esto podría explicar la ganancia de función tóxica debido a las PTM originadas a partir de una conformación particular de aSyn bajo condiciones de estrés oxidativo. Así, la identificación de estas modificaciones en muestras complejas podría ser empleada en el desarrollo de herramientas innovadoras para el diagnóstico temprano de Sinucleopatías. Por otro lado, cabe resaltar que la variabilidad conformacional de aSyn es un factor a tener en cuenta, pudiendo esta modificar la proporción entre la modificación de diferentes residuos, con lo que el análisis del balance entre las PTM de aSyn podría resultar como un biomarcador *per se* de las Sinucleopatías, lo que aún requiere estudios complementarios y una validación clínica.

Capítulo 6

Caracterización de las variantes de α -Sinucleína

6.1- Introducción

Una mejor comprensión de las modificaciones postraduccionales de aSyn en el contexto de las Sinucleopatías podría colaborar con el desarrollo de técnicas de diagnóstico temprano y/o tratamiento. Así, la caracterización de las variantes generadas podría sentar las bases para futuros avances en la lucha contra esta patología. Por lo tanto, una vez optimizados los sistemas de modificación foto-inducibles y aplicados en aSyn para el análisis del patrón de modificación cuando esta proteína adopta diferentes estructuras, nos propusimos caracterizar el efecto de las variantes generadas sobre la agregación amiloide, la interacción con membranas y la toxicidad en modelos de células eucariotas.

6.2- Purificación de las variantes generadas por los métodos foto-inducibles

Para profundizar en la caracterización, se generaron las especies modificadas de forma similar a lo anteriormente expuesto. Para la formación de oligómeros entrecruzados se realizaron reacciones de 150–200 μ M aSyn, 40 μ M Ru(bpy)₃⁺² y 1,2 mM APS, mientras que para la reacción de nitración se adicionó también 20 mM NaNO₂, con el fin de minimizar la generación de los primeros. Para ambas reacciones el punto final se definió al alcanzar un 55–60 % de consumo de la señal de emisión de Tyr inicial (**Fig. 6-1A**). Luego de su obtención, las variantes de aSyn fueron purificadas mediante cromatografía de exclusión molecular (SEC) empleando una columna de Sephadex G25 PD-10 para eliminar los componentes de la mezcla de reacción (Ru(bpy)₃⁺², APS y, de ser necesario, NaNO₂). Se colectaron fracciones de 1 mL durante 9 min (flujo ~1 mL/min) y se analizaron las fracciones por Absorbancia UV-VIS. Tanto la proteína nitrada (N-aSyn, **Fig. 6-1B**) como los oligómeros entrecruzados (aSyn XL, **Fig. 6-1C**) eluyeron entre las fracciones 4 a 7. En el primer caso se observa la presencia de un pico ancho centrado en los 400 nm característico de la Tyr nitrada a pH 7,4, mientras que en el segundo se distingue un hombro alrededor de los 320 nm propio de la presencia de oligómeros entrecruzados. Finalmente, el Ru(bpy)₃⁺² eluyó a partir de la fracción 8 junto con el APS y el NaNO₂ excedente, donde se evidencia un pico a 450 nm. Las muestras fueron posteriormente concentradas con filtros Amicon con tamaño de poro de 3 kDa y, en simultáneo, se eliminaron posibles trazas remanentes de Ru(bpy)₃⁺², APS y/o NaNO₂. Además, las muestras fueron filtradas y esterilizadas bajo flujo laminar empleando filtros de jeringa de PES (0,22 μ m) y cuantificadas mediante el ensayo de BCA. Previo al empleo de las muestra en los ensayos de caracterización, se las analizó mediante SDS-PAGE (**Fig. 6-1D**). De esta forma, para el caso de la proteína sin modificar (aSyn wt) se verificó sólo la presencia de monómero. Si bien aSyn tiene un

peso molecular aproximado de 14,4 kDa, su migración “anormal” en un gel SDS-PAGE se debe a la alta presencia de residuos cargados negativamente en su secuencia, lo que evita que interaccione con SDS como la mayoría de las proteínas, generando complejos aSyn/SDS con diferentes densidades de carga que se retienen en el gel por más tiempo [268]. En el caso de la muestra sujeta a la reacción de entrecruzamiento, se observó la desaparición completa de la banda correspondiente a monómero y la formación de múltiples especies de pesos moleculares mayores a 40 kDa (trímeros u oligómeros de mayor orden); mientras que en el caso de la muestra nitrada, a pesar de que predomina la banda de monómero, en las condiciones de reacción aún se pudo observar que se generan dímeros y, en menor medida, algunas variantes oligoméricas. Sin embargo, basándonos en los resultados obtenidos en los espectros de fluorescencia y absorbancia para la reacción de nitración, se deduce que existe una prevalencia de la modificación NitroTyr por sobre DiTyr en esta muestra.

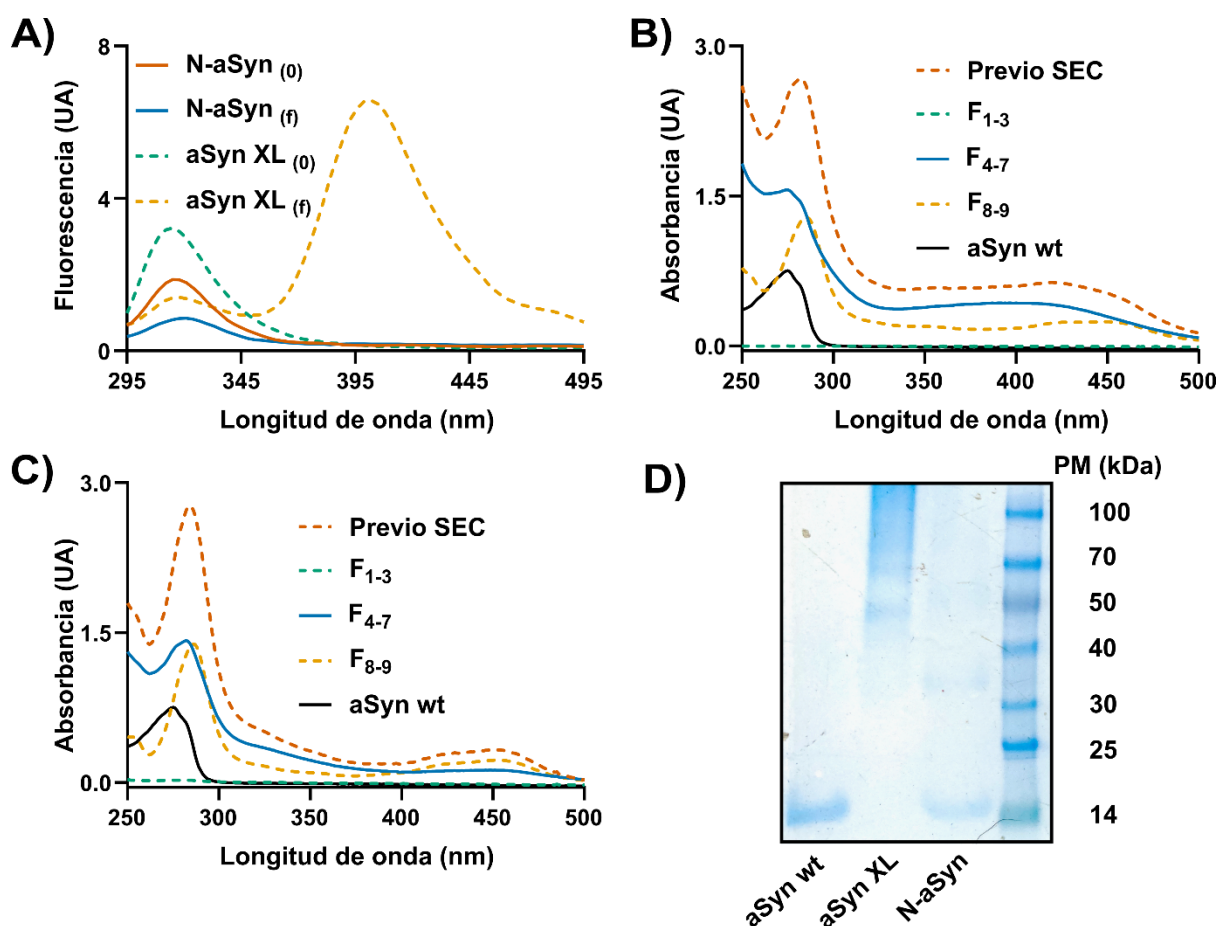
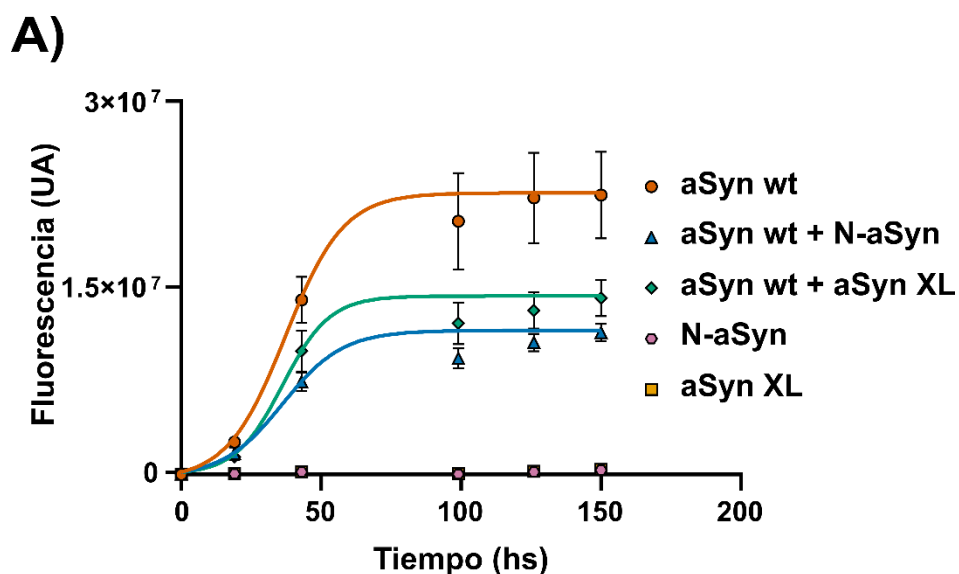


Figura 6-1. Purificación de aSyn y sus variantes oxidadas para ensayos de caracterización. Se generaron las variantes mediante las reacciones foto-inducibles y se las monitoreó mediante emisión de fluorescencia ($\lambda_{exc}=275$ nm) hasta un consumo de señal de Tyr de ~55-60 % (A). Se grafican los espectros iniciales (0) y finales (f) para las reacciones de nitración (N-aSyn) y entrecruzamiento (aSyn XL). La eliminación de $Ru(bpy)_3^{+2}$, APS y $NaNO_2$ para las muestras de N-aSyn (B) y aSyn XL (C) se logró mediante SEC; y las fracciones colectadas para cada preparación se analizaron mediante absorbancia UV-Vis. Para cada una de las preparaciones se muestra el espectro previo a la cromatografía (Previo SEC), las fracciones colectadas en cada caso y el espectro de referencia de aSyn sin modificar (aSyn wt). D) Análisis por SDS-PAGE de las reacciones de modificación de aSyn. PM indica el patrón de peso molecular.

6.3- Efecto de las variantes de aSyn sobre la agregación

Las variantes oxidadas y nitradas de aSyn no agregan e interfieren con la agregación amiloidea de la proteína sin modificar

Una de las características mejor descritas de aSyn es su habilidad de formar grandes agregados con características amiloides, los cuales han sido directamente relacionados con las Sinucleopatías. En este sentido, el efecto de la introducción de PTM en aSyn sobre el proceso de agregación es uno de los fenómenos más estudiados (ver Introducción 1.6.3). Habiéndose obtenido, purificado y cuantificado las variantes nitradas (N-aSyn) y entrecruzadas (aSyn XL) analizamos la tendencia a agregar de las mismas. Para esto, monitoreamos la formación de agregados de la proteína sin modificar (aSyn wt), las variantes generadas (100 μ M en PBS), y combinaciones de aSyn sin modificar y modificada (100 μ M aSyn wt + 20 μ M aSyn modificada) a lo largo de 150 hs de incubación con agitación y a 37 °C empleando la sonda Tioflavina T (TioT, 20 μ M), cuyo aumento en la emisión de fluorescencia a 482 nm se correlaciona con la formación de agregados amiloides [187]. Las cinéticas de agregación para las diferentes muestras analizadas se ajustaron a un modelo de nucleación-propagación tal como se especifica en Materiales y Métodos. A diferencia de la proteína sin modificar, las muestras de variantes oxidadas de aSyn (100 μ M N-aSyn y 100 μ M aSyn XL) no mostraron capacidad de agregar dado que no se observaron cambios en la señal de TioT a lo largo del tiempo analizado ($\Delta Y = Y_f - Y_0 \sim 0$ para ambos casos) (**Fig. 6-2A**). Por otro lado, la adición de 20 μ M N-aSyn o aSyn XL a 100 μ M aSyn wt provocó una reducción sustancial en ΔY en comparación con la muestra de 100 μ M aSyn. A su vez, no se observaron cambios significativos tanto en la constante de crecimiento aparente (K_{ap}) como en el tiempo para alcanzar el punto medio de la fase de crecimiento ($T_{1/2}$) (**Fig. 6-2B**), los cuales constituyen parámetros que se asocian generalmente a la disponibilidad de monómero sin modificar libre al inicio de la reacción. Estos resultados sugieren que las variantes de aSyn poseen un efecto inhibitorio sobre la agregación de aSyn wt, efecto anteriormente descrito tanto para las variantes entrecruzadas [182] como para la nitrada [168,170], posiblemente debido a la estabilización de especies intermediarias que interrumpen el proceso de agregación y evitan la formación de variantes que presentan la estructura *cross- β* . Las especies modificadas de aSyn también podrían actuar como terminadores de cadena en la propagación de las fibrillas amiloides. Estos resultados resaltan la función de las fibrillas amiloides maduras como un mecanismo de protección de las células contra especies oligoméricas tóxicas de aSyn, pudiendo las variantes oxidadas y nitradas potenciar esta actividad tóxica.



B)

Muestra	$\Delta Y/10^6$	$K_{ap} \times 10^2$ (hs ⁻¹)	$T_{1/2}$ (hs)
aSyn wt 100 μ M	$22,6 \pm 3,5$	$9,6 \pm 0,4$	$37,7 \pm 1,3$
aSyn wt 100 μ M + N-aSyn 20 μ M	$11,5 \pm 0,7^*$	$9,3 \pm 0,8$	$37,0 \pm 2,3$
aSyn wt 100 μ M + aSyn XL 20 μ M	$14,2 \pm 1,5^*$	$11,9 \pm 2,2$	$36,4 \pm 1,1$
N-aSyn 100 μ M	$0,3 \pm 0,2^*$	-	-
aSyn XL 100 μ M	$0,4 \pm 0,1^*$	-	-

ΔY indica la diferencia de intensidad de señal de emisión fluorescencia entre el tiempo final e inicial. K_{ap} y $T_{1/2}$, indican la constante de velocidad de crecimiento aparente y el tiempo requerido para alcanzar el punto medio de la fase de crecimiento rápido, respectivamente.

Figura 6-2. Cinética de agregación de aSyn wt y variantes oxidadas. **A)** Monitoreo de la cinética de agregación en función del tiempo de incubación mediante la medida de emisión de fluorescencia de la sonda TioT para las proteínas sin modificar (aSyn wt, 100 μ M), nitrada (N-aSyn, 100 μ M) y entrecruzada (aSyn XLm 100 μ M) y las combinaciones de estas especies en una proporción 5:1 (aSyn wt100 μ M + N-aSyn/aSyn XL 20 μ M). Los datos obtenidos se emplearon para ajustar un modelo de nucleación-propagación (línea sólida), a partir de la cual se obtuvieron los parámetros cinéticos especificados en la tabla del **panel B**, excepto para las muestras de N-aSyn y aSyn XL 100 μ M que no evidenciaron un cambio significativo en la señal de TioT (donde solo se muestran los valores de ΔY). Para cada tiempo, los resultados se expresan como la media \pm SEM. Los resultados de la tabla muestran el promedio \pm SEM de 3 experimentos independientes. * indica diferencias estadística comparado con el valor exhibido por aSyn wt, con un $P < 0,05$.

6.4- Efecto de las variantes de aSyn sobre las SUV

Las modificaciones oxidativas de aSyn alteran su interacción con vesículas SUV

Tal como se especificó anteriormente, una de las características mejor descritas de aSyn es su habilidad de unirse a membranas fosfolípídicas, adoptando principalmente una estructura de hélice. En este contexto, y basándonos en los resultados obtenidos en el capítulo anterior (ver sección 5.2), analizamos el efecto de incubaciones cortas de las variantes generadas con las vesículas de CL por DLS y las comparamos con el efecto generado por la proteína sin modificar. Así,

se observó en los gráficos de distribución de intensidad que tanto aSyn wt como sus variantes generaron aumentos del tamaño aparente de las vesículas (**Fig. 6-3A**), lo que sugiere una interacción proteína-lípido. El análisis de los valores Z-normalizados mostró diferencias significativas en los tamaños de las vesículas entre las muestras incubadas con aSyn wt y sus variantes oxidadas y nitradas empleando diferentes relaciones [aSyn]/[CL] (**Fig. 6-3B**). En particular, en el caso de N-aSyn se determinó una pequeña disminución en el tamaño de las vesículas de CL en comparación con la incubación con aSyn wt. Se ha sugerido que la nitración en la posición 39 altera la habilidad de aSyn de interactuar con membranas, ya sea por cambios en la estructura secundaria y/o por alteración del pK_a del anillo fenólico de Tyr [168,169,171]. Nuestros resultados apoyan esta observación, sugiriendo una alteración en la interacción por parte de la variante nitrada de aSyn con las vesículas aniónicas de CL producto del aumento de las cargas negativas de la proteína, particularmente en el dominio N-terminal a través de la nitración de la Y₃₉. Por otro lado, la incubación de las variantes entrecruzadas con las vesículas produjo aumentos considerables en el tamaño en comparación con aSyn wt. En línea con esto, anteriormente se ha descrito que la formación de uniones covalentes Tyr-Tyr mediante el sistema Citocromo C/H₂O₂ retiene la capacidad de estas especies de interactuar con SUV y de adoptar estructura de hélice en presencia de micelas de SDS [269].

Nuestros resultados aportan evidencia de la existencia de la interacción de las variantes oxidadas de aSyn con vesículas aniónicas. Sin embargo, para completar la caracterización se deberá profundizar en el análisis estructural de estas proteínas (principalmente por CD). Además, sería interesante analizar también si estas variantes alteran la estabilidad de las vesículas, tal como se observó para oligómeros generados a partir de la agregación de aSyn en presencia de ácido docosahexaenóico [270].

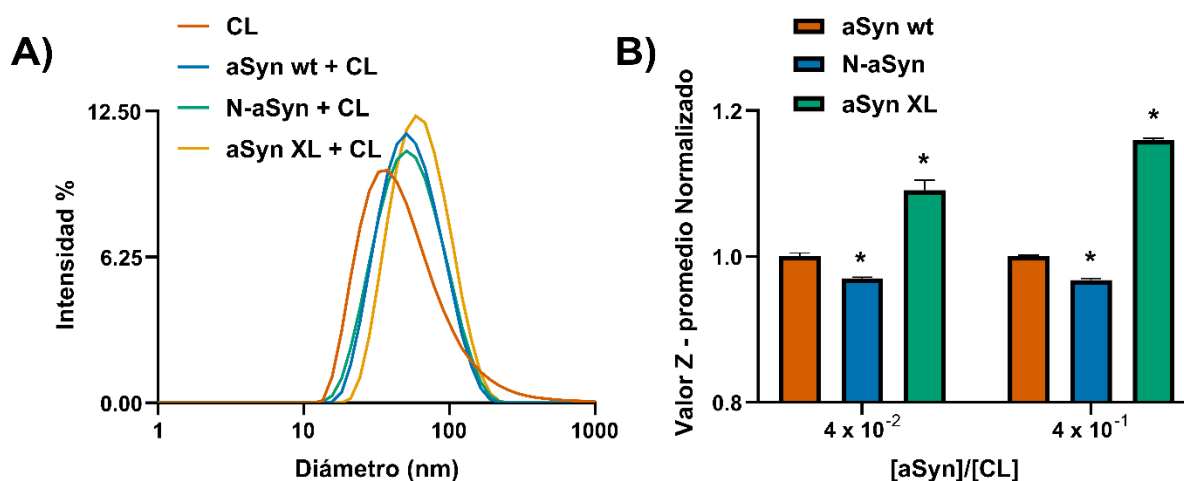


Figura 6-3. Efecto de la incubación de aSyn wt y las variantes oxidadas sobre el tamaño de las vesículas de CL. A) Cambios en la distribución de tamaños de vesículas de CL para una relación [aSyn]/[CL] de 4×10^{-1} . **B)** Análisis de los cambios en el tamaño de las vesículas de CL en presencia de aSyn y sus variantes a diferente relación [aSyn]/[SUV]. Los valores Z se normalizaron por el valor presentado por la incubación de aSyn wt con CL. En todos los casos, los resultados están expresados como media \pm SEM. * indica diferencias estadísticas comparado con el valor Z-promedio normalizado de las vesículas en presencia de aSyn wt, con $P < 0,05$.

6.5- Análisis de la citotoxicidad de las variantes oxidadas de aSyn

Numerosas PTM se han relacionado con una ganancia de función tóxica por parte de aSyn, como por ejemplo la fosforilación de Ser₁₂₉. Dada la influencia del estrés oxidativo en las patologías neurodegenerativas, la formación de variantes oxidadas también se ha vinculado al desarrollo de las Sinucleopatías, no sólo afectando a las neuronas dopaminérgicas sino también a células de la glía. Particularmente, Reynolds y col. demostraron que variantes nitradas de aSyn son capaces de activar células microgliales, las cuales adoptan un fenotipo particular con secreción de factores pro-inflamatorios y aumento de la producción de especies reactivas [176]. En este contexto, para iniciar la caracterización biológica de las variantes oxidadas generadas por los métodos foto-inducibles, analizamos si estas poseen un efecto citotóxico en un modelo de células microgliales, empleando la línea BV-2 como modelo, al igual que en células neuronales, para lo cual recurrimos a la línea SH-SY5Y por sus características dopaminérgicas.

6.5.1- Tanto aSyn wt como sus variantes no muestran un efecto tóxico sobre células BV-2

Como primer paso, optimizamos la medida de viabilidad utilizando el reactivo WST-8, el cual es una sal soluble de tetrazolio, cuya reducción en presencia de células metabólicamente activas y un transportador de electrones (1-Metoxi PMS) genera una sal de formazan de color amarillo-naranja que puede ser cuantificada, sin la necesidad del agregado de DMSO, mediante la medida de absorción a 450 nm, mientras el cultivo aún es viable [271]. Así, se preparó una solución siguiendo las concentraciones recomendadas en la literatura (WST-8 5,0 mM, 1-Metoxi PMS 0,2 mM, NaCl 150 mM [197]) y se analizaron diferentes diluciones y densidades de sembrado inicial en microplaca de 96 pocillos (**Fig. 6-4A-B**). La dilución típica de la solución de reactivo empleada en la literatura es 1/10 [197], sin embargo las diluciones 1/20 y 1/50 también demostraron ser apropiadas para la medición de viabilidad luego de 24 hs de incubación del cultivo. Por otro lado, BV-2 es una línea de rápido crecimiento y proliferación en medio DMEM-F12 suplementado con SFB. Así, luego de 24 hs de incubación y, teniendo en cuenta que el análisis de las variantes de aSyn involucra tratamientos de 24 a 48 hs, el revelado con una dilución 1/20 de WST-8 mostró que las densidades de sembrado iniciales de entre 5000 y 10000 células eran las más apropiadas para nuestros ensayos. Asimismo, se determinó que la incubación y análisis durante un lapso de 2 a 3 hs con el reactivo WST-8 era lo más conveniente. A continuación, se evaluó el efecto de la reducción de SFB. Así, se verificó que la disminución del SFB a 1 % final no afectó la proliferación de las células BV-2 (**Fig. 6-4C**). Finalmente, analizamos la reducción de la viabilidad empleando concentraciones crecientes de LPS y H₂O₂, con la idea de emplearlos como controles positivos en los ensayos con aSyn y sus variantes oxidadas.

Así, comprobamos que tanto LPS como H_2O_2 son agentes citotóxicos y el efecto es dependiente de la concentración (Fig. 6-4D).

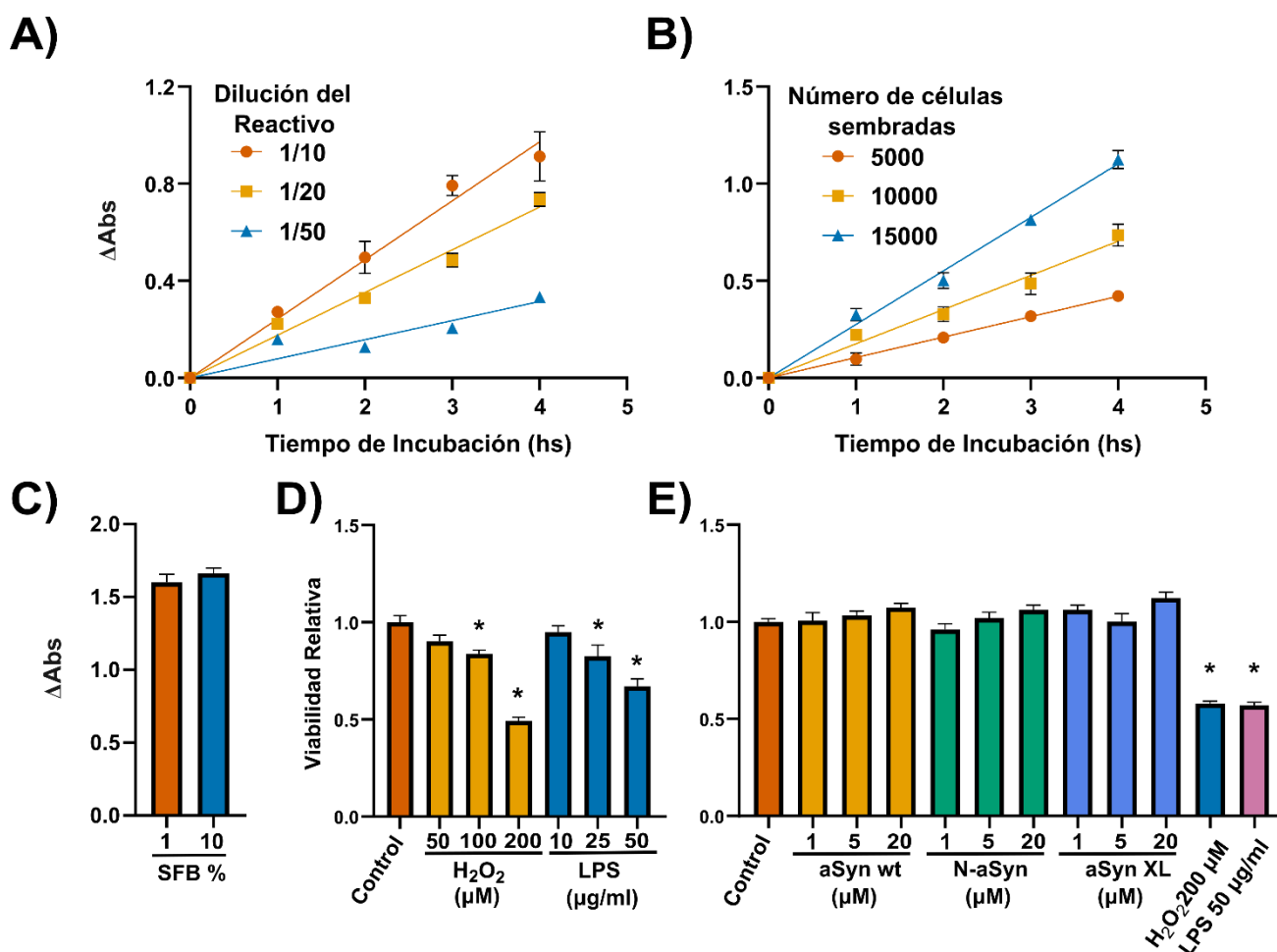


Figura 6-4. Optimización del ensayo de viabilidad con células BV-2 y medida de citotoxicidad de aSyn y variantes. **A)** Medida de absorbancia a 450 nm, expresada como diferencial ($\Delta = Abs_t - Abs_0$), de cultivo de células BV-2 (densidad de siembra inicial de 10000 células por pocillo en microplaca de 96 wells) luego de la incubación con diferentes diluciones del reactivo WST-8. **B)** Medida de absorbancia diferencial a 450 nm de cultivos de células BV-2 con diferente densidad de siembra, luego de la incubación con dilución 1/20 del reactivo WST-8. **C-D)** Análisis del efecto de la reducción del porcentaje de SFB y concentraciones crecientes de LPS y H_2O_2 sobre la viabilidad de células BV-2 (48 hs de tratamiento). **E)** Ensayo de viabilidad de BV-2 en presencia de proteína sin modificar (aSyn wt), nitrada (N-aSyn) y entrecruzada (aSyn XL), luego de 48 hs de tratamiento. Tanto en **E)** como en **D)** los resultados se expresan de forma relativa a la absorbancia del control (células sin tratar). En todos los casos, los resultados se expresan como la media \pm SEM (N = 5). * indica diferencias estadísticas comparado con el control (células sin tratar), con $P < 0.05$.

Luego de establecer las condiciones del ensayo y los controles positivos a utilizar, analizamos el efecto de aSyn wt y sus variantes oxidadas obtenidas a partir de los métodos foto-inducibles como potenciales agentes citotóxicos. De esta forma, se sembraron 4500 células en medio DMEM-F12 1 % SFB y se las trató con diferentes concentraciones de las proteínas (junto con una concentración fija de los controles positivos) por 48 hs. Finalmente, se incubó 2 hs con una solución 1/20 de WST-8 y se midió la absorbancia a 450 nm. Como se observa en la Fig. 6-4E, nuestros resultados no mostraron alteraciones en la viabilidad en las células tratadas tanto con aSyn wt como con sus variantes con respecto al control (células sin tratar), en el rango de concentraciones de proteínas

empleadas. Esto, en principio, no significa que aSyn y sus especies oxidadas no tengan efecto alguno sobre el modelo de células microgliales. En este contexto, existe evidencia de que aSyn wt y un amplio número de variantes (desde monómeros modificados hasta fibrillas) promueven la activación de un fenotipo pro-inflamatorio de la microglía [272], con lo que, con el fin de ampliar la caracterización de las especies oxidadas generadas, son necesarios ensayos complementarios, como el análisis de la producción de citoquinas pro-inflamatorias (como TNF α , IL-6 e IL-10) y de especies reactivas, entre otros ensayos.

6.5.2- N-aSyn posee un efecto tóxico similar a aSyn wt en células SH-SY5Y diferenciadas, no así aSyn-XL

De forma complementaria, también se realizó el mismo análisis empleando la línea SH-SY5Y sin diferenciar y concentraciones de 1,5 y 20 μ M de proteína. El análisis con WST-8 no mostró que las proteínas, tanto la forma nativa (aSyn wt) como las variantes oxidadas, redujera la viabilidad de las células SH-SY5Y, como sí lo hace el tratamiento con 200 μ M H₂O₂ (**Fig. 6-5A**). Por el contrario, existe un aparente aumento de la viabilidad a bajas concentraciones de proteínas, similar a lo observado por Borsarelli y col. con células diferenciadas [182]. Sin embargo, para todas las proteínas evaluadas se observa, al igual que para el H₂O₂, una reducción en el valor de viabilidad entre las menores y mayores concentraciones evaluadas (1 y 20 μ M, respectivamente). Anteriormente se empleó el reactivo WST-1 (una sal de tetrazolio de la familia de WST-8) para analizar la viabilidad de células SH-SY5Y en presencia de variantes entrecruzadas de aSyn [182]. Así, con el fin de evaluar posibles discrepancias entre el uso de WST-8 y WST-1, empleamos este último reactivo de manera equivalente a lo hecho con WST-8. Llamativamente, se observó una disminución significativa de la viabilidad para el tratamiento con N-aSyn 20 μ M incluso con relación al control sin agregado de proteínas, no así para el resto de las variantes (**Fig. 6-5B**). Sin embargo, al igual que lo obtenido con el WST-8, no se observaron diferencias entre las proteínas a igual concentración y se repitió el efecto de la concentración sobre la disminución de la viabilidad.

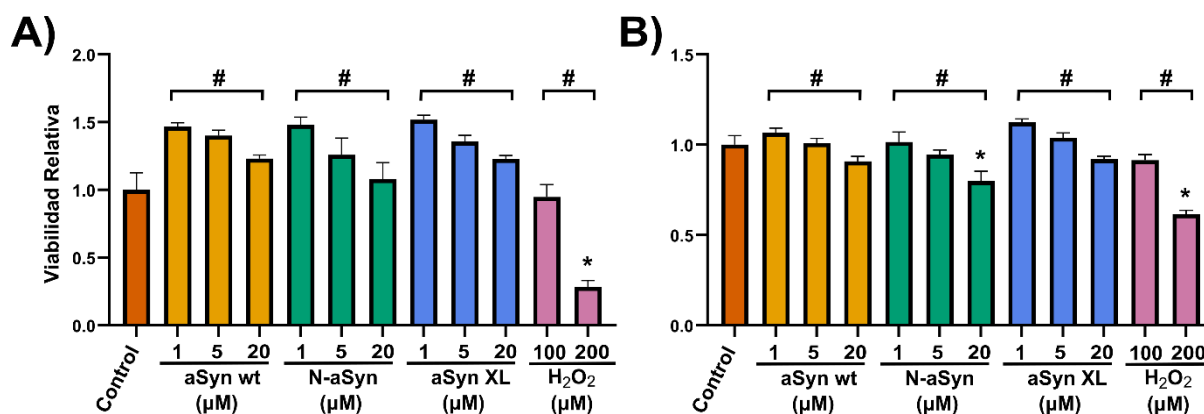


Figura 6-5. Ensayo de citotoxicidad de aSyn nativa y variantes sobre la línea SH-SY5Y. Ensayo de viabilidad en presencia de proteína sin modificar (aSyn wt), nitrada (N-aSyn) y entrecruzada (aSyn XL), luego de 48 hs de tratamiento, empleando H₂O₂ como control positivo, a partir de la medida de absorbancia de las sales de formazán generadas por la reducción de WST-8 (A) y WST-1 (B). Los resultados se expresan de forma relativa a la absorbancia del control (células sin tratar). En todos los casos, los resultados se expresan como la media \pm SEM (N = 5). * indica diferencias estadísticas comparado con el control (células sin tratar); mientras que # indica diferencias significativas entre las menores y mayores concentraciones evaluadas para cada tratamiento; $P < 0.05$.

Nuestros ensayos presentaron resultados dispersos, pero mostraron ciertas consistencias, tal como el efecto de la concentración, que podría sugerir que las proteínas analizadas podrían poseer un efecto perjudicial sobre el metabolismo celular. Si bien no se han reportado estudios en los que se haya medido la viabilidad relativa de cultivos microgliales incubados con aSyn o sus variantes, sí se ha visto una disminución en la viabilidad relativa de células SH-SY5Y, previamente diferenciadas a un fenotipo dopaminérgico, tratadas con aSyn entrecruzada [182]. Se ha descrito que las células SH-SY5Y diferenciadas son más susceptibles al tratamiento con 6-hidroxidopamina, presentando una respuesta menos robusta que su contraparte no diferenciada a alteraciones en la homeostasis energética y al aumento del estrés oxidativo [273]. De esta forma, procedimos a repetir estos ensayos empleando células SH-SY5Y diferenciadas a un fenotipo dopaminérgico. Para esto, cultivamos las células durante 9 días en medio DMEM-F12 2 % SFB suplementado con ácido trans retinoico (RA) 15 μ M, con renovación de medio cada 48 hs, en placas de 96 pocillos. Tal como se ve en la **Figura 6-6A** (panel 1), al momento de inicio del proceso de diferenciación, las células presentaban morfología principalmente poliédrica, similar a los neuroblastos, con cuerpos no polarizados con pocos o nulos procesos y formando agrupamientos. Al alcanzar el noveno día de tratamiento con RA, las células mostraron formas ahusadas, algunas con estructura piramidal, y con múltiples y largos procesos (**Figura 6-6A**, paneles 2 y 3).

Una vez diferenciadas, las células fueron tratadas con aSyn y sus variantes de forma análoga a lo hecho con las células sin diferenciar. Dado que no se observaron grandes diferencias entre las incubaciones con WST-8 y WST-1, empleamos sólo el primer reactivo para las medidas de viabilidad. Tanto la proteína sin modificar como su contraparte nitrada exhibieron un comportamiento tóxico dependiente de la concentración sobre las células diferenciadas en comparación con las células sin tratar (**Fig. 6-6B**). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre ambas especies al normalizar los datos obtenidos por los valores de absorbancia a 450 nm de las células tratadas con

aSyn (Fig. 6-6C). Por otro lado, las variantes entrecruzadas no mostraron ser tóxicas para las células diferenciadas. En relación a esto último, existen reportes de que especies de aSyn unidas covalentemente por puentes Tyr-Tyr generados por el sistema Citocromo C/H₂O₂ no son tóxicas en células PC12 [269]. Sin embargo, lo contrario se demostró para variantes generadas a partir de la excitación de Ru(bpy)₃⁺² sobre células SH-SY5Y diferenciadas [182]. En este contexto, se deberá profundizar en la caracterización para confirmar o refutar los datos aquí observados.

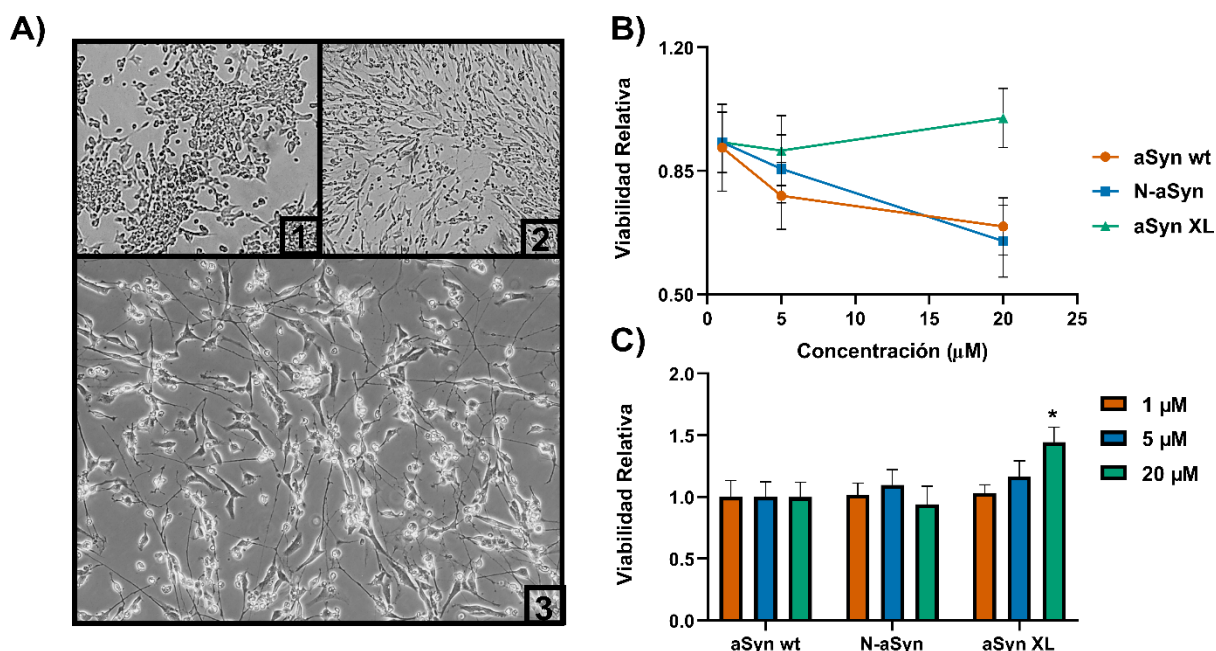


Figura 6-6. Diferenciación de SH-SY5Y y ensayo de evaluación de la toxicidad de aSyn y sus variantes oxidadas. **A)** Seguimiento del proceso de diferenciación desde el inicio del tratamiento con RA 15 μM (panel 1) hasta la finalización del mismo al cabo de 9 días (paneles 2 y 3). Medida de viabilidad en presencia de proteína sin modificar (aSyn wt), nitrada (N-aSyn) y entrecruzada (aSyn XL) luego de 48 hs de tratamiento. Los resultados se expresan de forma relativa a la absorbancia del control (células sin tratar) **(B)** y a la absorbancia de las muestras tratadas con aSyn wt a cada concentración **(C)**. En todos los casos, los resultados se expresan como la media ± SEM (N = 5). * indica diferencias estadísticas comparado con las células tratadas con aSyn wt con, $P < 0.05$.

6.6- Conclusión

A pesar de que existen estudios donde se verifica la toxicidad de fibrillas maduras de aSyn (ver Introducción 1.6.2), aún se desconoce si la formación de los LB es (o no) un intento de la célula de eliminar posibles intermediarios tóxicos. Teniendo en cuenta esto, las múltiples PTM que puede sufrir aSyn podrían ser total o parcialmente responsables de la ganancia de actividad tóxica. Así, en el presente capítulo iniciamos la caracterización de las especies generadas para mejorar el entendimiento del rol que estas especies podrían tener sobre la EP y el posible uso que podría dárseles en la clínica.

Basados en el análisis de las cinéticas de agregación, las formas oxidadas de aSyn inhiben la formación de especies ricas en la estructura *cross-β*, estabilizando intermediarios que podrían ser

potencialmente tóxicos, lo que apoyaría la teoría de que el proceso de agregación es un mecanismo de detoxificación. Por otro lado, se observó que las variantes generadas por los métodos foto-inducibles ejercen efectos diferentes sobre el tamaño de vesículas aniónicas, sugiriendo diferencias en la interacción proteína-lípido entre las distintas variantes. Para completar la caracterización de las variantes oxidadas de aSyn aún es necesario un análisis pormenorizado a nivel estructural para confirmar y complementar los resultados aquí mostrados.

Con el fin de modelar los efectos citotóxicos que las especies oxidadas podrían tener sobre células en cultivo, se emplearon dos líneas, BV-2 y SH-SY5Y como modelos de células microgliales y neuronales, respectivamente. Los ensayos de viabilidad celular empleando la línea BV-2 mostraron que los tratamientos con aSyn wt y sus variantes oxidadas no presentaron ningún efecto citotóxico significativo a nivel metabólico. Esto no significa necesariamente que aSyn y sus especies oxidadas no tengan efecto alguno sobre el modelo de células microgliales. De hecho, existe evidencia de que aSyn wt y un amplio número de variantes (desde monómeros modificados hasta fibrillas) promueven la activación de un fenotipo pro-inflamatorio de la microglía [176,272], por lo que es necesario ampliar el número de parámetros a evaluar con ensayos complementarios (generación de ROS/NOS, integridad de membrana plasmática, aptitud mitocondrial, activación de autofagocitosis, etc.) para caracterizar el efecto de las especies oxidadas generadas sobre células microgliales. En particular, resulta de interés analizar la producción de citoquinas pro-inflamatorias (como TNF α , IL-6 e IL-10) que se asocian a la promoción de una condición neuroinflamatoria que se cree podría solventar y propagar la patología de base gracias a las especies tóxicas liberadas por las neuronas afectadas en primer término.

Por otra parte, en relación al modelo de neuronas empleado, dado que no observamos resultados concluyentes en el tratamiento con las proteínas empleando células sin diferenciar, se procedió a diferenciarlas a un fenotipo dopaminérgico mediante la suplementación con ácido retinoico y la disminución de la concentración de suero [182]. Tanto aSyn wt como la especie nitrada mostraron un efecto tóxico sobre las células, no así las variantes entrecruzadas. Resulta evidente que para lograr una caracterización integral se debe profundizar en el estudio de los mecanismos de toxicidad que estas PTM pueden inducir, además de evaluar también otros parámetros en SH-SY5Y diferenciadas o sin diferenciar, al igual que en las células BV-2.

Conocer los mecanismos que desencadenan la muerte de las células dopaminérgicas y/o la neuroinflamación por parte de la microglía son pasos fundamentales para el futuro desarrollo de herramientas de tratamiento.

Capítulo 7

Conclusiones

7.1- Conclusiones generales

El estrés oxidativo es uno de los factores más importantes en relación al desarrollo de numerosas patologías. Es así que el modelado de las PTM oxidativas de proteínas es una herramienta decisiva para el diseño de métodos innovadores de diagnóstico, monitoreo y tratamiento de grupo amplio de enfermedades. En este contexto, el uso de métodos fotoquímicos basados en fotosensibilizadores constituye una herramienta viable, práctica y alternativa a los métodos clásicos para la modificación sistemática y eficiente de residuos aminoacídicos. Previamente, se había demostrado la factibilidad del sistema foto-inducible a base de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{+2}$ para generar variantes entrecruzadas de proteínas [200]. Sin embargo, hasta el día de hoy no se había explorado la posibilidad de modificarlo para promover la introducción de otras PTM, y en particular del grupo $-\text{NO}_2$ en la cadena lateral de aminoácidos aromáticos. Es así que caracterizamos y optimizamos ambos sistemas de oxidación ($\text{Ru}(\text{bpy})_3^{+2}/\text{APS}/\text{luz}$ y $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{+2}/\text{APS}/\text{NaNO}_2/\text{luz}$) empleando aminoácidos libres. De esta forma, nuestro estudio provee evidencia de que ambos sistemas son una estrategia rápida, eficiente y fácilmente ajustable a las necesidades de los sistemas de estudio para la modificación proteínas. En particular, la manipulación del pH y la concentración de NaNO_2 permiten maximizar la generación de la especie NitroTyr por sobre la variante entrecruzada (DiTyr).

La combinación del método de nitración con el monitoreo por métodos espectroscópicos y el posterior análisis y cuantificación por MS brinda una herramienta valiosa para evaluar la susceptibilidad de los residuos en proteínas a ser modificados, así como también dilucidar aspectos estructurales y funcionales. Tal es así que en el presente trabajo se demostró, con diferentes proteínas modelo, que el grado de modificación de cada residuo depende de varios factores como la topología estructural, la flexibilidad y la carga de residuos cercanos a los residuos blanco, así como también de la accesibilidad del fotosensibilizador y los radicales generados.

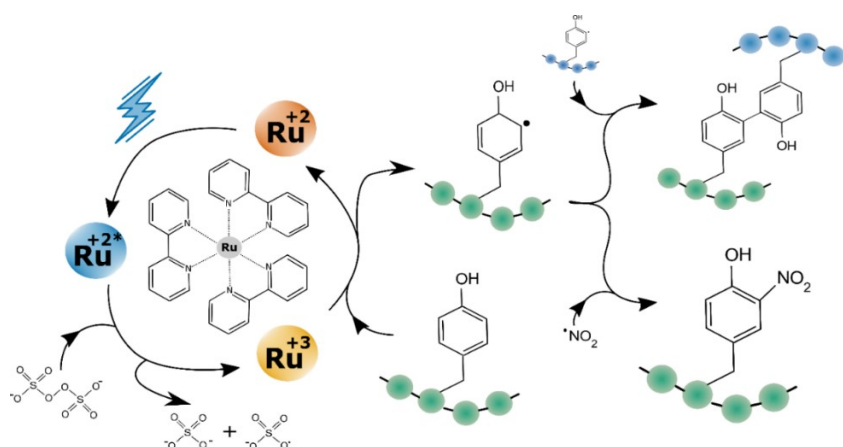


Figura 7-1. Sistemas de modificación foto-inducible basado en el uso de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{+2}$ aplicados en aSyn. Diagrama de las reacciones de la modificación de residuos de Tyr de aSyn basadas en los sistemas foto-inducibles $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{+2}/\text{APS}/\text{luz}$ y $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{+2}/\text{APS}/\text{NaNO}_2/\text{luz}$, para generar las variantes entrecruzadas y nitradas, respectivamente.

La proteína aSyn constituye un modelo ideal para la aplicación de los métodos foto-inducibles *in vitro* debido a que es fácilmente purificable, estable en un amplio rango de temperatura y pH, y a que en su secuencia posee sólo 4 residuos de Tyr y ninguno de Trp o Cys. Dado que es una proteína intrínsecamente desordenada, en solución es susceptible a la modificación específica por los métodos descritos en este trabajo (**Fig. 7-1**). Así, es posible controlar fácilmente la generación de los entrecruzamientos y la nitración mediante el empleo de métodos espectroscópicos, y posteriormente caracterizar estas modificaciones a través un análisis cualitativo y cuantitativo de MS. De esta forma, se logró estudiar en profundidad las modificaciones generadas y, finalmente, determinar que Y₃₉ es decisiva para la formación de entrecruzamientos, así como también que todos los residuos de Tyr son susceptibles a la nitración. Estos resultados son similares a los reportados con otros sistemas de oxidación como Hemoglobina/H₂O₂, Cu⁺¹/O₂, y Cu⁺²/H₂O₂ para la formación de entrecruzamientos [164,199,255], y con peroxinitrito y tetranitrometano para su nitración [170,173]. Sin embargo, estos sistemas carecen de la especificidad, eficiencia y celeridad que caracteriza a la metodología aquí descrita basada en el sistema fotoquímico de Ru(bpy)₃⁺².

Dado que aSyn adopta diferentes conformaciones, las herramientas empleadas para el estudio de la proteína libre en solución son particularmente útiles para evaluar la susceptibilidad de residuos de Tyr a ser modificados cuando esta proteína adopta las conformaciones de hélice y *cross-β*. De esta forma, determinamos que la formación de entrecruzamientos se ve restringida en ambas conformaciones, principalmente debido al compromiso de Y₃₉ en dichas estructuras, lo que bloquea o restringe su acceso. Por su parte, de forma similar a lo observado para los entrecruzamientos, la eficiencia de nitración de Y₃₉ es la más afectada cuando aSyn adopta una estructura secundaria bien definida (**Fig. 7-2**). En este contexto, cabe recordar que se ha descrito por diversas técnicas que el extremo C-terminal de aSyn permanece desordenado y más expuesto al solvente en ambas conformaciones [58,65]; y, por lo tanto, sería potencialmente más susceptible a ser modificado. Así, resulta plausible que la modificación de Y₃₉ podría ser decisiva en la alteración funcional y estructural de aSyn.

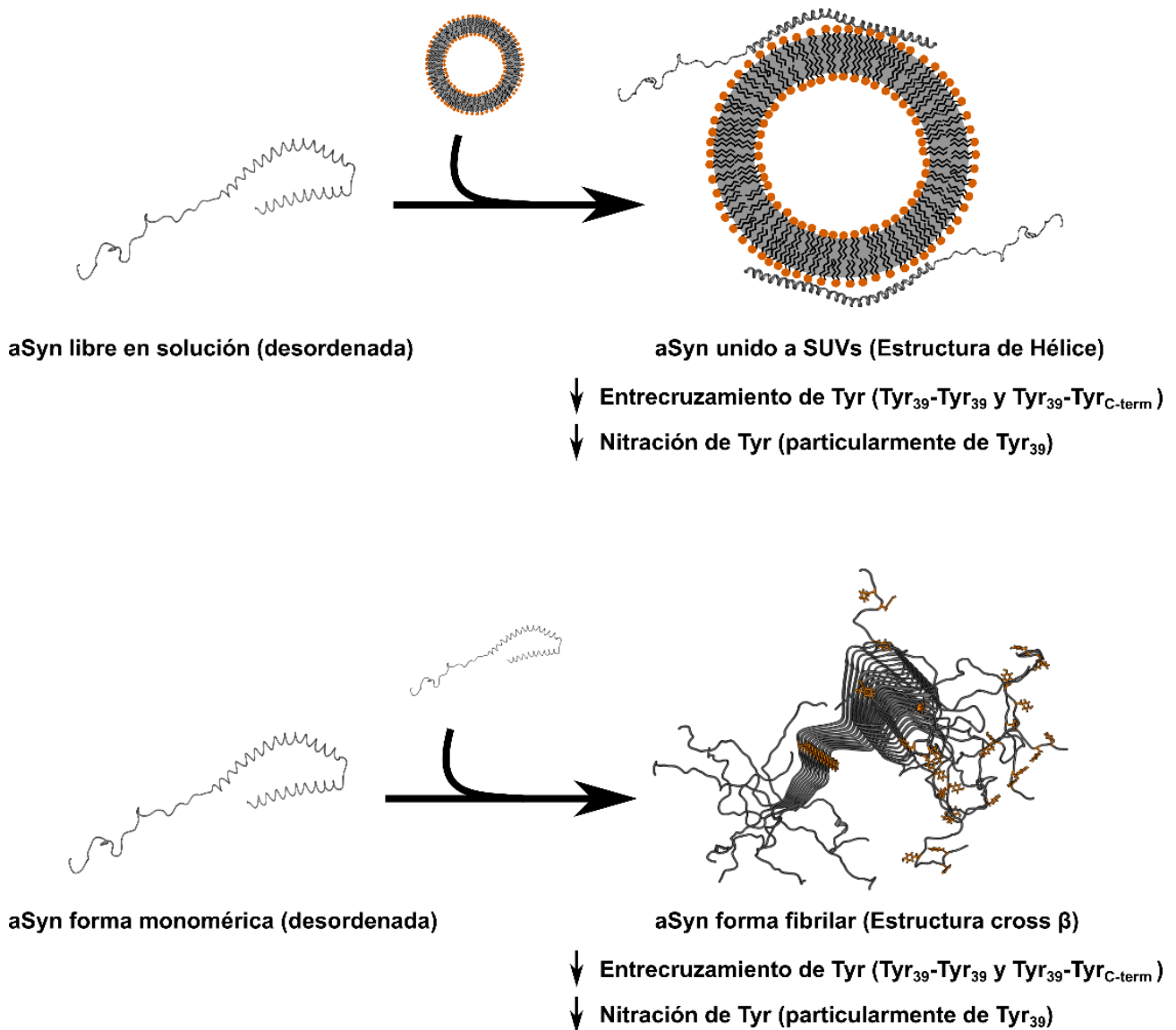


Figura 7-2. Modificación de aSyn cuando adopta diferentes conformaciones. Esquema que resume el efecto de las conformaciones de hélice (modificado de PDB 1XQ8) y *cross- β* (PDB 2N0A) sobre la susceptibilidad de los residuos de Tyr a ser modificados. A fines prácticos, y en ausencia de una estructura resuelta de la forma monomérica en solución, se empleó la estructura PDB 1XQ8 (conformación de aSyn en presencia de micelas de SDS) como esquema para la forma de monómero libre.

Por otro lado, el efecto de las modificaciones oxidativas sobre el proceso de agregación fue anteriormente abordado por varios grupos empleando diferentes modelos de oxidación (ver Introducción 1.6.3). En relación a nuestro trabajo, las formas oxidadas de aSyn evitan la formación de especies ricas en estructura *cross- β* detectables por la sonda TioT. Dado que la formación de fibrillas maduras podría ser un mecanismo de neutralización de especies tóxicas por parte de las células afectadas [182], la incorporación de las PTM derivadas del estrés oxidativo podría favorecer la estabilización de intermediarios de agregación oligoméricos (hoy supuestos como los verdaderos responsables de la actividad citotóxica de aSyn) y así evitar su incorporación en estructuras amiloides fibrilares. También se abordó el efecto de las proteínas modificadas sobre el tamaño de vesículas

aniónicas, como una aproximación y exploración inicial sobre la función de interacción aSyn con lípidos. Así, se observó que la incubación de las variantes con las vesículas llevó a cambios de tamaño diferentes a los exhibidos por la proteína sin modificar, promoviendo en un caso la agregación de estas y una menor afinidad de unión en el otro.

En relación al potencial efecto citotóxico sobre los modelos de células neurales en cultivo empleados, las proteínas no mostraron ser tóxicas para células microgliales. Sin embargo, existe amplia evidencia de que tanto aSyn como sus variantes modificadas o agregadas podrían ser responsables de una activación pro-inflamatoria de células de la microglía, promoviendo así el desarrollo de procesos neuroinflamatorios [272]. Por otro lado, los resultados obtenidos con la línea SH-SY5Y diferenciadas sugieren que la variante nitrada podría tener un efecto perjudicial sobre las células, pero que este no sería, en principio, significativamente diferente al exhibido por la proteína sin modificar. *In vivo*, la diferente actividad tóxica sería originada por la disponibilidad diferencial de ambas especies, por ejemplo, al verse afectada su capacidad de interacción con membranas. Las variantes entrecruzadas no mostraron ejercer un efecto tóxico, de forma contraria a lo anteriormente reportado [182]. En este contexto, consideramos que es necesario profundizar la caracterización de las variantes oxidadas de aSyn, con el fin de comprender su rol en el origen y la diseminación de los procesos citotóxicos que llevan a la aparición y progresión de la EP, enfocándose en parte también en mecanismos alternativos de citotoxicidad más allá de un desarreglo metabólico, que fue el parámetro evaluado en estos estudios.

En conclusión, dado que 1) la característica mejor descrita de aSyn es su habilidad de unirse a membranas fosfolipídicas [56,58] que 2) su rol *in vivo* estaría relacionado principalmente con la regulación sináptica mediante la unión a vesículas [71] y que 3) la formación de los agregados amiloides podría actuar como un mecanismo de detoxificación de intermediarios nocivos [182]; nuestros resultados sugieren que algunas modificaciones oxidativas, como la nitración de Y₃₉ o el entrecruzamiento Y₃₉-Y_{133/136}, podrían ser fundamentales para la ganancia de función tóxica de aSyn. De correlacionarse efectivamente estas modificaciones con aspectos patológicos de la EP, tales como la alteración de la interacción con membrana y de la formación de agregados inertes, así como la muerte de neuronas dopaminérgicas [182] y la activación de la microglía [272], justificaría su estudio como potenciales biomarcadores de Sinucleopatías.

La determinación de aSyn como biomarcador en fluidos corporales, incluido en líquido cefalorraquídeo, no ha demostrado hasta el momento ser un parámetro lo suficientemente específico y sensible por sí sólo como para tener utilidad en el diagnóstico o monitoreo de las Sinucleopatías. Esto, en parte, se debe a que la expresión de aSyn es muy amplia y elevada, particularmente en glóbulos rojos; por lo que su origen no es directamente atribuible al daño de un tejido o tipo celular en particular. Nuestros resultados y los de otros autores sugieren que las PTM de aSyn podrían participar en varias etapas de la EP y de los mecanismos moleculares que promueven su

propagación, mantenimiento y progreso en el tiempo. De este modo, la identificación específica de PTM en aSyn asociadas al proceso neurodegenerativo en muestras complejas podría aportar la especificidad necesaria como para ser empleadas en el desarrollo de herramientas de diagnóstico temprano, monitoreo y/o para evaluar la eficiencia de tratamientos para combatir las Sinucleopatías. Los desafíos a futuro de este proyecto apuntan también en este sentido, a fin de poder capitalizar los avances que logramos en el entendimiento de los fenómenos moleculares que llevan a la ganancia de función tóxica de aSyn. Así, es fundamental el desarrollo de herramientas específicas que puedan detectar y distinguir las diferentes especies de aSyn, modificadas o sin modificar, agregados tóxicos o inertes, y de esta forma poder aportar certeza al diagnóstico de las enfermedades neurodegenerativas.

Finalmente, es importante tener en cuenta que las Sinucleopatías son un conjunto de enfermedades complejas, generalmente atribuidas a desórdenes neurológicos del SNC. Sin embargo, en las últimas décadas ha crecido la tendencia a analizar factores y síntomas de otros tejidos u órganos, como los gastrointestinales. A tal punto que también se ha sugerido que, en algunos casos, el origen de la patología podría ser epitelial, y que migraría hacia el SNC a través del sistema nervioso periférico empleando un mecanismo con ciertas características comunes a las enfermedades priónicas. En este contexto, algunos síntomas tempranos de las Sinucleopatías pasarían desapercibidos por su inespecificidad, tales como la constipación o alteraciones del sueño, para los cuales se ha planteado que podrían surgir más de 10 años antes de la aparición de los síntomas motores clásicos. En este contexto, un ensayo bioquímico podría permitir detectarlos de forma eficiente y tomar medidas para prevenir el avance de la enfermedad. Es en este sentido que se prevé avanzar en la puesta a punto de métodos para la detección y cuantificación de las PTM de aSyn en muestras complejas junto con el desarrollo de anticuerpos monoclonales que ayuden en su enriquecimiento y/o detección.

Bibliografía

- [1] E.R. Dorsey, R. Constantinescu, J.P. Thompson, K.M. Biglan, R.G. Holloway, K. Kiebertz, F.J. Marshall, B.M. Ravina, G. Schifitto, A. Siderowf, C.M. Tanner, Projected number of people with PD in the most populous nations, 2005 through 2030, *Neurology*. 68 (2007) 384–386. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000247740.47667.03>.
- [2] T. Pringsheim, N. Jette, A. Frolkis, T.D.L. Steeves, The prevalence of Parkinson's disease: A systematic review and meta-analysis, *Mov. Disord.* 29 (2014) 1583–1590. <https://doi.org/10.1002/mds.25945>.
- [3] L.M.L. de Lau, M.M.B. Breteler, Epidemiology of Parkinson's disease, *Lancet Neurol.* 5 (2006) 525–535. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(06\)70471-9](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(06)70471-9).
- [4] B.S. Connolly, A.E. Lang, Pharmacological treatment of Parkinson disease: A review, *JAMA - J. Am. Med. Assoc.* 311 (2014) 1670–1683. <https://doi.org/10.1001/jama.2014.3654>.
- [5] M.T. Hayes, Parkinson's Disease and Parkinsonism, *Am. J. Med.* 132 (2019) 802–807. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2019.03.001>.
- [6] L. V. Kalia, A.E. Lang, Parkinson's disease, *Lancet*. 386 (2015) 896–912. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61393-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61393-3).
- [7] H. Braak, K. Del Tredici, U. Rüb, R.A.I. De Vos, E.N.H. Jansen Steur, E. Braak, Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease, *Neurobiol. Aging*. 24 (2003) 197–211. [https://doi.org/10.1016/S0197-4580\(02\)00065-9](https://doi.org/10.1016/S0197-4580(02)00065-9).
- [8] C.H. Hawkes, K. Del Tredici, H. Braak, Parkinson's disease: A dual-hit hypothesis, *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 33 (2007) 599–614. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.2007.00874.x>.
- [9] I.C. Brás, M. Xylaki, T.F. Outeiro, Mechanisms of alpha-synuclein toxicity: An update and outlook, *Prog. Brain Res.* 252 (2020) 91–129. <https://doi.org/10.1016/bs.pbr.2019.10.005>.
- [10] C.M. Tanner, F. Kame, G.W. Ross, J.A. Hoppin, S.M. Goldman, M. Korell, C. Marras, G.S. Bhudhikanok, M. Kasten, A.R. Chade, K. Comyns, M.B. Richards, C. Meng, B. Priestley, H.H. Fernandez, F. Cambi, D.M. Umbach, A. Blair, D.P. Sandler, J.W. Langston, Rotenone, paraquat, and Parkinson's disease, *Environ. Health Perspect.* 119 (2011) 866–872. <https://doi.org/10.1289/ehp.1002839>.
- [11] J.W. Langston, The MPTP story, *J. Parkinsons. Dis.* 7 (2017) S11–S19. <https://doi.org/10.3233/JPD-179006>.
- [12] A.J. Noyce, J.P. Bestwick, L. Silveira-Moriyama, C.H. Hawkes, G. Giovannoni, A.J. Lees, A. Schrag, Meta-analysis of early nonmotor features and risk factors for Parkinson disease, *Ann. Neurol.* 72 (2012) 893–901. <https://doi.org/10.1002/ana.23687>.
- [13] A. Ascherio, M.A. Schwarzschild, The epidemiology of Parkinson's disease: risk factors and prevention, *Lancet Neurol.* 15 (2016) 1257–1272. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(16\)30230-7](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(16)30230-7).
- [14] S. Cipriani, X. Chen, M.A. Schwarzschild, Urate: A novel biomarker of Parkinson's disease risk, diagnosis and prognosis, *Biomark. Med.* 4 (2010) 701–712. <https://doi.org/10.2217/bmm.10.94>.
- [15] M.H. Polymeropoulos, C. Lavedan, E. Leroy, S.E. Ide, A. Dehejia, A. Dutra, B. Pike, H. Root, J. Rubenstein, R. Boyer, E.S. Stenroos, S. Chandrasekharappa, A. Athanassiadou, T. Papapetropoulos, W.G. Johnson, A.M. Lazzarini, R.C. Duvoisin, G. Di Iorio, L.I. Golbe, R.L. Nussbaum, Mutation in the α -Synuclein Gene Identified in Families with Parkinson's Disease Mutation in the, *Science* (80-.). 276 (1997) 2045–2047. <https://doi.org/10.1126/science.276.5321.2045> ARTICLE.
- [16] M.A. Nalls, N. Pankratz, C.M. Lill, C.B. Do, D.G. Hernandez, M. Saad, A.L. Destefano, E. Kara, J. Bras, M. Sharma, C. Schulte, M.F. Keller, S. Arepalli, C. Letson, C. Edsall, H. Stefansson, X. Liu, H. Pliner, J.H. Lee, R. Cheng, M.A. Ikram, J.P.A. Ioannidis, G.M. Hadjigeorgiou, J.C. Bis, M. Martinez, J.S. Perlmutter, A. Goate, K. Marder, B. Fiske, M. Sutherland, G. Xiromerisiou, R.H. Myers, L.N. Clark, K. Stefansson, J.A. Hardy, P. Heutink, H. Chen, N.W. Wood, H. Houlden, H. Payami, A. Brice, W.K. Scott, T. Gasser, L. Bertram, N. Eriksson, T. Foroud, A.B. Singleton, V. Plagnol, U.M. Sheerin, J. Simón-Sánchez, S. Lesage, S. Sveinbjörnsdóttir, R. Barker, Y. Ben-Shlomo, H.W. Berendse, D. Berg, K. Bhatia, R.M.A. de Bie, A. Biffi, B. Bloem, Z. Bochdanovits, M. Bonin, J.M. Bras, K. Brockmann, J. Brooks, D.J. Burn, G. Charlesworth, P.F. Chinnery, S. Chong, C.E. Clarke, M.R. Cookson, J.M. Cooper, J.C. Corvol, C. Counsell, P. Damier, J.F. Dartigues, P. Deloukas, G. Deuschl, D.T. Dexter, K.D. van Dijk, A. Dillman, F. Durif, A. Dürr, S. Ekins, J.R. Evans, T. Foltynie, J. Dong, M. Gardner, J.R. Gibbs, E. Gray, R. Guerreiro, C. Harris, J.J. van Hilten, A. Hofman, A. Hollenbeck, J. Holton, M. Hu, X. Huang, I. Wurster, W. Mätzler, G. Hudson, S.E. Hunt, J. Huttenlocher, T. Illig, P. V. Jónsson, J.C. Lambert, C. Langford, A. Lees, P. Lichtner, P. Limousin, G. Lopez, D. Lorenz, A. McNeill, C. Moorby, M. Moore, H.R. Morris, K.E. Morrison, E. Mudanohwo, S.S. O'sullivan, J. Pearson, H. Pétursson, P. Pollak, B. Post, S. Potter, B. Ravina, T. Revesz, O. Riess, F. Rivadeneira, P. Rizzu, M. Ryten, S. Sawcer, A. Schapira, H. Scheffer, K. Shaw, I. Shoulson, E. Sidransky, C. Smith, C.C.A. Spencer, H. Stefánsson, F. Bettella, J.D. Stockton, A. Strange, K. Talbot, C.M. Tanner, A. Tashakkori-Ghanbaria, F. Tison, D. Trabzuni, B.J. Traynor, A.G. Uitterlinden, D. Velseboer, M. Vidailhet, R. Walker, B. van de Warrenburg, M. Wickremaratchi, N. Williams, C.H. Williams-Gray, S. Winder-Rhodes, K. Stefánsson, J. Hardy, S. Factor, D. Higgins, S. Evans, H. Shill, M. Stacy, J. Danielson, L. Marlor, K. Williamson, J. Jankovic, C. Hunter, D. Simon, P. Ryan, L. Scollins, R. Saunders-Pullman, K. Boyar, C. Costan-Toth, E. Ohmann, L. Sudarsky, C. Joubert, J. Friedman, K. Chou, H. Fernandez, M. Lannon, N. Galvez-Jimenez, A. Podichetty, K. Thompson, P. Lewitt, M. Deangelis, C. O'brien, L. Seeberger, C. Dingmann, D. Judd, K. Marder, J. Fraser, J. Harris, J. Bertoni, C. Peterson, M. Rezak, G. Medalle, S. Chouinard, M. Panisset, J. Hall, H. Poiffaut, V. Calabrese, P. Roberge, J. Wojcieszek, J. Belden, D. Jennings, K. Marek, S. Mendick, S. Reich, B. Dunlop, M. Jog, C. Horn, R. Uitti, M. Turk,

- T. Ajax, J. Manner, K. Sethi, J. Carpenter, B. Dill, L. Hatch, K. Ligon, S. Narayan, K. Blindauer, K. Abou-Samra, J. Petit, L. Elmer, E. Aiken, K. Davis, C. Schell, S. Wilson, M. Velickovic, W. Koller, S. Phipps, A. Feigin, M. Gordon, J. Hamann, E. Licari, M. Marotta-Kollarus, B. Shannon, R. Winnick, T. Simuni, A. Videnovic, A. Kaczmarek, K. Williams, M. Wolff, J. Rao, M. Cook, M. Fernandez, S. Kostyk, J. Hubble, A. Campbell, C. Reider, A. Seward, R. Camicioli, J. Carter, J. Nutt, P. Andrews, S. Morehouse, C. Stone, T. Mendis, D. Grimes, C. Alcorn-Costa, P. Gray, K. Haas, J. Vendette, J. Sutton, B. Hutchinson, J. Young, A. Rajput, L. Klassen, T. Shirley, B. Manyam, P. Simpson, J. Whetteckey, B. Wulbrecht, D. Truong, M. Pathak, K. Frei, N. Luong, T. Tra, A. Tran, J. Vo, A. Lang, G. Kleiner-Fisman, A. Nieves, L. Johnston, J. So, G. Podskalny, L. Giffin, P. Atchison, C. Allen, W. Martin, M. Wieler, O. Suchowersky, S. Furtado, M. Klimek, N. Hermanowicz, S. Niswonger, C. Shults, D. Fontaine, M. Aminoff, C. Christine, M. Diminno, J. Hevezi, A. Dalvi, U. Kang, J. Richman, S. Uy, A. Sahay, M. Gartner, D. Schwieterman, D. Hall, M. Leehey, S. Culver, T. Derian, T. Demarcaida, S. Thurlow, R. Rodnitzky, J. Dobson, K. Lyons, R. Pahwa, T. Gales, S. Thomas, L. Shulman, W. Weiner, K. Dustin, C. Singer, L. Zelaya, P. Tuite, V. Hagen, S. Rolandelli, R. Schacherer, J. Kosowicz, P. Gordon, J. Werner, C. Serrano, S. Roque, R. Kurlan, D. Berry, I. Gardiner, R. Hauser, J. Sanchez-Ramos, T. Zesiewicz, H. Delgado, K. Price, P. Rodriguez, S. Wolfrath, R. Pfeiffer, L. Davis, B. Pfeiffer, R. Dewey, B. Hayward, A. Johnson, M. Meacham, B. Estes, F. Walker, V. Hunt, C. O'Neill, B. Racette, L. Swisher, C. Dijamco, E.D. Conley, E. Dorfman, J.Y. Tung, D.A. Hinds, J.L. Mountain, A. Wojcicki, M. Lew, C. Klein, L. Golbe, J. Growdon, G.F. Wooten, R. Watts, M. Guttman, S. Goldwurm, M.H. Saint-Hilaire, K. Baker, I. Litvan, G. Nicholson, M. Nance, E. Drasby, S. Isaacson, D. Burn, P. Pramstaller, J. Al-Hinti, A. Moller, S. Sherman, R. Roxburgh, J. Slevin, J. Perlmutter, M.H. Mark, N. Huggins, G. Pezzoli, T. Massood, I. Itin, A. Corbett, P. Chinnery, K. Ostergaard, B. Snow, F. Cambi, D. Kay, A. Samii, P. Agarwal, J.W. Roberts, D.S. Higgins, E. Molho, A. Rosen, J. Montimurro, E. Martinez, A. Griffith, V. Kusel, D. Yearout, S. Factor, C. Zabetian, L.N. Clark, X. Liu, J.H. Lee, R. Cheng Taub, E.D. Louis, L.J. Cote, C. Waters, B. Ford, S. Fahn, J.M. Vance, G.W. Beecham, E.R. Martin, K. Nuytemans, M.A. Pericak-Vance, J.L. Haines, A. Destefano, S. Seshadri, S.H. Choi, S. Frank, J.C. Bis, B.M. Psaty, K. Rice, W.T. Longstreth, T.G.N. Ton, S. Jain, C.M. van Duijn, A.G. Uitterlinden, V.J. Verlinden, P.J. Koudstaal, A. Singleton, M. Cookson, J.R. Gibbs, D. Hernandez, M. Nalls, A. Zonderman, L. Ferrucci, R. Johnson, D. Longo, R. O'Brien, B. Traynor, J. Troncoso, M. van der Brug, R. Zielke, M. Weale, A. Ramasamy, E. Dardiotis, V. Tsimourto, C. Spanaki, A. Plaitakis, M. Bozi, L. Stefanis, D. Vassilatis, G. Koutsis, M. Panas, G.M. Hadjigeorgiou, K. Lunnon, M. Lupton, J. Powell, L. Parkkinen, O. Ansorge, Large-scale meta-analysis of genome-wide association data identifies six new risk loci for Parkinson's disease, *Nat. Genet.* 46 (2014) 989–993. <https://doi.org/10.1038/ng.3043>.
- [17] E. Sidransky, G. Lopez, The link between the GBA gene and parkinsonism Ellen, *Lancet Neurol.* 11 (2012) 986–998. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(12\)70190-4](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(12)70190-4).
- [18] M.G. Spillantini, M.L. Schmidt, V.M.Y. Lee, J.Q. Trojanowski, R. Jakes, M. Goedert, a -Synuclein in Lewy bodies, *Nature.* 388 (1997) 839–840. <https://doi.org/10.1038/42166>.
- [19] M. Goedert, R. Jakes, M.G. Spillantini, The Synucleinopathies: Twenty Years on, *J. Parkinsons. Dis.* 7 (2017) S53–S71. <https://doi.org/10.3233/JPD-179005>.
- [20] T.F. Outeiro, D.J. Koss, D. Erskine, L. Walker, M. Kurzawa-Akanbi, D. Burn, P. Donaghy, C. Morris, J.P. Taylor, A. Thomas, J. Attems, I. McKeith, Dementia with Lewy bodies: An update and outlook, *Mol. Neurodegener.* 14 (2019) 1–18. <https://doi.org/10.1186/s13024-019-0306-8>.
- [21] F. Krismer, G.K. Wenning, Multiple system atrophy: Insights into a rare and debilitating movement disorder, *Nat. Rev. Neurol.* 13 (2017) 232–243. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2017.26>.
- [22] H. Sies, Oxidative stress: A concept in redox biology and medicine, *Redox Biol.* 4 (2015) 180–183. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.01.002>.
- [23] M. Valko, D. Leibfritz, J. Moncol, M.T.D. Cronin, M. Mazur, J. Telser, Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39 (2007) 44–84. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.07.001>.
- [24] B.G. Trist, D.J. Hare, K.L. Double, Oxidative stress in the aging substantia nigra and the etiology of Parkinson's disease, *Aging Cell.* 18 (2019). <https://doi.org/10.1111/accel.13031>.
- [25] M.P. Pruchniak, M. Arazna, U. Demkow, Biochemistry of Oxidative Stress, *Adv Exp Med Biol.* 878 (2016) 9–19. <https://doi.org/10.1002/anie.198610581>.
- [26] R. Radi, Oxygen radicals, nitric oxide, and peroxynitrite: Redox pathways in molecular medicine, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 115 (2018) 5839–5848. <https://doi.org/10.1073/pnas.1804932115>.
- [27] G. Ferrer-Sueta, N. Campolo, M. Trujillo, S. Bartsaghi, S. Carballal, N. Romero, B. Alvarez, R. Radi, Biochemistry of Peroxynitrite and Protein Tyrosine Nitration, *Chem. Rev.* 118 (2018) 1338–1408. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00568>.
- [28] J. Blesa, I. Trigo-Damas, A. Quiroga-Varela, V.R. Jackson-Lewis, Oxidative stress and Parkinson's disease, *Front. Neuroanat.* 9 (2015) 1–9. <https://doi.org/10.3389/fnana.2015.00091>.
- [29] A. Bose, M.F. Beal, Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease, *J. Neurochem.* (2016) 216–231. <https://doi.org/10.1111/jnc.13731>.
- [30] A.M. Pickrell, R.J. Youle, The Roles of PINK1, Parkin and Mitochondrial Fidelity in Parkinson's Disease, *Neuron.* 85 (2015) 257–273. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.12.007>.
- [31] D.S. Goldstein, P. Sullivan, C. Holmes, G.W. Miller, S. Alter, R. Strong, D.C. Mash, I.J. Kopin, Y. Sharabi, Determinants of buildup of the toxic dopamine metabolite DOPAL in Parkinson's disease, *J. Neurochem.* 126 (2013) 591–603. <https://doi.org/10.1111/jnc.12345>.
- [32] J. Meiser, D. Weindl, K. Hiller, Complexity of dopamine metabolism, *Cell Commun. Signal.* 11 (2013) 1–18. <https://doi.org/10.1186/1478-811X-11-34>.
- [33] M. Kunadt, K. Eckermann, A. Stuenkel, J. Gong, B. Russo, K. Strauss, S. Rai, S. Kugler, L. Falomir-Lockhart, M.

- Schwalbe, P. Krumova, L.M.A. Oliveira, M. Bahr, W. Mobius, J. Levin, A. Giese, N. Kruse, B. Mollenhauer, R. Geiss-Friedlander, A.C. Ludolph, A. Freischmidt, M.S. Feiler, K.M. Danzer, M. Zweckstetter, T.M. Jovin, M. Simons, J.H. Weishaupt, A. Schneider, Extracellular vesicle sorting of α -Synuclein is regulated by sumoylation, *Acta Neuropathol.* 129 (2015) 695–713.
- [34] C. Hansen, E. Angot, A.L. Bergstrom, J.A. Steiner, L. Pieri, G. Paul, T.F. Outerio, R. Melki, P. Kallunki, K. Fog, J.Y. Li, P. Brundin, α -Synuclein propagates from mouse brain to grafted dopaminergic neurons and seeds aggregation in cultured human cells, *J. Clin. Invest.* 121 (2011) 715–725. <https://doi.org/10.1172/JCI43366>.
- [35] P.L. McGeer, E.G. McGeer, Glial reactions in Parkinson's disease, *Mov. Disord.* 23 (2008) 474–483. <https://doi.org/10.1002/mds.21751>.
- [36] K.J. Doorn, A. Goudriaan, C. Blits-Huizinga, J.G.J.M. Bol, A.J. Rozemuller, P.V.J.M. Hoogland, P.J. Lucassen, B. Drukarch, W.D.J. Van De Berg, A.M. Van Dam, Increased amoeboid microglial density in the Olfactory Bulb of Parkinson's and Alzheimer's Patients, *Brain Pathol.* 24 (2014) 152–165. <https://doi.org/10.1111/bpa.12088>.
- [37] K.J. Doorn, T. Moors, B. Drukarch, W.D.J. van de Berg, P.J. Lucassen, A.M. van Dam, Microglial phenotypes and toll-like receptor 2 in the substantia nigra and hippocampus of incidental Lewy body disease cases and Parkinson's disease patients, *Acta Neuropathol.* 2 (2014).
- [38] A. Pisanu, D. Lecca, G. Mulas, J. Wardas, G. Simbula, S. Spiga, A.R. Carta, Dynamic changes in pro- and anti-inflammatory cytokines in microglia after PPAR- γ agonist neuroprotective treatment in the MPTP mouse model of progressive Parkinson's disease, *Neurobiol. Dis.* 71 (2014) 280–291.
- [39] M.J. Surace, M.L. Block, Targeting microglia-mediated neurotoxicity the potential of NOX2 inhibitors, *Cell. Mol. Life Sci.* 69 (2012) 2409–2427.
- [40] L. Maroteaux, J.T. Campanelli, R.H. Scheller, Synuclein: A neuron-specific protein localized to the nucleus and presynaptic nerve terminal, *J. Neurosci.* 8 (1988) 2804–2815. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.08-08-02804.1988>.
- [41] L. Maroteaux, R.H. Scheller, The rat brain synucleins; family of proteins transiently associated with neuronal membrane, *Mol. Brain Res.* 11 (1991) 335–343. [https://doi.org/10.1016/0169-328X\(91\)90043-W](https://doi.org/10.1016/0169-328X(91)90043-W).
- [42] R. Jakes, M.G. Spillantini, M. Goedert, Identification of two distinct synucleins from human brain, *FEBS Lett.* 345 (1994) 27–32. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(94\)00395-5](https://doi.org/10.1016/0014-5793(94)00395-5).
- [43] H. Ji, Y.E. Liu, T. Jia, M. Wang, J. Liu, G. Xiao, B.K. Joseph, C. Rosen, Y.E. Shi, Identification of a breast cancer-specific gene, BCSG1, by direct differential cDNA sequencing, *Cancer Res.* 57 (1997) 759–764.
- [44] M.G. Spillantini, R.A. Crowther, R. Jakes, M. Hasegawa, M. Goedert, Assignment of Human α -Synuclein (SNCA) and β -Synuclein (SNCB) Genes to Chromosomes 4q21 and 5q35, *Genomics.* 27 (1995) 379–381.
- [45] C. Lavedan, E. Leroy, A. Dehejia, S. Buchholtz, A. Dutra, R.L. Nussbaum, M.H. Polymeropoulos, Identification, localization and characterization of the human γ -synuclein gene, *Hum. Genet.* 103 (1998) 106–112. <https://doi.org/10.1007/s004390050792>.
- [46] K. Beyer, α -Synuclein structure, posttranslational modification and alternative splicing as aggregation enhancers, *Acta Neuropathol.* 112 (2006) 237–251. <https://doi.org/10.1007/s00401-006-0104-6>.
- [47] K. Beyer, M. Domingo-Sábat, J.I. Lao, C. Carrato, I. Ferrer, A. Ariza, Identification and characterization of a new alpha-synuclein isoform and its role in Lewy body diseases, *Neurogenetics.* 9 (2008) 15–23. <https://doi.org/10.1007/s10048-007-0106-0>.
- [48] R.L. Vinnakota, D. Yedlapudi, K.M. Manda, K. Bhamidipati, K.T. Bommakanti, G.S. Rangalakshmi, S. V. Kalivendi, Identification of an Alternatively Spliced α -Synuclein Isoform That Generates a 41-Amino Acid N-Terminal Truncated Peptide, 41-syn: Role in Dopamine Homeostasis, *ACS Chem. Neurosci.* 9 (2018) 2948–2958. <https://doi.org/10.1021/acscchemneuro.8b00140>.
- [49] H.A. Lashuel, C.R. Overk, A. Oueslati, E. Masliah, The many faces of α -synuclein: from structure and toxicity to therapeutic target, *Nat. Rev. Neurosci.* 14 (2013) 38–48. <https://doi.org/10.1038/nrn3406>.
- [50] D. Eliezer, E. Kutluay, R. Bussell, G. Browne, Conformational properties of α -synuclein in its free and lipid-associated states, *J. Mol. Biol.* 307 (2001) 1061–1073. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.4538>.
- [51] B. Fauvet, M.K. Mbefo, M.B. Fares, C. Desobry, S. Michael, M.T. Ardah, E. Tsika, P. Coune, M. Prudent, N. Lion, D. Eliezer, D.J. Moore, B. Schneider, P. Aebischer, O.M. El-Agnaf, E. Masliah, H.A. Lashuel, α -Synuclein in central nervous system and from erythrocytes, mammalian cells, and *Escherichia coli* exists predominantly as disordered monomer, *J. Biol. Chem.* 287 (2012) 15345–15364. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.318949>.
- [52] F.X. Theillet, A. Binolfi, B. Bekei, A. Martorana, H.M. Rose, M. Stuijver, S. Verzini, D. Lorenz, M. Van Rossum, D. Goldfarb, P. Selenko, Structural disorder of monomeric α -synuclein persists in mammalian cells, *Nature.* 530 (2016) 45–50. <https://doi.org/10.1038/nature16531>.
- [53] T. Bartels, J.G. Choi, D.J. Selkoe, α -Synuclein occurs physiologically as a helically folded tetramer that resists aggregation, *Nature.* 477 (2011) 107–111. <https://doi.org/10.1038/nature10324>.
- [54] T.S. Ulmer, A. Bax, N.B. Cole, R.L. Nussbaum, Structure and Dynamics of Micelle-bound Human α -Synuclein, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 9595–9603.
- [55] C.M. Pfefferkorn, Z. Jiang, J. C. Lee, Biophysics of α -synuclein membrane interactions, *Biochim. Biophys. Acta.* 1818 (2012) 162–171.
- [56] V. V. Shvadchak, L.J. Falomir-Lockhart, D.A. Yushchenko, T.M. Jovin, Specificity and kinetics of α -synuclein binding to model membranes determined with fluorescent excited state intramolecular proton transfer (ESIPT) probe, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 13023–13032. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.204776>.
- [57] C.C. Jao, B.G. Hegde, J. Chenb, I.S. Haworth, R. Langen, Structure of membrane-bound α -synuclein from site-directed spin labeling and computational refinement, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105 (2008) 19666–19671. <https://doi.org/10.1073/pnas.0807826105>.
- [58] G. Fusco, A. De Simone, T. Gopinath, V. Vostrikov, M. Vendruscolo, C.M. Dobson, G. Veglia, Direct observation of the three regions in α -synuclein that determine its membrane-bound behaviour, *Nat. Commun.* 5 (2014) 1–8.

- <https://doi.org/10.1038/ncomms4827>.
- [59] H.T. Li, H.N. Du, L. Tang, J. Hu, H.Y. Hu, Structural transformation and aggregation of human α -synuclein in trifluoroethanol: Non-amyloid component sequence is essential and β -sheet formation is prerequisite to aggregation, *Biopolymers*. 64 (2002) 221–226. <https://doi.org/10.1002/bip.10179>.
- [60] V.N. Uversky, J. Li, P. Souillac, I.S. Millett, S. Doniach, R. Jakes, M. Goedert, A.L. Fink, Biophysical properties of the synucleins and their propensities to fibrillate: Inhibition of α -synuclein assembly by β - and γ -synucleins, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 11970–11978. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109541200>.
- [61] H. Miake, H. Mizusawa, T. Iwatsubo, M. Hasegawa, Biochemical characterization of the core structure of α -synuclein filaments, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 19213–19219. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110551200>.
- [62] H. Heise, W. Hoyer, S. Becker, O.C. Andronesi, D. Riedel, M. Baldus, Molecular-level secondary structure, polymorphism, and dynamics of full-length α -synuclein fibrils studied by solid-state NMR, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102 (2005) 15871–15876. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506109102>.
- [63] M. Chen, M. Margittai, J. Chen, R. Langen, Investigation of α -synuclein fibril structure by site-directed spin labeling, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 24970–24979. <https://doi.org/10.1074/jbc.M700368200>.
- [64] M. Vilar, H.T. Chou, T. Luhrs, S.K. Maji, D. Riek-Loher, R. Verel, G. Manning, H. Stahlberg, R. Riek, The fold of α -synuclein fibrils, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105 (2008) 8637–8642.
- [65] R. Riek, D.S. Eisenberg, The activities of amyloids from a structural perspective, *Nature*. 539 (2016) 227–235. <https://doi.org/10.1038/nature20416>.
- [66] M.D. Tuttle, G. Comellas, A.J. Nieuwkoop, D.J. Covell, D.A. Berthold, K.D. Kloepper, J.M. Courtney, J.K. Kim, A.M. Barclay, A. Kendall, W. Wan, G. Stubbs, C.D. Schwieters, V.M.Y. Lee, J.M. George, C.M. Rienstra, Solid-state NMR structure of a pathogenic fibril of full-length human α -synuclein, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 23 (2016) 409–415. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3194>.
- [67] B. Li, P. Ge, K.A. Murray, P. Sheth, M. Zhang, G. Nair, M.R. Sawaya, W.S. Shin, D.R. Boyer, S. Ye, D.S. Eisenberg, Z.H. Zhou, L. Jiang, Cryo-EM of full-length α -synuclein reveals fibril polymorphs with a common structural kernel, *Nat. Commun.* 9 (2018) 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05971-2>.
- [68] Y. Li, C. Zhao, F. Luo, Z. Liu, X. Gui, Z. Luo, X. Zhang, D. Li, C. Liu, X. Li, Amyloid fibril structure of α -synuclein determined by cryo-electron microscopy, *Cell Res.* 28 (2018) 897–903. <https://doi.org/10.1038/s41422-018-0075-x>.
- [69] R. Guerrero-Ferreira, N.M.I. Taylor, D. Mona, P. Ringler, M.E. Lauer, R. Riek, M. Britschgi, H. Stahlberg, Cryo-EM structure of alpha-synuclein fibrils, *Elife*. 7 (2018) 1–18. <https://doi.org/10.7554/eLife.36402>.
- [70] J. Burré, M. Sharma, T.C. Südhof, Cell biology and pathophysiology of α -synuclein, *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 8 (2018) 1–28. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a024091>.
- [71] J. Burré, The synaptic function of α -synuclein, *J. Parkinsons. Dis.* 5 (2015) 699–713. <https://doi.org/10.3233/JPD-150642>.
- [72] C.H. Westphal, S.S. Chandra, Monomeric synucleins generate membrane curvature, *J. Biol. Chem.* 288 (2013) 1829–1840. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.418871>.
- [73] M.M. Ouberai, J. Wang, M.J. Swann, C. Galvagnion, T. Guilliams, C.M. Dobson, M.E. Welland, α -Synuclein senses lipid packing defects and induces lateral expansion of lipids leading to membrane remodeling, *J. Biol. Chem.* 288 (2013) 20883–20895. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.478297>.
- [74] J. Burré, M. Sharma, T. Tsetsenis, V. Buchman, M.R. Etherton, T.C. Südhof, α -Synuclein Promotes SNARE-Complex Assembly in Vivo and in Vitro, *Science (80-.)*. 329 (2010) 1663–1667. <https://doi.org/10.1126/science.1195227>.
- [75] R.H.C. Chen, S. Wislet-Gendebien, F. Samuel, N.P. Visanji, G. Zhang, D. Marsilio, T. Langman, P.E. Fraser, A. Tandon, α -Synuclein membrane association is regulated by the Rab3a recycling machinery and presynaptic activity, *J. Biol. Chem.* 288 (2013) 7438–7449. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.439497>.
- [76] X.M. Peng, R. Tehranian, P. Dietrich, L. Stefanis, R.G. Perez, α -synuclein activation of protein phosphatase 2A reduces tyrosine hydroxylase phosphorylation in dopaminergic cells, *J. Cell Sci.* 118 (2005) 3523–3530. <https://doi.org/10.1242/jcs.02481>.
- [77] J.T. Guo, A.Q. Chen, Q. Kong, H. Zhu, C.M. Ma, C. Qin, Inhibition of vesicular monoamine transporter-2 activity in α -synuclein stably transfected SH-SY5Y cells, *Cell. Mol. Neurobiol.* 28 (2008) 35–47. <https://doi.org/10.1007/s10571-007-9227-0>.
- [78] B. Butler, K. Saha, T. Rana, J.P. Becker, D. Sambo, P. Davari, J.S. Goodwin, H. Khoshbouei, Dopamine transporter activity is modulated by α -synuclein, *J. Biol. Chem.* 290 (2015) 29542–29554. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.691592>.
- [79] A.W. Schmid, B. Fauvet, M. Moniatte, H.A. Lashuel, Alpha-synuclein Post-translational Modifications as Potential Biomarkers for Parkinson Disease and Other Synucleinopathies, *Mol. Cell. Proteomics*. 12 (2013) 3543–3558. <https://doi.org/10.1074/mcp.r113.032730>.
- [80] A. Oueslati, Implication of Alpha-Synuclein Phosphorylation at S129 in Synucleinopathies: What Have We Learned in the Last Decade?, *J. Parkinsons. Dis.* 6 (2016) 39–51. <https://doi.org/10.3233/JPD-160779>.
- [81] J.P. Anderson, D.E. Walker, J.M. Goldstein, R. De Laat, K. Banducci, R.J. Caccavello, R. Barbour, J. Huang, K. Kling, M. Lee, L. Diep, P.S. Keim, X. Shen, T. Chataway, M.G. Schlossmacher, P. Seubert, D. Schenk, S. Sinha, W.P. Gai, T.J. Chilcote, Phosphorylation of Ser-129 is the dominant pathological modification of α -synuclein in familial and sporadic lewy body disease, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 29739–29752. <https://doi.org/10.1074/jbc.M600933200>.
- [82] T. Bartels, N.C. Kim, E.S. Luth, D.J. Selkoe, N-alpha-acetylation of α -synuclein increases its helical folding propensity, GM1 binding specificity and resistance to aggregation, *PLoS One*. 9 (2014). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103727>.

- [83] I. Dikiy, D. Eliezer, N-terminal Acetylation stabilizes N-terminal Helicity in Lipid- and Micelle-bound α -Synuclein and increases its affinity for Physiological Membranes, *J. Biol. Chem.* 289 (2014) 3652–3665. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.512459>.
- [84] R.M. de Oliveira, H. Vicente Miranda, L. Francelle, R. Pinho, É.M. Szegő, R. Martinho, F. Munari, D.F. Lázaro, S. Moniot, P. Guerreiro, L. Fonseca, Z. Marijanovic, P. Antas, E. Gerhardt, F.J. Enguita, B. Fauvet, D. Penque, T.F. Pais, Q. Tong, S. Becker, S. Kügler, H.A. Lashuel, C. Steegborn, M. Zweckstetter, T.F. Outeiro, The mechanism of sirtuin 2–mediated exacerbation of alpha-synuclein toxicity in models of Parkinson disease, *PLoS Biol.* 15 (2017) 1–27. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2000374>.
- [85] J.A. Duce, B.X. Wong, H. Durham, J.C. Devedjian, D.P. Smith, D. Devos, Post translational changes to α -synuclein control iron and dopamine trafficking; a concept for neuron vulnerability in Parkinson's disease, *Mol. Neurodegener.* 12 (2017) 1–12. <https://doi.org/10.1186/s13024-017-0186-8>.
- [86] L. Stefanis, E. Emmanouilidou, M. Pantazopoulou, D. Kirik, K. Vekrellis, G.K. Tofaris, How is alpha-synuclein cleared from the cell?, *J. Neurochem.* 150 (2019) 577–590. <https://doi.org/10.1111/jnc.14704>.
- [87] G.K. Tofaris, H.T. Kim, R. Hourez, J.W. Jung, K.P. Kim, A.L. Goldberg, Ubiquitin ligase Nedd4 promotes α -synuclein degradation by the endosomal-lysosomal pathway, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108 (2011) 17004–17009. <https://doi.org/10.1073/pnas.1109356108>.
- [88] J.E. Tetzlaff, P. Putcha, T.F. Outeiro, A. Ivanov, O. Berezovska, B.T. Hyman, P.J. McLean, CHIP targets toxic α -synuclein oligomers for degradation, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 17962–17968. <https://doi.org/10.1074/jbc.M802283200>.
- [89] M. Savyon, S. Engelender, SUMOylation in α -Synuclein Homeostasis and Pathology, *Front. Aging Neurosci.* 12 (2020). <https://doi.org/10.3389/fnagi.2020.00167>.
- [90] B.K. Choi, M.G. Choi, J.Y. Kim, Y. Yang, Y. Lai, D.H. Kweon, N.K. Lee, Y.K. Shin, Large α -synuclein oligomers inhibit neuronal SNARE mediated vesicle docking, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110 (2012) 4087–4092.
- [91] L. Wang, U. Das, D.A. Scott, Y. Tang, P.J. McLean, S. Roy, α -Synuclein multimers cluster synaptic vesicles and attenuate recycling, *Curr. Biol.* 24 (2014) 2319–2326. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.08.027>.
- [92] D. Scott, S. Roy, α -Synuclein inhibits intersynaptic vesicle mobility and maintains recycling-pool homeostasis, *J. Neurosci.* 32 (2012) 10129–10135. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0535-12.2012>.
- [93] V.M. Nemani, W. Lu, V. Berge, K. Nakamura, B. Onoa, M.K. Lee, F.A. Chaudhry, R.A. Nicoll, R.H. Edwards, Increased Expression of Alpha-Synuclein Reduces Neurotransmitter Release by Inhibiting Synaptic Vesicle Reclustering After Endocytosis, *Neuron.* 65 (2010) 66–79. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.12.023>.
- [94] E. V Mosharov, K.E. Larsen, E. Kanter, K.A. Phillips, Y. Schmitz, D.E. Krantz, K. Kobayashi, R.H. Edwards, D. Sulzer, Interplay between calcium, dopamine and a-syn, *62* (2010) 218–229. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.01.033>. Interplay.
- [95] A. Abeliovich, Y. Schmitz, I. Farinas, D. Choi-Lundberg, W.H. Ho, P.E. Castillo, N. Shinsky, J.M. Verdugo, M. Armanini, A. Ryan, M. Hynes, H. Phillips, D. Sulzer, A. Rosenthal, Mice lacking alpha-synuclein display functional deficits in the nigrostriatal dopamine system, *Neuron.* 25 (2000) 239–252. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10707987.
- [96] D. Liu, L. Jin, H. Wang, H. Zhao, C. Zhao, C. Duan, L. Lu, B. Wu, S. Yu, P. Chan, Y. Li, H. Yang, Silencing α -synuclein gene expression enhances tyrosine hydroxylase activity in MN9D cells, *Neurochem. Res.* 33 (2008) 1401–1409. <https://doi.org/10.1007/s11064-008-9599-7>.
- [97] R. Tehranian, S.E. Montoya, A.D. Van Laar, T.G. Hastings, R.G. Perez, Alpha-synuclein inhibits aromatic amino acid decarboxylase activity in dopaminergic cells, *J. Neurochem.* 99 (2006) 1188–1196. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.04146.x>.
- [98] M. Lundblad, M. Decressac, B. Mattsson, A. Björklund, Impaired neurotransmission caused by overexpression of α -synuclein in nigral dopamine neurons, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109 (2012) 3213–3219. <https://doi.org/10.1073/pnas.1200575109>.
- [99] R. Di Maio, P.J. Barrett, E.K. Hoffman, C.W. Barrett, A. Zharikov, A. Borah, X. Hu, J. McCoy, C.T. Chu, E.A. Burton, T.G. Hastings, J.T. Greenamyre, α -synuclein binds to TOM20 and inhibits mitochondrial protein import in Parkinson's disease, *Sci. Transl. Med.* 8 (2016). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaf3634>.
- [100] J.H. Martínez, F. Fuentes, V. Vanasco, S. Alvarez, A. Alaimo, A. Cassina, F. Coluccio Leskow, F. Velazquez, Alpha-synuclein mitochondrial interaction leads to irreversible translocation and complex I impairment, *Arch. Biochem. Biophys.* 651 (2018) 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2018.04.018>.
- [101] V. Loeb, E. Yakunin, A. Saada, R. Sharon, The transgenic overexpression of α -synuclein and not its related pathology associates with complex I inhibition, *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 7334–7343. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.061051>.
- [102] A. Flierl, L.M.A. Oliveira, L.J. Falomir-Lockhart, S.K. Mak, J. Hesley, F. Soldner, D.J. Arndt-Jovin, R. Jaenisch, J.W. Langston, T.M. Jovin, B. Schuele, Higher Vulnerability and Stress Sensitivity of Neuronal Precursor Cells Carrying an Alpha-Synuclein Gene Triplication, *PLoS One.* 9 (2014). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112413>.
- [103] C. Dölle, I. Flønes, G.S. Nido, H. Miletic, N. Osuagwu, S. Kristoffersen, P.K. Lilleng, J.P. Larsen, O.B. Tysnes, K. Haugarvoll, L.A. Bindoff, C. Tzoulis, Defective mitochondrial DNA homeostasis in the substantia nigra in Parkinson disease, *Nat. Commun.* 7 (2016). <https://doi.org/10.1038/ncomms13548>.
- [104] V.M. Pozo Devoto, T.L. Falzone, Mitochondrial dynamics in Parkinson's disease: A role for α -synuclein?, *DMM Dis. Model. Mech.* 10 (2017) 1075–1087. <https://doi.org/10.1242/dmm.026294>.
- [105] M.W.C. Rousseaux, M. de Haro, C.A. Lasagna-Reeves, A. de Maio, J. Park, P. Jafar-Nejad, I. Al-Ramahi, A. Sharma, L. See, N. Lu, L. Vilanova-Velez, T.J. Klisch, T.F. Westbrook, J.C. Troncoso, J. Botas, H.Y. Zoghbi, TRIM28 regulates the nuclear accumulation and toxicity of both alpha-synuclein and tau, *Elife.* 5 (2016) 1–24.

- <https://doi.org/10.7554/eLife.19809>.
- [106] R. Pinho, I. Paiva, K.G. Jercic, L. Fonseca-Ornelas, E. Gerhardt, C. Fahlbusch, P. Garcia-Esparcia, C. Kerimoglu, M.A. Pavlou, A. Villar-Pique, E. Szego, T. Lopes da Fonseca, F. Odoardi, S. Soeroes, A.C. Rego, W. Fischle, J.C. Schwamborn, T. Meyer, S. Kugler, I. Ferrer, J. Attems, A. Fischer, S. Becker, M. Zweckstetter, F. Borovecki, T.F. Outeiro, Nuclear localization and phosphorylation modulate pathological effects of alpha-synuclein, *Hum. Mol. Genet.* 28 (2019) 31–50.
- [107] I. Paiva, R. Pinho, M.A.S. Pavlou, M. Hennion, P. Wales, A.L. Schutz, A. Rajput, E. Szego, C. Kerimoglu, E. Gerhardt, A.C. Rego, A. Fischer, S. Bonn, T.F. Outeiro, Sodium butyrate rescues dopaminergic cells from alpha-synuclein-induced transcriptional deregulation and DNA damage, *Hum. Mol. Genet.* 26 (2017) 2231–2246.
- [108] J. Goers, A.B. Manning-Bog, A.L. McCormack, I.S. Millett, S. Doniach, D.A. Di Monte, V.N. Uversky, A.L. Fink, Nuclear localization of α -synuclein and its interaction with histones, *Biochemistry.* 42 (2003) 8465–8471. <https://doi.org/10.1021/bi0341152>.
- [109] E. Kontopoulos, J.D. Parvin, M.B. Feany, α -Synuclein Acts in the Nucleus To Inhibit Histone Acetylation and Promote Neurotoxicity, *Hum. Mol. Genet.* 15 (2006) 3012–3023. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddl243>.
- [110] L.D. Bernal-Conde, R. Ramos-Acevedo, M.A. Reyes-Hernández, A.J. Balbuena-Olvera, I.D. Morales-Moreno, R. Argüero-Sánchez, B. Schüle, M. Guerra-Crespo, Alpha-Synuclein Physiology and Pathology: A Perspective on Cellular Structures and Organelles, *Front. Neurosci.* 13 (2020). <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.01399>.
- [111] E. Colla, P.H. Jensen, O. Pletnikova, J.C. Troncoso, C. Glabe, M.K. Lee, Accumulation of toxic α -synuclein oligomer within endoplasmic reticulum occurs in α -synucleinopathy in vivo, *J. Neurosci.* 32 (2012) 3301–3305. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5368-11.2012>.
- [112] S.M. Heman-Ackah, R. Manzano, J.J.M. Hoozemans, W. Scheper, R. Flynn, W. Haerty, S.A. Cowley, A.R. Bassett, M.J.A. Wood, Alpha-synuclein induces the unfolded protein response in Parkinson's disease SNCA triplication iPSC-derived neurons, *Hum. Mol. Genet.* 26 (2017) 4441–4450. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddx331>.
- [113] C. Betzer, L.B. Lassen, A. Olsen, R.H. Kofoed, L. Reimer, E. Gregersen, J. Zheng, T. Cali, W. Gai, T. Chen, A. Moeller, M. Brini, Y. Fu, G. Halliday, T. Brudek, S. Aznar, B. Pakkenberg, J.P. Andersen, P.H. Jensen, Alpha-synuclein aggregates activate calcium pump SERCA leading to calcium dysregulation, *EMBO Rep.* 19 (2018) 1–21. <https://doi.org/10.15252/embr.201744617>.
- [114] J.R. Mazzulli, F. Zunke, O. Isacson, L. Studer, D. Krainc, α -Synuclein-induced lysosomal dysfunction occurs through disruptions in protein trafficking in human midbrain synucleinopathy models, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113 (2016) 1931–1936. <https://doi.org/10.1073/pnas.1520335113>.
- [115] I. Paiva, G. Jain, D.F. Lázaro, K.G. Jerčić, T. Hentrich, C. Kerimoglu, R. Pinho, È.M. Szegő, S. Burkhardt, V. Capece, R. Halder, R. Islam, M. Xylaki, L.A. Caldi Gomes, A.E. Roser, P. Lingor, J.M. Schulze-Hentrich, F. Borovečki, A. Fischer, T.F. Outeiro, Alpha-synuclein deregulates the expression of COL4A2 and impairs ER-Golgi function, *Neurobiol. Dis.* 119 (2018) 121–135. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2018.08.001>.
- [116] A.R. Winslow, C.W. Chen, S. Corrochano, A. Acevedo-Arozena, D.E. Gordon, A.A. Peden, M. Lichtenberg, F.M. Menzies, B. Ravikumar, S. Imarisio, S. Brown, C.J. O'Kane, D.C. Rubinsztein, α -Synuclein impairs macroautophagy: Implications for Parkinson's disease, *J. Cell Biol.* 190 (2010) 1023–1037. <https://doi.org/10.1083/jcb.201003122>.
- [117] A.M. Cuervo, L. Stafanis, R. Fredenburg, P.T. Lansbury, D. Sulzer, Impaired degradation of mutant α -synuclein by chaperone-mediated autophagy, *Science* (80-.). 305 (2004) 1292–1295. <https://doi.org/10.1126/science.1101738>.
- [118] J.R. Mazzulli, Y. Xu, Y. Sun, A.L. Knight, P.J. Mclean, A. Caldwell, E. Sidransky, G.A. Grabowski, D. Krainc, Gaucher's Disease Glucocerebrosidase and alpha-synuclein form a bidirectional pathogenic loop in synucleinopathies, 146 (2012) 37–52.
- [119] Y. Chu, G.A. Morfini, L.B. Langhamer, Y. He, S.T. Brady, J.H. Kordower, Alterations in axonal transport motor proteins in sporadic and experimental Parkinson's disease, *Brain.* 135 (2012) 2058–2073. <https://doi.org/10.1093/brain/aws133>.
- [120] I. Prots, V. Veber, S. Brey, S. Campioni, K. Buder, R. Riek, K.J. Böhm, B. Winner, α -Synuclein Oligomers Impair Neuronal Microtubule-Kinesin Interplay, *J. Biol. Chem.* 288 (2013) 21742–21754. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.451815>.
- [121] B.I. Giasson, M.S. Forman, M. Higuchi, L.I. Golbe, C.L. Graves, P.T. Kotzbauer, J.Q. Trojanowski, V.M.Y. Lee, Initiation and synergistic fibrillization of tau and alpha-synuclein, *Science* (80-.). 300 (2003) 636–640. <https://doi.org/10.1126/science.1082324>.
- [122] R. Krüger, W. Kuhn, K.L. Leenders, R. Sprengelmeyer, T. Müller, D. Woitalla, A.T. Portman, R.P. Maguire, L. Veenma, U. Schröder, L. Schöls, J.T. Epplen, O. Riess, H. Przuntek, Familial parkinsonism with synuclein pathology: Clinical and PET studies of A30P mutation carriers, *Neurology.* 56 (2001) 1355–1362. <https://doi.org/10.1212/WNL.56.10.1355>.
- [123] J.J. Zarranz, J. Alegre, J.C. Go, E. Lezcano, R. Ros, I. Ampuero, J. Hoenicka, O. Rodriguez, T. Ser, D.G. Mun, The New Mutation, E46K, of alpha-Synuclein Causes Parkinson and Lewy Body Dementia, *Ann. Neurol.* 55 (2004) 164–173.
- [124] M.H. Polymeropoulos, C. Lavedan, E. Leroy, S.E. Ide, A. Dehejia, A. Dutra, B. Pike, H. Root, J. Rubenstein, R. Boyer, E.S. Stenroos, S. Chandrasekharappa, A. Athanassiadou, T. Papapetropoulos, W.G. Johnson, A.M. Lazzarini, R.C. Duvoisin, G. Di Iorio, L.I. Golbe, R.L. Nussbaum, Mutation in the α -synuclein gene identified in families with Parkinson's disease, *Science* (80-.). 276 (1997) 2045–2047. <https://doi.org/10.1126/science.276.5321.2045>.
- [125] S. Fujioka, K. Ogaki, P. Tacik, R.J. Uitti, O.A. Ross, Z.K. Wszolek, Update on novel familial forms of Parkinson's disease and multiple, *Parkinsonism Relat. Disord.* 20 (2014) 29–34.
- [126] H. Yoshino, M. Hirano, A.J. Stoessl, Y. Imamichi, A. Ikeda, Y. Li, M. Funayama, I. Yamada, Y. Nakamura, V.

- Sossi, M.J. Farrer, K. Nishioka, N. Hattori, Homozygous alpha-synuclein p.A53V in familial Parkinson's disease, *Neurobiol. Aging*. 57 (2017) 248.e7–248.e12. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2017.05.022>.
- [127] P. Flagmeier, G. Meisl, M. Vendruscolo, T.P.J. Knowles, C.M. Dobson, A.K. Buell, C. Galvagnion, Mutations associated with familial Parkinson's disease alter the initiation and amplification steps of α -synuclein aggregation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113 (2016) 10328–10333. <https://doi.org/10.1073/pnas.1604645113>.
- [128] D.F. Lázaro, E.F. Rodrigues, R. Langohr, H. Shahpasandzadeh, T. Ribeiro, P. Guerreiro, E. Gerhardt, K. Krohnert, J. Klucken, M.D. Pereira, B. Popova, N. Kruse, B. Mollenhauer, S.O. Rizzoli, G.H. Braus, K.M. Danzer, T.F. Outeiro, Systematic Comparison of the effect of α Syn mutations on its oligomerization and aggregation, *PLoS Genet.* 10 (2014).
- [129] M. Robotta, J. Cattani, J.C. Martins, V. Subramaniam, M. Drescher, Alpha-Synuclein Disease Mutations Are Structurally Defective and Locally Affect Membrane Binding, *J. Am. Chem. Soc.* 139 (2017) 4254–4257. <https://doi.org/10.1021/jacs.6b05335>.
- [130] G.M. Mohite, R. Kumar, R. Panigrahi, A. Navalkar, N. Singh, D. Datta, S. Mehra, S. Ray, L.G. Gadhe, S. Das, N. Singh, D. Chatterjee, A. Kumar, S.K. Maji, Comparison of Kinetics, Toxicity, Oligomer Formation, and Membrane Binding Capacity of α -Synuclein Familial Mutations at the A53 Site, Including the Newly Discovered A53V Mutation, *Biochemistry*. 57 (2018) 5183–5187. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.8b00314>.
- [131] D. Ghosh, S. Mehra, S. Sahay, P.K. Singh, S.K. Maji, α -Synuclein Aggregation and Its Modulation, *Int. J. Biol. Macromol.* 100 (2017) 37–54. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.10.021>.
- [132] N.J. Rutherford, B.D. Moore, T.E. Golde, B.I. Giasson, Divergent effects of the H50Q and G51D SNCA mutations on the aggregation of α -synuclein, *J. Neurochem.* 131 (2014) 859–867. <https://doi.org/10.1111/jnc.12806>.
- [133] C.R. Bodner, A.S. Maltsev, C.M. Dobson, A. Bax, Differential phospholipid binding of α -synuclein variants implicated in Parkinson's disease revealed by solution NMR spectroscopy, *Biochemistry*. 49 (2010) 862–871. <https://doi.org/10.1021/bi901723p>.
- [134] M. Stöckl, M.M.A.E. Claessens, V. Subramaniam, Kinetic measurements give new insights into lipid membrane permeabilization by α -synuclein oligomers, *Mol. Biosyst.* 8 (2012) 338–345. <https://doi.org/10.1039/c1mb05293d>.
- [135] L. Tosatto, A.O. Andrighetti, N. Plotegher, V. Antonini, I. Tessari, L. Ricci, L. Bubacco, M. Dalla Serra, Alpha-synuclein pore forming activity upon membrane association, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1818 (2012) 2876–2883. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2012.07.007>.
- [136] B. Winner, R. Jappelli, S.K. Maji, P.A. Desplats, L. Boyer, S. Aigner, C. Hetzer, T. Loher, M. Vilar, S. Campioni, C. Tzitzilonis, A. Soragni, S. Jessberger, H. Mira, A. Consiglio, E. Pham, E. Masliah, F.H. Gage, R. Riek, In vivo demonstration that α -synuclein oligomers are toxic, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108 (2011).
- [137] L. Pieri, K. Madiona, L. Bousset, R. Melki, Fibrillar α -synuclein and huntingtin exon 1 assemblies are toxic to the cells, *Biophys. J.* 102 (2012) 2894–2905. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2012.04.050>.
- [138] W. Peelaerts, L. Bousset, a. Van der Perren, a. Moskalyuk, R. Pulizzi, M. Giugliano, C. Van den Haute, R. Melki, V. Baekelandt, α -Synuclein strains cause distinct synucleinopathies after local and systemic administration, *Nature*. (2015). <https://doi.org/10.1038/nature14547>.
- [139] H. Fujiwara, M. Hasegawa, N. Dohmae, A. Kawashima, E. Masliah, M.S. Goldberg, J. Shen, K. Takio, T. Iwatsubo, α -Synuclein Is Phosphorylated in Synucleinopathy Lesions, *Nat. Cell Biol.* 4 (2002) 160–164. <https://doi.org/10.1038/ncb748>.
- [140] Y. Xu, Y. Deng, H. Qing, The phosphorylation of α -synuclein: Development and implication for the mechanism and therapy of the Parkinson's disease, *J. Neurochem.* 135 (2015) 4–18. <https://doi.org/10.1111/jnc.13234>.
- [141] O.S. Gorbatyuk, S. Li, L.F. Sullivan, W. Chen, G. Kondrikova, F.P. Manfredsson, R.J. Mandel, N. Muzyczka, The phosphorylation state of Ser-129 in human α -synuclein determines neurodegeneration in a rat model of Parkinson disease, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105 (2008) 763–768. <https://doi.org/10.1073/pnas.0711053105>.
- [142] N.R. McFarland, Z. Fan, K. Xu, M.A. Schwarzschild, M.B. Feany, B.T. Hyman, P.J. McLean, α -Synuclein S129 phosphorylation mutants do not alter nigrostriatal toxicity in a rat model of parkinson disease, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 68 (2009) 515–524. <https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e3181a24b53>.
- [143] N. de O. Manzanza, L. Sedlackova, R.N. Kalaria, Alpha-Synuclein Post-translational Modifications: Implications for Pathogenesis of Lewy Body Disorders, *Front. Aging Neurosci.* 13 (2021) 1–22. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2021.690293>.
- [144] A. Oueslati, K.E. Paleologou, B.L. Schneider, P. Aebischer, H.A. Lashuel, Mimicking phosphorylation at serine 87 inhibits the aggregation of human α -synuclein and protects against its toxicity in a rat model of parkinson's disease, *J. Neurosci.* 32 (2012) 1536–1544. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3784-11.2012>.
- [145] K.E. Paleologou, A. Oueslati, G. Shakked, C.C. Rospigliosi, H.Y. Kim, G.R. Lamberto, C.O. Fernandez, A. Schmid, F. Chegini, W.P. Gai, D. Chiappe, M. Moniatte, B.L. Schneider, P. Aebischer, D. Eliezer, M. Zweckstetter, E. Masliah, H.A. Lashuel, Phosphorylation at S87 is enhanced in synucleinopathies, inhibits α -synuclein oligomerization, and influences synuclein-membrane interactions, *J. Neurosci.* 30 (2010) 3184–3198. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5922-09.2010>.
- [146] M. Hejjaoui, S. Butterfield, B. Fauvet, F. Vercurysse, J. Cui, I. Dikiy, M. Prudent, D. Olschewski, Y. Zhang, D. Eliezer, H.A. Lashuel, Elucidating the Role of C-Terminal Post-Translational Modifications Using Protein Semisynthesis Strategies: α -Synuclein Phosphorylation at Tyrosine 125, *J. Am. Chem. Soc.* 134 (2012) 5196–5210.
- [147] L. Chen, M. Periquet, X. Wang, A. Negro, P.J. McLean, B.T. Hyman, M.B. Feany, Tyrosine and serine phosphorylation of α -synuclein have opposing effects on neurotoxicity and soluble oligomer formation, *J. Clin. Invest.* 119 (2009) 3257–3265. <https://doi.org/10.1172/JCI39088>.
- [148] J.T. Lee, T.C. Wheeler, L. Li, L.S. Chin, Ubiquitination of α -synuclein by Siah-1 promotes α -synuclein aggregation and apoptotic cell death, *Hum. Mol. Genet.* 17 (2008) 906–917. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddm363>.

- [149] R. Rott, R. Szargel, J. Haskin, V. Shani, A. Shainskaya, I. Manov, E. Liani, E. Avraham, S. Engelender, Monoubiquitylation of α -Synuclein by seven in absentia homolog (SIAH) promotes its aggregation in dopaminergic cells, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 3316–3328. <https://doi.org/10.1074/jbc.M704809200>.
- [150] Z. Alexopoulou, J. Lang, R.M. Perrett, M. Elschami, M.E.D. Hurry, H.T. Kim, D. Mazaraki, A. Szabo, B.M. Kessler, A.L. Goldberg, O. Ansorge, T.A. Fulga, G.K. Tofaris, Deubiquitinase Usp8 regulates α -synuclein clearance and modifies its toxicity in Lewy body disease, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113 (2016) E4688–E4697. <https://doi.org/10.1073/pnas.1523597113>.
- [151] P. Krumova, E. Meulmeester, M. Garrido, M. Tirard, H.-H. Hsiao, G. Bossis, H. Urlaub, S.K. Markus Zweckstetter, F. Melchior, M. Bähr, J.H. Weishaupt, Sumoylation inhibits alpha-synuclein aggregation and toxicity, *J Biol Chem.* 194 (2011) 49–60.
- [152] R. Rott, R. Szargel, V. Shani, H. Hamza, M. Savyon, F.A. Elghani, R. Bandopadhyay, S. Engelender, SUMOylation and ubiquitination reciprocally regulate α -synuclein degradation and pathological aggregation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114 (2017) 13176–13181. <https://doi.org/10.1073/pnas.1704351114>.
- [153] Z.A. Sorrentino, B.I. Giasson, The emerging role of α -synuclein truncation in aggregation and disease, *J. Biol. Chem.* 295 (2020) 10224–10244. <https://doi.org/10.1074/jbc.REV120.011743>.
- [154] A. Oueslati, M. Fournier, H.A. Lashuel, Role of post-translational modifications in modulating the structure, function and toxicity of α -synuclein. Implications for Parkinson's disease pathogenesis and therapies, Elsevier B.V., 2010. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(10\)83007-9](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(10)83007-9).
- [155] I.M. Van Der Wateren, T.P.J. Knowles, A.K. Buell, C.M. Dobson, C. Galvagnion, C-terminal truncation of α -synuclein promotes amyloid fibril amplification at physiological pH, *Chem. Sci.* 9 (2018) 5506–5516. <https://doi.org/10.1039/c8sc01109e>.
- [156] M. Terada, G. Suzuki, T. Nonaka, F. Kametani, A. Tamaoka, M. Hasegawa, The effect of truncation on prion-like properties of α -synuclein, *J. Biol. Chem.* 293 (2018) 13910–13920. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.001862>.
- [157] Z.A. Sorrentino, N. Vijayaraghavan, K.M. Gorion, C.J. Riffe, K.H. Strang, J. Caldwell, B.I. Giasson, Physiological C-terminal truncation of α -synuclein potentiates the prion-like formation of pathological inclusions, *J. Biol. Chem.* 293 (2018) 18914–18932. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.005603>.
- [158] H. Vicente Miranda, O.M.A. El-Agnaf, T.F. Outeiro, Glycation in Parkinson's disease and Alzheimer's disease, *Mov. Disord.* 31 (2016) 782–790. <https://doi.org/10.1002/mds.26566>.
- [159] Y. Sun, Y.H. Chang, H.F. Chen, Y.H. Su, H.F. Su, C.Y. Li, Risk of Parkinson disease onset in patients with diabetes: A 9-year population-based cohort study with age and sex stratifications, *Diabetes Care.* 35 (2012) 1047–1049. <https://doi.org/10.2337/dc11-1511>.
- [160] P.M. Levine, A. Galesic, A.T. Balana, A.L. Mahul-Mellier, M.X. Navarro, C.A. De Leon, H.A. Lashuel, M.R. Pratt, α -Synuclein O-GlcNAcylation alters aggregation and toxicity, revealing certain residues as potential inhibitors of Parkinson's disease, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 116 (2019) 1511–1519. <https://doi.org/10.1073/pnas.1808845116>.
- [161] J. Zhang, H. Lei, Y. Chen, Y.T. Ma, F. Jiang, J. Tan, Y. Zhang, J. Da Li, Enzymatic O-GlcNAcylation of α -synuclein reduces aggregation and increases SDS-resistant soluble oligomers, *Neurosci. Lett.* 655 (2017) 90–94. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2017.06.034>.
- [162] B.I. Giasson, Oxidative Damage Linked to Neurodegeneration, *Science* (80-.). 290 (2000) 985–989.
- [163] J.E. Duda, B.I. Giasson, Q. Chen, T.L. Gur, H.I. Hurtig, M.B. Stern, S.M. Gollomp, H. Ischiropoulos, V.M. Lee, J.Q. Trojanowski, Short Communication Neurodegenerative Synucleinopathies, *Am. J. Pathol.* 157 (2000) 1439–1445. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64781-5](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64781-5).
- [164] Y.K. Al-Hilaly, L. Biasetti, B.J.F. Blakeman, S.J. Pollack, S. Zibae, A. Abdul-Sada, J.R. Thorpe, W.F. Xue, L.C. Serpell, The involvement of dityrosine crosslinking in α -synuclein assembly and deposition in Lewy Bodies in Parkinson's disease, *Sci. Rep.* 6 (2016) 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep39171>.
- [165] Y. He, Z. Yu, S. Chen, Alpha-Synuclein Nitration and Its Implications in Parkinson's Disease, *ACS Chem. Neurosci.* (2018). <https://doi.org/10.1021/acschemneuro.8b00288>.
- [166] E. Fernández, J.M. García-Moreno, A. Martín De Pablos, J. Chacón, May the evaluation of nitrosative stress through selective increase of 3-nitrotyrosine proteins other than nitroalbumin and dominant tyrosine-125/136 nitrosylation of serum α -synuclein serve for diagnosis of sporadic parkinson's disease, *Antioxidants Redox Signal.* 19 (2013) 912–918. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5250>.
- [167] A. Prigione, F. Piazza, L. Brighina, B. Begni, A. Galbussera, J.C. DiFrancesco, S. Andreoni, R. Piolti, C. Ferrarese, Alpha-synuclein nitration and autophagy response are induced in peripheral blood cells from patients with Parkinson disease, *Neurosci. Lett.* 477 (2010) 6–10. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2010.04.022>.
- [168] R. Burai, N. Ait-bouziad, A. Chiki, H. Lashuel, Elucidating the role of site-specific nitration of alpha-synuclein in the pathogenesis of Parkinson's disease via protein semisynthesis and mutagenesis, *J. Am. Chem. Soc.* 137 (2015) 5041–5052.
- [169] R. Hodara, E.H. Norris, B.I. Giasson, A.J. Mishizen-Eberz, D.R. Lynch, V.M.Y. Lee, H. Ischiropoulos, Functional consequences of α -synuclein tyrosine nitration: Diminished binding to lipid vesicles and increased fibril formation, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 47746–47753. <https://doi.org/10.1074/jbc.M408906200>.
- [170] V.N. Uversky, G. Yamin, L.A. Munishkina, M.A. Karymov, I.S. Millett, S. Doniach, Y.L. Lyubchenko, A.L. Fink, Effects of nitration on the structure and aggregation of α -synuclein, *Mol. Brain Res.* 134 (2005) 84–102. <https://doi.org/10.1016/j.molbrainres.2004.11.014>.
- [171] E. Sevcsik, A.J. Trexler, J.M. Dunn, E. Rhoades, Allosteric in a disordered protein: Oxidative modifications to α -Synuclein act distally to regulate membrane binding, *J Am Chem Soc.* 133 (2011) 7152–7158.
- [172] A. Trostchansky, S. Lind, R. Hodara, T. Oe, I.A. Blair, H. Ischiropoulos, H. Rubbo, J.M. Souza, Interaction with phospholipids modulates α -synuclein nitration and lipid-protein adduct formation, *Biochem. J.* 393 (2006) 343–

349. <https://doi.org/10.1042/BJ20051277>.
- [173] S.R. Danielson, J.M. Held, B. Schilling, M. Oo, B.W. Gibson, J.K. Andersen, Preferentially increased nitration of α -synuclein at tyrosine-39 in a cellular oxidative model of Parkinson's disease, *Anal. Chem.* 81 (2009) 7823–7828. <https://doi.org/10.1021/ac901176t>.
- [174] Y. Zhang, N. Lu, Z. Gao, Hemin-H₂O₂-NO₂- induced protein oxidation and tyrosine nitration are different from those of SIN-1: A study on glutamate dehydrogenase nitrative/oxidative modification, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41 (2009) 907–915. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2008.08.040>.
- [175] D.K. Stone, T. Kiyota, R.L. Mosley, H.E. Gendelman, A Model of Nitric Oxide Induced α -Synuclein Misfolding in Parkinson's Disease, *Neurosci. Lett.* 523 (2012) 167–173.
- [176] A.D. Reynolds, J.G. Glanzer, I. Kadiu, M. Ricardo-Dukelow, A. Chaudhuri, P. Ciborowski, R. Cerny, B. Gelman, M.P. Thomas, R.L. Mosley, H.E. Gendelman, Nitrated alpha-synuclein-activated microglial profiling for Parkinson's disease, *J. Neurochem.* 104 (2008) 1504–1525. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.05087.x>.
- [177] Z. Yu, X. Xu, Z. Xiang, J. Zhou, Z. Zhang, C. Hu, C. He, Nitrated α -synuclein induces the loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra of rats, *PLoS One.* 5 (2010). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009956>.
- [178] S. Schildknecht, H.R. Gerding, C. Karreman, M. Drescher, H.A. Lashuel, T.F. Outeiro, D.A. Di Monte, M. Leist, Oxidative and nitrative alpha-synuclein modifications and proteostatic stress: Implications for disease mechanisms and interventions in synucleinopathies, *J. Neurochem.* 125 (2013) 491–511. <https://doi.org/10.1111/jnc.12226>.
- [179] S. Pennathur, V. Jackson-lewis, S. Przedborski, J.W. Heinecke, Mass spectrometric quantification of 3-nitrotyrosine, ortho-tyrosine, and o,o'-dityrosine in brain tissue of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3, 6-tetrahydropyridine-treated mice, a model of oxidative stress in Parkinson's disease., *J Biol Chem.* 274 (1999) 34621–34628.
- [180] M. Matsuzaki, T. Hasegawa, A. Takeda, A. Kikuchi, K. Furukawa, Y. Kato, Y. Itoyama, Histochemical features of stress-induced aggregates in α -synuclein overexpressing cells, *Brain Res.* 1004 (2004) 83–90. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2004.01.017>.
- [181] Y. Liu, M. Qiang, Y. Wei, R. He, A novel molecular mechanism for nitrated α -synuclein-induced cell death, *J. Mol. Cell Biol.* 3 (2011) 239–249. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjr011>.
- [182] C.D. Borsarelli, L.J. Falomir-Lockhart, V. Ostatná, J.A. Fauerbach, H.H. Hsiao, H. Urlaub, E. Paleček, E.A. Jares-Erijman, T.M. Jovin, Biophysical properties and cellular toxicity of covalent crosslinked oligomers of α -synuclein formed by photoinduced side-chain tyrosyl radicals, *Free Radic. Biol. Med.* 53 (2012) 1004–1015. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.06.035>.
- [183] R.A.S. Ruf, E.A. Lutz, I.G. Zigoneanu, G.J. Pielak, α -Synuclein conformation affects its tyrosine-dependent oxidative aggregation, *Biochemistry.* 47 (2008) 13604–13609. <https://doi.org/10.1021/bi801884z>.
- [184] M.M. Wördehoff, H. Shaykhalishahi, L. Groß, L. Gremer, M. Stoldt, A.K. Buell, D. Willbold, W. Hoyer, Opposed Effects of Dityrosine Formation in Soluble and Aggregated α -Synuclein on Fibril Growth, *J. Mol. Biol.* 429 (2017) 3018–3030. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2017.09.005>.
- [185] O. Golfetto, E. Hinde, E. Gratton, The Laurdan Spectral Phasor Method to Explore Membrane Micro-heterogeneity and Lipid Domains in Live Cells, *Methods Membr. Lipids Second Ed.* 1232 (2014) 1–327. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1752-5>.
- [186] J.R. Lakowicz, Principles of fluorescence spectroscopy, 2006. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-46312-4>.
- [187] C. Xue, T.Y. Lin, D. Chang, Z. Guo, Thioflavin T as an amyloid dye: Fibril quantification, optimal concentration and effect on aggregation, *R. Soc. Open Sci.* 4 (2017). <https://doi.org/10.1098/rsos.160696>.
- [188] S. Tyanova, T. Temu, J. Cox, The MaxQuant computational platform for mass spectrometry-based shotgun proteomics, *Nat. Protoc.* 11 (2016) 2301–2319. <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.136>.
- [189] Z.L. Chen, J.M. Meng, Y. Cao, J.L. Yin, R.Q. Fang, S.B. Fan, C. Liu, W.F. Zeng, Y.H. Ding, D. Tan, L. Wu, W.J. Zhou, H. Chi, R.X. Sun, M.Q. Dong, S.M. He, A high-speed search engine pLink 2 with systematic evaluation for proteome-scale identification of cross-linked peptides, *Nat. Commun.* 10 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11337-z>.
- [190] B. Schilling, M.J. Rardin, B.X. MacLean, A.M. Zawadzka, B.E. Frewen, M.P. Cusack, D.J. Sorensen, M.S. Bereman, E. Jing, C.C. Wu, E. Verdin, C.R. Kahn, M.J. MacCoss, B.W. Gibson, Platform-independent and Label-free Quantitation of Proteomic Data Using MS1 Extracted Ion Chromatograms in Skyline, *Mol. Cell. Proteomics.* 11 (2012) 202–214.
- [191] M.Z. Tien, A.G. Meyer, D.K. Sydykova, S.J. Spielman, C.O. Wilke, Maximum allowed solvent accessibilities of residues in proteins, *PLoS One.* 8 (2013). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080635>.
- [192] E. Blasi, R. Barluzzi, V. Bocchini, R. Mazzolla, F. Bistoni, immortalization of murine microglial cells by a v-raf / v-myc carrying retrovirus, *J. Neuroimmunol.* 27 (1990) 229–237. [https://doi.org/10.1016/0165-5728\(90\)90073-V](https://doi.org/10.1016/0165-5728(90)90073-V).
- [193] R. Timmerman, S.M. Burm, J.J. Bajramovic, An overview of in vitro methods to study microglia, *Front. Cell. Neurosci.* 12 (2018) 1–12. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00242>.
- [194] J. Kovalevich, D. Langford, Considerations for the Use of SH-SY5Y Neuroblastoma Cells in Neurobiology, *Methods Mol Biol.* 1078 (2013) 9–21. <https://doi.org/10.1007/978-1-62703-640-5>.
- [195] H. Xicoy, B. Wieringa, G.J.M. Martens, The SH-SY5Y cell line in Parkinson's disease research: a systematic review, *Mol. Neurodegener.* (2017) 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13024-017-0149-0>.
- [196] J.C.M. Schlachetzki, S.W. Saliba, A.C.P. de Oliveira, Studying neurodegenerative diseases in culture models, *Rev. Bras. Psiquiatr.* 35 (2013) S92–S100. <https://doi.org/10.1590/1516-4446-2013-1159>.
- [197] S. Kamiloglu, G. Sari, T. Ozdal, E. Capanoglu, Guidelines for cell viability assays, *Food Front.* 1 (2020) 332–349. <https://doi.org/10.1002/fft2.44>.
- [198] M.J. Roberti, M. Morgan, G. Menéndez, L.I. Pietrasanta, T.M. Jovin, E.A. Jares-Erijman, Quantum Dots As Ultrasensitive Nanoactuators and Sensors of Amyloid Aggregation in Live Cells, *J Am Chem Soc.* 131 (2009) 8102–8107. <https://doi.org/10.1016/j.bbdis.2008.09.013>.

- [199] S. Mukherjee, E.A. Kapp, A. Lothian, A.M. Roberts, Y. V. Vasil'Ev, B.A. Boughton, K.J. Barnham, W.M. Kok, C.A. Hutton, C.L. Masters, A.I. Bush, J.S. Beckman, S.G. Dey, B.R. Roberts, Characterization and Identification of Dityrosine Cross-Linked Peptides Using Tandem Mass Spectrometry, *Anal. Chem.* 89 (2017) 6136–6145. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b00941>.
- [200] D.A. Fancy, T. Kodadek, Chemistry for the analysis of protein-protein interactions: Rapid and efficient cross-linking triggered by long wavelength light, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96 (1999) 6020–6024. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.11.6020>.
- [201] L. Herman, S. Ghosh, E. Defrancq, A.K. De Mesmaeker, Ru(II) complexes and light: Molecular tools for biomolecules, *J. Phys. Org. Chem.* 21 (2008) 670–681. <https://doi.org/10.1002/poc.1355>.
- [202] B.C. Gau, H. Chen, Y. Zhang, M.L. Gross, Sulfate radical anion as a new reagent for fast photochemical oxidation of proteins, *Anal. Chem.* 82 (2010) 7821–7827. <https://doi.org/10.1021/ac101760y>.
- [203] V. De Filippis, R. Frasson, A. Fontana, 3-Nitrotyrosine as a spectroscopic probe for investigating protein-protein interactions, *Protein Sci.* 15 (2006) 976–986. <https://doi.org/10.1110/ps.051957006>.
- [204] J.S. Crow, John P.; Beckman, Quantitation of Protein Tyrosine, 3-Nitrotyrosine, and 3-Aminotyrosine Utilizing HPLC and Intrinsic Ultraviolet Absorbance, *Methods.* 7 (1995) 116–120.
- [205] R.E. Giménez, V. Vargová, V. Rey, M.B.E. Turbay, I. Abatedaga, F.E. Morán Vieyra, V.I. Paz Zanini, J.H. Mecchia Ortiz, N.E. Katz, V. Ostatná, C.D. Borsarelli, Interaction of singlet oxygen with bovine serum albumin and the role of the protein nano-compartmentalization, *Free Radic. Biol. Med.* 94 (2016) 99–109. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.02.014>.
- [206] M.H. Gehlen, The centenary of the Stern-Volmer equation of fluorescence quenching: From the single line plot to the SV quenching map, *J. Photochem. Photobiol. C Photochem. Rev.* 42 (2020) 100338. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochemrev.2019.100338>.
- [207] M. Fontana, C. Blarzino, L. Pecci, Formation of 3-nitrotyrosine by riboflavin photosensitized oxidation of tyrosine in the presence of nitrite, *Amino Acids.* 42 (2012) 1857–1865. <https://doi.org/10.1007/s00726-011-0905-3>.
- [208] W.A. Prütz, H. Mönig, J. Butler, E.J. Land, Reactions of nitrogen dioxide in aqueous model systems: Oxidation of tyrosine units in peptides and proteins, *Arch. Biochem. Biophys.* 243 (1985) 125–134. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(85\)90780-5](https://doi.org/10.1016/0003-9861(85)90780-5).
- [209] C.M.H. Ferreira, I.S.S. Pinto, E. V. Soares, H.M.V.M. Soares, (Un)suitability of the use of pH buffers in biological, biochemical and environmental studies and their interaction with metal ions—a review, *RSC Adv.* 5 (2015) 30989–31003. <https://doi.org/10.1039/c4ra15453c>.
- [210] V. Brabec, J. Kasparkova, Ruthenium coordination compounds of biological and biomedical significance. DNA binding agents, *Coord. Chem. Rev.* 376 (2018) 75–94. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2018.07.012>.
- [211] A. Rilak Simović, R. Masnikosa, I. Bratsos, E. Alessio, Chemistry and reactivity of ruthenium(II) complexes: DNA/protein binding mode and anticancer activity are related to the complex structure, *Coord. Chem. Rev.* 398 (2019) 1–26. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2019.07.008>.
- [212] L.C.P. Gonçalves, H.R. Mansouri, E.L. Bastos, M. Abdellah, B.S. Fadiga, J. Sá, F. Rudroff, M.D. Mihovilovic, Morpholine-based buffers activate aerobic photobiocatalysis: Via spin correlated ion pair formation, *Catal. Sci. Technol.* 9 (2019) 1365–1371. <https://doi.org/10.1039/c8cy02524j>.
- [213] M. Khosravifarsani, A. Shabestani-Monfared, M. Pouramir, E. Zabihi, Hydroxyl Radical ($^{\circ}\text{OH}$) Scavenger Power of Tris (hydroxymethyl) Compared to Phosphate Buffer, *J. Mol. Biol. Res.* 6 (2016) 52. <https://doi.org/10.5539/jmbr.v6n1p52>.
- [214] M. Trujillo, R. Radi, Peroxynitrite reaction with the reduced and the oxidized forms of lipoic acid: New insights into the reaction of peroxynitrite with thiols, *Arch. Biochem. Biophys.* 397 (2002) 91–98. <https://doi.org/10.1006/abbi.2001.2619>.
- [215] J. Zhang, D.S. Kalonia, The effect of neighboring amino acid residues and solution environment on the oxidative stability of tyrosine in small peptides, *AAPS PharmSciTech.* 8 (2007). <https://doi.org/10.1208/pt0804102>.
- [216] A.H. Thomas, M.P. Serrano, V. Rahal, P. Vicendo, C. Claparols, E. Oliveros, C. Lorente, Tryptophan oxidation photosensitized by pterin, *Free Radic. Biol. Med.* 63 (2013) 467–475. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.05.044>.
- [217] B. Alvarez, H. Rubbo, M. Kirk, S. Barnes, B.A. Freeman, R. Radi, Peroxynitrite-dependent tryptophan nitration, *Chem. Res. Toxicol.* 9 (1996) 390–396. <https://doi.org/10.1021/tx950133b>.
- [218] T. Nuriel, A. Hansler, S.S. Gross, Protein nitrotryptophan: Formation, significance and identification, *J. Proteomics.* 74 (2011) 2300–2312. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.05.032>.
- [219] G.W. Preston, A.J. Wilson, Photo-induced covalent cross-linking for the analysis of biomolecular interactions, *Chem. Soc. Rev.* 42 (2013) 3289–3301. <https://doi.org/10.1039/c3cs35459h>.
- [220] R. Radi, Protein tyrosine nitration: Biochemical mechanisms and structural basis of functional effects, *Acc. Chem. Res.* 46 (2013) 550–559. <https://doi.org/10.1021/ar300234c>.
- [221] J.M. Souza, E. Daikhin, M. Yudkoff, C.S. Raman, H. Ischiropoulos, Factors determining the selectivity of protein tyrosine nitration, *Arch. Biochem. Biophys.* 371 (1999) 169–178. <https://doi.org/10.1006/abbi.1999.1480>.
- [222] C.C. BLAKE, F. KOENIG, D.C.P. & V.R.S. D. F. G. A. MAIR, A. C. T. NORTH, Structure of Hen Egg White Lysozyme: A Three-dimensional Fourier Synthesis at 2 Å Resolution, *Nat. Publ. Gr.* (1965) 757–761.
- [223] C.O. Silva, S.B. Petersen, C. Pinto Reis, P. Rijo, J. Molpeceres, H. Vorum, M.T. Neves-Petersen, Lysozyme photochemistry as a function of temperature. the protective effect of nanoparticles on lysozyme photostability, *PLoS One.* 10 (2015) 1–29. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144454>.
- [224] E.D. Savina, Y.P. Tsentlovich, P.S. Sherin, UV-A induced damage to lysozyme via Type I photochemical reactions sensitized by kynurenic acid, *Free Radic. Biol. Med.* (2019) 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.11.017>.

- [225] I. Ferrer, E. Silva, Study of a photo-induced lysozyme-riboflavin bond, (1985) 63–70.
- [226] F. Yamakura, K. Ikeda, T. Matsumoto, H. Taka, N. Kaga, Formation of 6-nitrotryptophan in purified proteins by reactive nitrogen species: A possible new biomarker, *Int. Congr. Ser.* 1304 (2007) 22–32. <https://doi.org/10.1016/j.ics.2007.07.045>.
- [227] P.G. Richards, D.J. Walton, J. Heptinstall, The effects of tyrosine nitration on the structure and function of hen egg-white lysozyme, *Biochem. J.* 315 (1996) 473–479. <https://doi.org/10.1042/bj3150473>.
- [228] S.M. Vaz, F.M. Prado, P. Di Mascio, O. Augusto, Oxidation and nitration of ribonuclease and lysozyme by peroxynitrite and myeloperoxidase, *Arch. Biochem. Biophys.* 484 (2009) 127–133. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2008.12.017>.
- [229] C.C. Blake, L.N. Johnson, G.A. Mair, A.C. North, D.C. Phillips, V.R. Sarma, Crystallographic studies of the activity of hen egg-white lysozyme., *Proc. R. Soc. London. Ser. B. Biol. Sci.* 167 (1967) 378–388. <https://doi.org/10.1098/rspb.1967.0035>.
- [230] A.M. Gajda, J. Storch, Enterocyte fatty acid-binding proteins (FABPs): Different functions of liver and intestinal FABPs in the intestine, *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids.* 93 (2015) 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2014.10.001>.
- [231] J.C. Sacchettini, J.I. Gordon, L.J. Banaszak, Refined apoprotein structure of rat intestinal fatty acid binding protein produced in *Escherichia coli*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86 (1989) 7736–7740. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.20.7736>.
- [232] L.J. Falomir-Lockhart, L. Laborde, P.C. Kahn, J. Storch, B. Córscico, Protein-membrane interaction and fatty acid transfer from intestinal fatty acid-binding protein to membranes: Support for a multistep process, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 13979–13989. <https://doi.org/10.1074/jbc.M511943200>.
- [233] T. Koeck, B. Willard, J.W. Crabb, M. Kinter, D.J. Stuehr, K.S. Aulak, Glucose-mediated tyrosine nitration in adipocytes: Targets and consequences, *Free Radic. Biol. Med.* 46 (2009) 884–892. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.12.010>.
- [234] L. Banaszak, N. Winter, Z. Xu, D.A. Bernlohr, S. Cowan, T.A. Jones, Lipid-binding proteins: A family of fatty acid and retinoid transport proteins, *Adv. Protein Chem.* 45 (1994) 89–151.
- [235] K. Świderek, A. Panczakiewicz, A. Bujacz, G. Bujacz, P. Paneth, Modeling of isotope effects on binding oxamate to lactic dehydrogenase, *J. Phys. Chem. B.* 113 (2009) 12782–12789. <https://doi.org/10.1021/jp903579x>.
- [236] T. Hitosugi, J. Chen, Post-translational modifications and the Warburg effect, *Oncogene.* 33 (2014) 4279–4285. <https://doi.org/10.1038/onc.2013.406>.
- [237] A. Castegna, V. Thongboonkerd, J.B. Klein, B. Lynn, W.R. Markesbery, D.A. Butterfield, Proteomic identification of nitrated proteins in Alzheimer's disease brain, *J. Neurochem.* 85 (2003) 1394–1401. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.01786.x>.
- [238] H. Kawasaki, K. Ikeda, A. Shigenaga, T. Baba, K. Takamori, H. Ogawa, F. Yamakura, Mass spectrometric identification of tryptophan nitration sites on proteins in peroxynitrite-treated lysates from PC12 cells, *Free Radic. Biol. Med.* 50 (2011) 419–427. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.10.688>.
- [239] H. Ischiropoulos, Biological selectivity and functional aspects of protein tyrosine nitration, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 305 (2003) 776–783. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(03\)00814-3](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(03)00814-3).
- [240] V. Bunik, A. Artiukhov, V. Aleshin, G. Mkrtchyan, Multiple forms of glutamate dehydrogenase in animals: Structural determinants and physiological implications, *Biology (Basel).* 5 (2016). <https://doi.org/10.3390/biology5040053>.
- [241] A. Merk, A. Bartesaghi, S. Banerjee, V. Falconieri, P. Rao, M.I. Davis, R. Pragani, M.B. Boxer, L.A. Earl, J.L.S. Milne, S. Subramaniam, Breaking Cryo-EM Resolution Barriers to Facilitate Drug Discovery, *Cell.* 165 (2016) 1698–1707. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.040>.
- [242] A. Herrero-Yraola, S.M.A. Bakhit, P. Franke, C. Weise, M. Schweiger, D. Jorcke, M. Ziegler, Regulation of glutamate dehydrogenase by reversible ADP-ribosylation in mitochondria, *EMBO J.* 20 (2001) 2404–2412. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.10.2404>.
- [243] R. Moreno-Sánchez, Á. Marín-Hernández, J.C. Gallardo-Pérez, S.C. Pacheco-Velázquez, D.X. Robledo-Cadena, J.A. Padilla-Flores, E. Saavedra, S. Rodríguez-Enríquez, Physiological Role of Glutamate Dehydrogenase in Cancer Cells, *Front. Oncol.* 10 (2020) 1–15. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00429>.
- [244] J. Baeza, M.J. Smallegan, J.M. Denu, Mechanisms and Dynamics of Protein Acetylation in Mitochondria, *Trends Biochem. Sci.* 41 (2016) 231–244. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2015.12.006>.
- [245] D. Piszkiwicz, M. Landon, E.L. Smith, Bovine Glutamate Dehydrogenase, *J. Biol. Chem.* 246 (1971) 1324–1329. <http://www.jbc.org/content/257/10/5579.full.pdf>.
- [246] P.E. Peterson, T.J. Smith, The structure of bovine glutamate dehydrogenase provides insights into the mechanism of allostery, *Structure.* 7 (1999) 769–782. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(99\)80101-4](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(99)80101-4).
- [247] B.L. Boys, M.C. Kuprowski, J.J. Noël, L. Konermann, Protein oxidative modifications during electrospray ionization: Solution phase electrochemistry or corona discharge-induced radical attack?, *Anal. Chem.* 81 (2009) 4027–4034. <https://doi.org/10.1021/ac900243p>.
- [248] V. Rey, I. Abatedaga, C. Vera, F.E.M. Vieyra, C.D. Borsarelli, Photosensitized Formation of Soluble Bionanoparticles of Lysozyme, *ChemistrySelect.* 6 (2021) 13443–13451. <https://doi.org/10.1002/slct.202103215>.
- [249] E. Fuentes-Lemus, M. Mariotti, P. Hägglund, F. Leinisch, A. Fierro, E. Silva, C. López-Alarcón, M.J. Davies, Binding of rose bengal to lysozyme modulates photooxidation and cross-linking reactions involving tyrosine and tryptophan., *Free Radic. Biol. Med.* 143 (2019) 375–386. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.08.023>.
- [250] G.E. Gómez, J.L.E. Monti, M.R. Mundo, J.M. Delfino, Solvent Mimicry with Methylene Carbene to Probe Protein Topography, *Anal. Chem.* 87 (2015) 10080–10087. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b02724>.
- [251] L.O. Reid, C. Castaño, M.L. Dántola, V. Lhiaubet-Vallet, M.A. Miranda, M. Luisa Marin, A.H. Thomas, A novel synthetic approach to tyrosine dimers based on pterin photosensitization, *Dye. Pigment.* 147 (2017) 67–74.

- <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2017.07.058>.
- [252] D.A. Malencik, J.F. Sprouse, C.A. Swanson, S.R. Anderson, Dityrosine : Preparation , Isolation , and Analysis 1, 213 (1996) 202–213.
- [253] G.S. Bayse, A.W. Michaels, M. Morrison, Lactoperoxidase-catalyzed iodination of tyrosine peptides, *Biochim. Biophys. Acta.* 284 (1972) 30–33.
- [254] D.M. Kuhn, C.W. Aretha, T.J. Geddes, Peroxynitrite inactivation of tyrosine hydroxylase: Mediation by sulfhydryl oxidation, not tyrosine nitration, *J. Neurosci.* 19 (1999) 10289–10294. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.19-23-10289.1999>.
- [255] D.L. Abeyawardhane, R.D. Fernández, D.R. Heitger, M.K. Crozier, J.C. Wolver, H.R. Lucas, Copper Induced Radical Dimerization of α -Synuclein Requires Histidine, *J. Am. Chem. Soc.* 140 (2018) 17086–17094. <https://doi.org/10.1021/jacs.8b08947>.
- [256] H. Li, Z. Yang, Z. Gao, Protein tyrosine nitration: Chemistry and role in diseases, 1st ed., Elsevier B.V., 2020. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64293-6.00004-X>.
- [257] M. Leitgeb, Ž. Knez, M. Primožič, Sustainable technologies for liposome preparation, *J. Supercrit. Fluids.* 165 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2020.104984>.
- [258] M. Danaei, M. Dehghankhold, S. Ataei, F. Hasanzadeh Davarani, R. Javanmard, A. Dokhani, S. Khorasani, M.R. Mozafari, Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems, *Pharmaceutics.* 10 (2018) 1–17. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10020057>.
- [259] V. V. Shvadchak, D.A. Yushchenko, R. Pievo, T.M. Jovin, The mode of α -synuclein binding to membranes depends on lipid composition and lipid to protein ratio, *FEBS Lett.* 585 (2011) 3513–3519. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.10.006>.
- [260] J. Burré, M. Sharma, T. Tsetsenis, V. Buchman, M.R. Etherton, T.C. Südhof, Alpha-synuclein promotes SNARE-complex assembly in vivo and in vitro., *Science.* 329 (2010) 1663–7. <https://doi.org/10.1126/science.1195227>.
- [261] X. Lou, J. Kim, B.J. Hawk, Y.K. Shin, α -Synuclein may cross-bridge v-SNARE and acidic phospholipids to facilitate SNARE-dependent vesicle docking, *Biochem. J.* 474 (2017) 2039–2049. <https://doi.org/10.1042/BCJ20170200>.
- [262] E.R. Georgieva, T.F. Ramlall, P.P. Borbat, J.H. Freed, D. Eliezer, The lipid-binding domain of wild type and mutant α -synuclein: Compactness and interconversion between the broken and extended helix forms, *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 28261–28274. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.157214>.
- [263] G. Fusco, T. Pape, A.D. Stephens, P. Mahou, A.R. Costa, C.F. Kaminski, G.S. Kaminski Schierle, M. Vendruscolo, G. Veglia, C.M. Dobson, A. De Simone, Structural basis of synaptic vesicle assembly promoted by α -synuclein, *Nat. Commun.* 7 (2016) 1–11. <https://doi.org/10.1038/ncomms12563>.
- [264] D. Meisel, M.S. Matheson, J. Rabani, Photolytic and Radiolytic Studies of Ru(bpy)₃²⁺ in Micellar Solutions, *J. Am. Chem. Soc.* 100 (1978) 117.
- [265] E.L. Sciuto, M.F. Santangelo, G. Villaggio, F. Sinatra, C. Bongiorno, G. Nicotra, S. Libertino, Photo-physical characterization of fluorophore Ru(bpy)₃²⁺ for optical biosensing applications, *Sens. Bio-Sensing Res.* 6 (2015) 67–71. <https://doi.org/10.1016/j.sbsr.2015.09.003>.
- [266] A. Jain, W. Xu, J.N. Demas, B.A. DeGraff, Binding of Luminescent Ruthenium(II) Molecular Probes to Vesicles, *Inorg. Chem.* 37 (1998) 1876–1879. <https://doi.org/10.1021/ic971043s>.
- [267] E. Rajkumar, P.M. Mareeswaran, S. Rajagopal, Photophysical properties of amphiphilic ruthenium(II) complexes in micelles, *Photochem. Photobiol. Sci.* 13 (2014) 1261–1269. <https://doi.org/10.1039/c4pp00043a>.
- [268] C.E.H. Moussa, C. Wersinger, M. Rusnak, Y. Tomita, A. Sidhu, Abnormal migration of human wild-type α -synuclein upon gel electrophoresis, *Neurosci. Lett.* 371 (2004) 239–243. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2004.09.004>.
- [269] S. Verzini, M. Shah, F.X. Theillet, A. Belsom, J. Bieschke, E.E. Wanker, J. Rappsilber, A. Binolfi, P. Selenko, Megadalton-sized Dityrosine Aggregates of α -Synuclein Retain High Degrees of Structural Disorder and Internal Dynamics, *J. Mol. Biol.* 432 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2020.10.023>.
- [270] C. Fecchio, G. De Franceschi, A. Relini, E. Greggio, M. Dalla Serra, L. Bubacco, P. Polverino De Laureto, α -Synuclein Oligomers Induced By Docosahexaenoic Acid Affect Membrane Integrity, *PLoS One.* 8 (2013). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082732>.
- [271] H. Tominaga, M. Ishiyama, F. Ohseto, K. Sasamoto, T. Hamamoto, K. Suzuki, M. Watanabe, A water-soluble tetrazolium salt useful for colorimetric cell viability assay, *Anal. Commun.* 36 (1999) 47–50. <https://doi.org/10.1039/a809656b>.
- [272] V. Sanchez-Guajardo, N. Tentillier, M. Romero-Ramos, The relation between α -synuclein and microglia in Parkinson's disease: Recent developments, *Neuroscience.* 302 (2015) 47–58. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.02.008>.
- [273] J.I. Forster, S. Köglberger, C. Trefois, O. Boyd, A.S. Baumuratov, L. Buck, R. Balling, P.M.A. Antony, Characterization of differentiated SH-SY5Y as neuronal screening model reveals increased oxidative vulnerability, *J. Biomol. Screen.* 21 (2016) 496–509. <https://doi.org/10.1177/1087057115625190>.