



**Universitat de les
Illes Balears**

Facultat de Ciències

Memòria del Treball de Fi de Grau

Estudio de las interacciones entre la sinucleína modificada químicamente y algunos cationes metálicos

Bilal El Morabit El Morabit

Grau de Química

Any acadèmic 2018-19

Treball tutelat per Dr. Bartolomé Vilanova Canet
Departament de Química

S'autoritza la Universitat a incloure aquest treball en el Repositori Institucional per a la seva consulta en accés obert i difusió en línia, amb finalitats exclusivament acadèmiques i d'investigació	Autor		Tutor	
	Sí	No	Sí	No
	X		X	

Paraules clau del treball:

α Sinucleína, Modificaciones postraduccionales (MPTs), cationes metálicos, formación de fibras, espectroscopia de fluorescencia, ITC.

Índice

Resumen	4
1. Introducción	5
1.1. <i>Función y estructura de la α-sinucleína</i>	5
1.2. <i>Proceso de agregación y formación de fibras</i>	6
1.3. <i>Capacidad de la α-sinucleína para unirse a cationes metálicos</i>	7
1.4. <i>Modificaciones postraduccionales (MPTs) de la α-sinucleína</i>	8
1.4.1. Glicación de residuos lisina	8
1.4.2. Oxidación de residuos metionina	9
2. Objetivo	10
3. Metodología y material	10
3.1. <i>Reactivos</i>	10
3.2. <i>Procedimientos y técnicas experimentales</i>	11
3.2.1. Preparación de disoluciones	11
3.2.2. Medidas de fluorescencia	12
3.2.2.1. Interacción entre la α -sinucleína y diferentes cationes metálicos	12
3.2.2.2. Estudio de la formación de fibras en presencia de cationes metálicos	12
3.2.3. Experimentos de calorimetría de valoración isotérmica (ITC)	13
3.2.4. Experimentos de dispersión dinámica de luz (DLS)	14
3.3. <i>Tratamiento matemático de los resultados experimentales</i>	14
3.3.1. Determinación de las constantes de unión mediante fluorescencia	14
3.3.2. Seguimiento de la formación de fibras.	15
3.3.3. Determinación de las constantes de unión mediante ITC	16
3.3.4. Análisis de los resultados obtenidos por DLS	16
4. Resultados y discusión	16
4.1. <i>Determinación de las constantes de unión mediante fluorescencia</i>	16
4.2. <i>Determinación de las constantes de unión mediante ITC</i>	21
4.3. <i>Formación de fibras de la αSin nativa en presencia de Al(III), Cu(II) y Fe(III).</i>	23
4.4. <i>Formación de fibras de la αSin CEL en presencia de Al(III), Cu(II) y Fe(III).</i>	24
4.5. <i>Formación de fibras de la αSin Oxidada en presencia de Al(III), Cu(II) y Fe(III).</i>	25
4.6. <i>Detección de agregados proteicos para la αSin CEL y Oxidada en presencia de Al(III).</i>	26
5. Conclusiones	28
6. Bibliografía	29

Resumen

La enfermedad de Parkinson (EP) está considerada como la segunda enfermedad neurodegenerativa más frecuente, después del Alzheimer. La EP es una enfermedad progresiva del sistema nervioso que afecta al movimiento y afectar al 1% de las personas mayores de 60 años. Los síntomas de la EP incluyen rigidez muscular, temblores y cambios en el habla. En España, la EP afecta aproximadamente a unas 150.000 personas y se suelen detectar unos 10.000 nuevos casos anualmente, según la Sociedad Española de Neurología (SEN). Este mismo organismo estima que el número de afectados se duplicará en 20 años y llegará a triplicarse para el 2050 [Benito León, 2018].

La α -sinucleína (α Sin) es una proteína de gran interés para los investigadores de la enfermedad del Parkinson porque es un componente importante de los cuerpos de Lewy que son el sello patológico de la EP. Aunque muchos estudios relacionan a la α Sin con la EP, a día de hoy se desconoce el mecanismo de actuación y la función de la α Sin en la EP.

Adicionalmente, la exposición ocupacional a ciertos metales parece ser un factor de riesgo para la EP. Estudios *in vitro* demuestran que la presencia de cationes metálicos puede inducir cambios estructurales en la α Sin y acelerar su agregación. La actividad redox de los cationes metálicos conduce a la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), lo que hace aumentar los efectos nocivos de la α Sin en la EP. Por otra parte, la estructura y la función de la α Sin también pueden ser alteradas por modificaciones postraduccionales (MPTs) como son la oxidación, fosforilación, nitración, glicación y la N-acetilación.

En este trabajo se ha estudiado la interacción que se establece entre la α Sin, en su forma nativa y algunas de sus MPTs, con algunos cationes metálicos relevantes a nivel biológico. En la primera parte de este trabajo final de grado (TFG), se determinan las constantes de unión proteína-metal mediante dos técnicas diferentes: espectroscopia de fluorescencia y calorimetría de titración isotérmica (ITC). Los valores de las constantes de asociación obtenidos indican una menor capacidad de unión entre las diferentes MPTs y los cationes metálicos analizados en este TFG.

En segundo lugar, se ha analizado como la presencia de ciertos cationes metálicos puede alterar la formación de fibras de la α Sin en su forma nativa, en su forma glicada y en su forma oxidada. Se ha comprobado que la presencia de Al(III) favorece la formación de fibras en la α Sin nativa. En cambio, la formación de fibras en las MPTs analizadas en este trabajo no se ven afectadas por la presencia de cationes metálicos.

1. Introducción

1.1. Función y estructura de la α -sinucleína

La α -sinucleína (α Sin) es una proteína pequeña (14 kDa) que pertenece a la familia de las proteínas intrínsecamente desordenadas. Se encuentra principalmente en los terminales nerviosos presinápticos del cerebro, aunque también se ha detectado en cantidades más pequeñas en el corazón, los músculos y otros tejidos. La función concreta de la α Sin no se conoce con exactitud, aunque su presencia en las terminaciones nerviosas apunta que podría participar en la síntesis de neurotransmisores y en el mantenimiento de vesículas sinápticas [McCann, 2014].

En los últimos años se ha asociado a la α Sin como un regulador principal de la enfermedad de Parkinson (EP), por las siguientes evidencias experimentales: a) se han observado diversos puntos de mutación de la α Sin (por ejemplo, A30P, E46K y A53T, entre otros) que aceleran la enfermedad de Parkinson y b) los cuerpos de Lewis y neuritos de Lewis, lesiones características de la EP, están compuestos por fibras de α Sin [Burre, 2012]. Así pues, la α Sin es una proteína de gran interés biológico ya que es considerada un marcador de la enfermedad del Parkinson.

La α Sin es una proteína de 140 aminoácidos (**Figura 1**) que se pueden agrupar en tres regiones: la región N-terminal que consta de 60 residuos que contienen cuatro repeticiones imperfectas de 11 aminoácidos con un motivo hexamérico de KTKE(G)V, con propensión a adoptar una estructura helicoidal; una región central hidrofóbica conocida como componente no amiloideo (NAC) que va del residuo 61 al 95 de carácter hidrofóbico y esenciales en el proceso de agregación y de interacción con membranas biológicas; y la región C-terminal (residuos 96-140), rica en residuos ácidos y prolinas, y que contiene tres residuos de tirosina conservados [Plotegher, 2014].

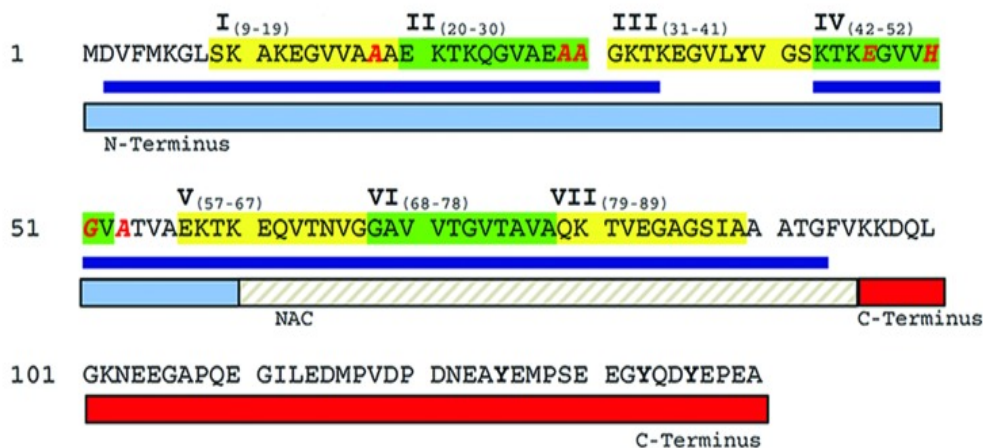


Figura 1. Secuencia primaria de la α Sin y su organización. Siete repeticiones imperfectas de 11 residuos están resaltadas y designadas con números romanos. Las regiones que adoptan conformación helicoidal en presencia de micelas están subrayadas en azul. Los sitios de mutación que se conocen, o que se cree que causan la EP, se indican con letras rojas [Burre, 2012].

Aunque la α Sin es una proteína desordenada en disolución acuosa, en 2011 Bartels y *col.*, y Wang y *col.* sugirieron que podía adoptar una estructura tetramérica cuando ésta se une a membranas o vesículas con fosfolípidos [Bartels, 2011]. Esta estructura se forma por uniones ditirosínicas entre las diferentes cadenas. Actualmente está aceptado que la α Sin intracelular es monomérica, adoptando una conformación colapsada alrededor del centro hidrofóbico (NAC) [Theillet, 2016], y en algunos casos, puede adoptar una estructura definida tras su unión a otras macromoléculas. La ausencia de orden en la α Sin se debe principalmente a la elevada carga que provoca una repulsión electrostática importante, y a su baja hidrofobicidad. La ausencia de orden en la α Sin no es total, ya que según la unión que establezca con otras macromoléculas adoptará una conformación o estructura secundaria que afectará a su funcionalidad. [Wang, 2011].

1.2. Proceso de agregación y formación de fibras

Como se ha mencionado anteriormente, las fibras de α Sin son los mayores componentes de los cuerpos de Lewy, sello intraneuronal de la EP. La formación de los agregados de α Sin se inicia a partir del monómero, el cual puede sufrir cambios conformacionales que dan lugar a especies intermedias parcialmente plegadas [Kumar, 2007]. Las especies actúan como moldes para el ensamblaje de otros monómeros, formando oligómeros solubles. Posteriormente, como se puede observar en la **Figura 2**, dichos oligómeros sufren un crecimiento que tiene como resultado la formación final de fibras amiloideas, pudiendo ser éstas de diferente morfología.

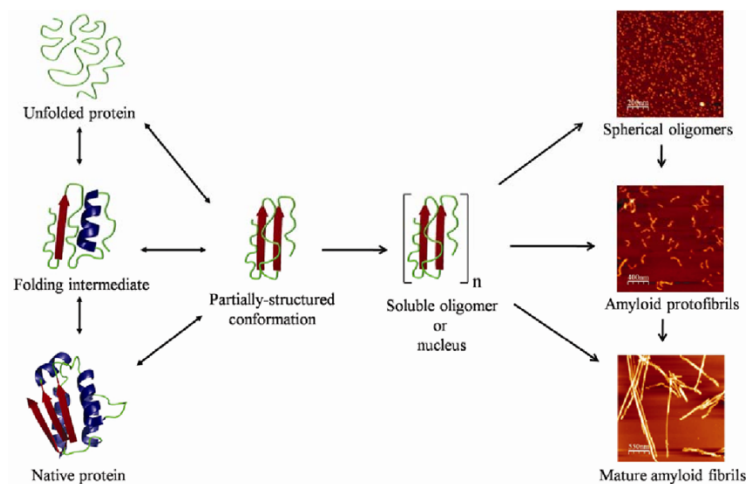


Figura 2. Modelo de fibrilación de α Syn [Kumar, 2007]

Estudios de difracción de rayos X de las fibras de α Sin muestran un patrón estructural característico que consiste en la formación de láminas β colocadas perpendiculares al eje longitudinal de la fibra. [Serpell, 2000]. El dominio de la lámina β está formado por 12 aminoácidos ($V^{71}TGVTAVAQTV^{86}$) del dominio central NAC y dicha organización implica un incremento de la hidrofobicidad de la estructura.

Las mutaciones A30P y E46K en la α Sin son las que esencialmente inducen el desarrollo de la EP, acelerando la formación de oligómeros y fibras [Ono, 2011]. Otros factores endógenos y exógenos como la exposición a metales, pesticidas, modificaciones postraduccionales (MPTs) e interacciones proteína-proteína [Deleersnijder, 2013] también facilita la formación de agregados proteicos.

1.3. Capacidad de la α -sinucleína para unirse a cationes metálicos

Según estudios epidemiológicos realizados por Rybicki y *col.*, la exposición ocupacional a metales como aluminio, cobre, hierro, manganeso, mercurio, plomo o zinc es un factor de riesgo para la enfermedad de Parkinson [Rybicki, 1993]. Se ha demostrado que la modificación de la concentración de estos cationes metálicos en el organismo induce disfunciones neuronales. Además, estudios post-mortem en pacientes con la EP han revelado una concentración anómala de Fe(III), Zn(II), Mg(II), Pb(II), Mn(II) y Al(III) en el cerebro [Breydo, 2012] y de Cu(II) en el fluido cerebroespinal [Pall, 1987].

El efecto de los metales en la fibrilación de la α Sin está determinado por las propiedades químico físicas de su unión. Por esta razón, es importante conocer: a) los sitios de anclaje de la α Sin con los cationes metálicos; b) las características geométricas de los complejos que se formen; c) sus constantes de asociación; y d) el efecto de dicha unión sobre la estructura conformacional de la α Sin.

El Cu(II) es uno de los cationes más estudiados. Se han identificado tres zonas de unión del Cu(II) en la proteína. Una primera zona de alta afinidad en la sección N-terminal entre los residuos 1-5 ($K_d \approx 0,1 - 1\mu\text{M}$); un segundo sitio de baja afinidad cercano a la His50 ($K_d \approx 1\text{mM}$) y un tercer sitio, también de baja afinidad, en la región C-terminal (residuos 116 y 127), con un valor de $K_d > 1\text{mM}$ [Rasia, 2005]. También se han realizado estudios con el Cu(I), ya que es la forma predominante del cobre en los ambientes reductores de las células. A partir de estudios realizados con Ag(I) (electrónicamente equivalente al Cu(I)) se determinó que la α Sin presenta dos sitios de unión, que abarca las regiones 1-5 y 116-127. La afinidad en este caso es mayor, con valores de K_d del orden de micromolar [Camponeschi, 2013].

Mediante estudios de RMN se ha comprobado que el Fe (II) se une a la α Sin en la región C terminal, concretamente en los residuos Asp-121, Asn-122 y Glu-123, como lo hacen otros metales divalentes [Binolfi, 2006]. Mediante la combinación de ESI-MS y voltametría cíclica, se determinó que la constante de unión con Fe (III) era de $1,2 \cdot 10^{13}\text{M}^{-1}$ [Sun, 2012]. En este mismo estudio, se demostró una baja afinidad para el Mn(II), en el rango de 1mM con los mismos residuos peptídicos que el Fe(II).

Un trabajo reciente sugiere que, en la célula, la α Sin se encuentra acetilada en la posición N terminal [Fauvet, 2012]. Esta modificación altera la capacidad de unión de la α Sin a los cationes metálicos. Por ejemplo, bloquea el anclaje del nitrógeno α -amino de la Met1 al catión Cu(II) e impide la formación del complejo. Estudios recientes realizados por Ramis y *col.* en los que se ha utilizado la Teoría del Funcional de la Densidad (DFT) indican que el Al(III) y el Cu(II) forman complejos tetracoordinados de gran estabilidad con la forma acetilada de la α Sin con los residuos 49-50 y 119-123. Con el aluminio se forma un complejo tetraédrico mientras que con el Cu(II) se forma un complejo plano cuadrado distorsionado [Ramis, 2017].

1.4. Modificaciones postraduccionales (MPTs) de la α -sinucleína

En general, las MPTs son modificaciones químicas que se dan sobre las proteínas una vez han sido sintetizadas. Las MPTs implican la adición covalente de un grupo funcional sobre un sitio específico de la proteína, cambio que puede alterar su estructura y funcionalidad. Se han detectado diversas modificaciones postraduccionales en los depósitos insolubles de α Sin aislados de personas que fallecieron debido a la EP que son de carácter no enzimático y aparecen debido al incremento del estrés oxidativo. Estas modificaciones incluyen la nitración de tirosinas, la oxidación de metioninas y la glicación de lisinas [Sun,2012]. Por lo cual, el estudio de las MPTs en la α Sin es de suma importancia en la comprensión de los mecanismos moleculares que inducen al desarrollo del EP.

Las MPTs modifican las propiedades de la α Sin, como por ejemplo su afinidad a los cationes metálicos. Se ha comprobado que tras la fosforilación en el extremo C-terminal de los residuos Ser-129 o Tyr-125 se altera la afinidad de unión a los metales. Tras la fosforilación en las posiciones de unión, la α Sin aumenta su afinidad de unión por el Cu(II), Pb(II) y Fe(II), pero no por el Fe(III) [Anderson, 2006].

En este trabajo, se han estudiado dos de las MPTs que se dan *in vivo* en la α Sin como son la glicación de los residuos lisina y la oxidación de grupos metionina, y se comentan de forma resumida en el apartado siguiente.

1.4.1. Glicación de residuos lisina

La glicación es un proceso no catalítico que consiste en la condensación de los grupos amino libre de las proteínas con grupos carbonilo de azúcares reductores para dar lugar a una base de Schiff que, posteriormente, se reordena a una cetoamina o compuesto de Amadori (**Figura 3**). Las bases de Schiff y los compuestos de Amadori pueden sufrir procesos de oxidación, deshidratación y fragmentación generando compuestos carbonílicos y dicarbonílicos reactivos (RCS), así como compuestos reactivos de oxígeno (ROS) que aceleran la glicación. En la etapa final, la evolución del compuesto de Amadori y la acción de los RCS y ROS sobre las cadenas laterales proteicas (p.e. lisinas, argininas y cisteínas) conduce a la formación de los AGEs (Advanced Glycation End Products), compuestos que se acumulan sobre las proteínas de larga vida media y causan enormes daños en su función y estructura [Salahuddins, 2014]. Los AGE se acumulan a lo largo de la vida de una proteína, y el aumento de los niveles de productos de reacción de glicación desempeña un papel importante en las complicaciones diabéticas. Estudios recientes sugieren que la diabetes aumenta el riesgo a desarrollar la EP en un 23% [Sun, 2012], dato que corrobora que la glicación está directamente relacionada con la EP.

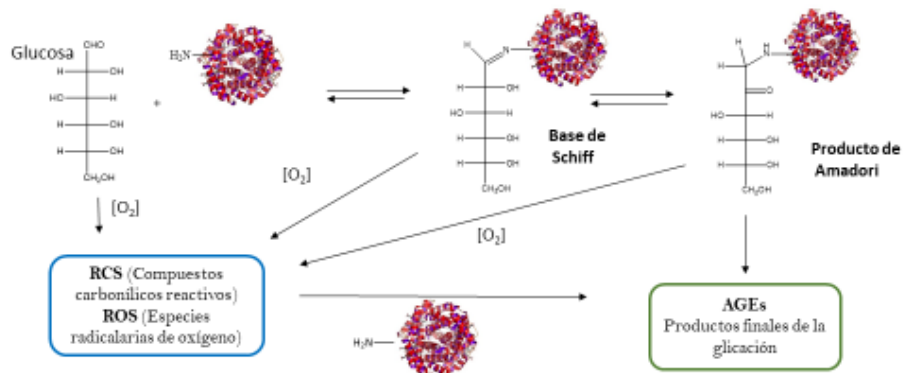


Figura 3. Etapas en la reacción de glicación proteica.

Por otra parte, el compuesto intermedio de Amadori se reorganiza y se descompone generando compuestos carbonílicos y dicarbonílicos que pueden adicionarse a residuos proteicos y formar AGEs de diferente estructura química.

La α Sin posee 15 residuos lisina en su secuencia primaria susceptibles de ser glicosados [Yang, 2017]: a) 11 en la zona N terminal -K6, K10, K12, K21, K23, K32, K34, K43, K45, K58 y K60-; b) 1 en la NAC -K80- ; y c) 3 en la zona C terminal -K96, K97 y K102-. Los AGEs caracterizados *in vivo* sobre la α Sin son escasos. Castellani *et al.* detectaron que la pentosidina y la pirralina se acumulan en la sustancia negra del cerebro de pacientes con la EP [Castellani, 1996]. Otro estudio indicó que la N- ϵ -carboximetilisina (CML) se localizaba en los cuerpos de Lewy de pacientes con Parkinson [28]; mientras que otros autores mostraron la formación de los AGEs N- ϵ -carbometilisina (CML) y N- ϵ -carboxietilisina (CEL) en ratones infectados por compuestos neurotóxicos [Shults, 2006].

1.4.2. Oxidación de residuos metionina

Los cationes metálicos están presentes en pequeñas cantidades en los seres vivos. Sin embargo, la exposición crónica a niveles elevados de diferentes metales puede tener efectos perjudiciales en la salud y puede provocar diferentes patologías.

Por otra parte, los cationes metálicos son capaces de catalizar la oxidación de ciertos aminoácidos presentes en la α Sin. Todos los aminoácidos son susceptibles a la oxidación, aunque sus reactividades varían mucho [Stadtman, 2006]. La metionina y la cisteína son los aminoácidos más fáciles de oxidar y son los únicos en que los productos de la oxidación pueden, en algunas circunstancias, reducirse a los residuos de aminoácidos nativos. La α Sin al no presentar residuos cisteína en su estructura, sufrirá únicamente la oxidación de los residuos metionina. Los residuos metionina se oxidan fácilmente a sulfóxido de metionina (MetO) por H₂O₂, hipoclorito, cloraminas y peroxinitrito (todos estos oxidantes son producidos en sistemas biológicos). Algunos estudios han demostrado la existencia de agregados de α Sin en pacientes de EP que presentan sus metioninas oxidadas (M1, M5, M116 y M127), proceso que disminuye la tendencia de la α Sin a formar fibras [Ponzini, 2019].

2. Objetivo

Dada la importancia que tiene la formación de complejos entre la α Sin y ciertos cationes metálicos en el organismo, en este trabajo se estudiará la interacción que se establece entre la α Sin y algunos cationes metálicos. Concretamente, se analizará la afinidad de unión de cationes metálicos con: a) la α Sin en su forma nativa; b) la α Sin en su forma glicada, con todos los residuos lisina en forma de N- ϵ -carboxietilisina (AGE localizado en los cuerpos de Lewy de pacientes con Parkinson); y c) la α Sin oxidada, con los residuos metionina (M1, M5, M116 y M127) oxidados a sulfóxido de metionina.

Para analizar el efecto de las MPTs de la α Sin sobre su afinidad de unión a cationes metálicos, en este trabajo se han seleccionado los siguientes cationes metálicos: Cu(II), Fe(III) y Al(III).

Los objetivos parciales que se plantean en este trabajo son los siguientes:

- Determinación de las constantes de unión, mediante fluorescencia, de la forma nativa, glicada y oxidada de la α -Sinucleína con cationes metálicos
- Determinación de las constantes de unión, mediante Calorimetría de Valoración Isotérmica (ITC), para la forma nativa y oxidada de la α -Sinucleína con Cu(II).
- Influencia del Cu(II), Fe(III) y Al(III) sobre la formación de fibras en la forma nativa, glicada y oxidada de la α -Sinucleína.

3. Metodología y material

3.1. Reactivos

La α Sin fue producida por el grupo de Reactividad Molecular (ReacMol) del departamento de química de la Universidad de las Islas Baleares (UIB). Para la producción se utilizó una cepa de bacterias *E. Coli* modificada genéticamente con un plásmido que incluía la secuencia de nucleótidos que codifican para la α Sin humana. La α Sin se purificó por cromatografía y se concentró con el uso de una membrana de 5000Da como peso molecular de corte. La concentración de la α Sin se determinó por absorbancia molecular, el grado de pureza se determinó usando SDS-PAGE y MALDI-TOF/TOF y finalmente la masa exacta se obtuvo usando un espectrómetro de masas. [Martínez-Orozco, 2019].

A partir de la α Sin producida, el grupo de ReacMol también produjo las diferentes MPTs. La proteína oxidada se llevó a cabo siguiendo el protocolo publicado por Uversky y *col.*, donde la proteína se oxida en presencia de H_2O_2 a pH 8 durante 20 min a temperatura ambiente [Uversky, 2001]. Por otra parte, para la producción de la α Sin glicada en forma N- ϵ -carboxietilisina se hizo reaccionar la proteína con ácido pirúvico y $NaBH_3CN$ durante 48h y a 50°C.

El resto de reactivos fueron adquiridos a través de las siguientes empresas comerciales:

- *Scharlau*: Ácido clorhídrico (1N), Hidróxido de sodio (1N), Cloruro de hierro(III) hexahidratado, Cloruro de aluminio(III) hexahidratado
- *Sigma-Aldrich*: Tioflavina T
- *Avantor*: Cloruro de sodio
- *Fisher Scientific*: Tampón Tris (tris(hidroximetil)aminometano)
- *Panreac*: Cloruro de cobre(II) dihidratado.

3.2. Procedimientos y técnicas experimentales

3.2.1. Preparación de disoluciones

a) Preparación de la disolución tampón

Los estudios realizados en este trabajo se han realizado a pH 7,4. Se ha utilizado el compuesto Tris para preparar las disoluciones tamponadas. Además, se hizo uso de ácido clorhídrico o hidróxido sódico 1N para ajustar el valor de pH. Se utilizó un pH-metro digital Crison modelo Basic 20+ que presenta un electrodo de vidrio Crison modelo 50 29. Las disoluciones resultantes se filtraron con un filtro de membrana de nailon con un diámetro de poro de 45 μ m y se mantuvieron a 5°C hasta su utilización.

En el estudio de la interacción entre la α Sin y los cationes metálicos se utilizó un tampón Tris 20mM de pH 7,4 y además se ajustó la fuerza iónica con NaCl 150mM. Por otra parte, para el estudio de la formación de fibras en presencia de metales también se utilizó el tampón Tris 20mM de pH 7,4 y NaCl 150mM. Para las lecturas de fluorescencia mediante Tioflavina T se utilizó un tampón Tris 20mM pH 8, ya que es el pH en que se obtiene mayor sensibilidad [Uversky,2001].

b) Disolución de cationes metálicos

Se prepararon disoluciones 4mM de AlCl₃, CuCl₂ y FeCl₃ a partir de las correspondientes sales de cloruro comercial utilizando como disolvente la disolución de tampón Tris 20mM pH 7,4 y NaCl 150mM. Se comprobó que no hubiese problemas de precipitación (formación de hidróxidos) en estas condiciones.

c) Disolución de Tioflavina T

Para la determinación de fibras de α Sin se utilizó una disolución de Tioflavina T (ThT). Se ha demostrado que a pH > 9 se produce un proceso de hidroxilación reversible, proceso que afecta a la intensidad de fluorescencia de la ThT, impidiendo el seguimiento de detección de fibras proteicas [Foderà, 2008]. Por este motivo, se preparó una disolución stock 1mM de ThT a pH 7,4 en tampón Tris 20mM y NaCl 150mM.

3.2.2. Medidas de fluorescencia

La presencia de cuatro residuos de tirosina (Y39, Y125, Y133 y Y136) fluorescentes en la estructura primaria de la α Sin permite aplicar la espectroscopia de fluorescencia para determinar las constantes de unión metal- α Sin. Por otra parte, con la utilización del fluoróforo ThT se pudo realizar un seguimiento de la formación de fibras en presencia de los diferentes cationes metálicos.

3.2.2.1. Interacción entre la α -sinucleína y diferentes cationes metálicos

Mediante la fluorescencia intrínseca de los residuos tirosina se puede estudiar cómo los diferentes cationes metálicos interaccionan con la α Sin. Los residuos tirosina se excitaron a 275nm y la lectura se hizo desde 290 a 350nm. En este experimento se utilizó un espectrofluorímetro modelo Varian Cary Eclipse, equipado con un porta-cubetas controlado con un Peltier que permitió mantener la temperatura constante a 37°C.

El procedimiento experimental fue el siguiente. Se añadió 1mL de tampón Tris 20mM, pH 7,4 en presencia de NaCl 150mM en la cubeta de fluorescencia. A continuación, se añadieron los volúmenes correspondientes de las diferentes disoluciones tamponadas de α Sin nativa, oxidada y glicada para obtener una concentración 4,5 μ M de dicha proteína en la cubeta. Los diferentes espectros se fueron registrando a medida que se añadían alícuotas de 10 μ L de la disolución de catión metálico, hasta saturar la proteína con el catión. Además, se corrigieron los datos debido al proceso de dilución de la proteína. El experimento se realizó por triplicado para así poder obtener un valor de desviación.

3.2.2.2. Estudio de la formación de fibras en presencia de cationes metálicos

Desde su primera descripción en 1959, el fluoróforo Tioflavina T es uno de los compuestos más utilizados para la detección de fibras proteicas tanto *in vivo* como *in vitro* [Biancalana, 2010]. En disolución, la ThT es un fluoróforo que no presenta fluorescencia, ya que los estados excitados se desactivan térmicamente (desactivación no radiante) debido a la capacidad del fluoróforo para girar alrededor del eje central de su estructura molecular (**Figura 4**).

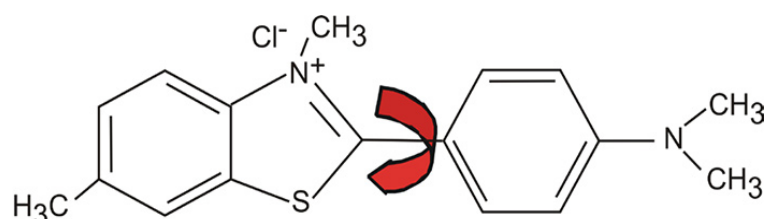


Figura 4. Estructura molecular de la Tioflavina T. La unión entre los anillos benzotiazol y aminobenceno permite la torsión entre sí, lo que resulta en una desactivación no radiante de los estados excitados [Biancalana, 2010].

En presencia de fibras, el ThT puede incorporarse en las cavidades producidas por la estructura cuaternaria de la proteína. De esta forma, la rotación se ve restringida, lo que resulta en un aumento significativo del rendimiento cuántico de fluorescencia [Biancalana, 2010].

Está descrito que la formación de fibras de α Sin depende de la concentración de proteína, el tiempo de incubación, la agitación y la temperatura [Uyersky, 2001]. En este trabajo, se controlaron todas estas condiciones y se establecieron las condiciones experimentales en las que durante el experimento la muestra control (formada por la proteína en ausencia de cationes) no formase fibras en comparación a las muestras que presentasen cationes metálicos.

Para la monitorización de la formación de fibras se utilizó un Eppendorf de 1mL. Se adicionó el volumen necesario de las diferentes disoluciones tamponadas de α Sin nativa, oxidada y glicada para obtener una concentración 30 μ M de dicha proteína. Para determinar cómo los diferentes cationes metálicos afectan a la formación de fibras, se añadió el volumen correspondiente de la disolución madre 4mM para lograr una concentración final 150 μ M de catión en el Eppendorf. Se completó el volumen restante del Eppendorf con la disolución tampón Tris 20mM pH 7,4 y 150mM NaCl.

La muestra elaborada se incubó a 37°C y 750rpm durante 4 días. Para ello se utilizó un Thermo Shaker modelo TS-100 de la casa comercial Biosan. Por último, para realizar las lecturas de fluorescencia, en una cubeta de fluorescencia se adicionó 1mL de tampón Tris 20mM pH 8, 50 μ L de la disolución 1mM tamponada de Tioflavina-T y 30 μ L de la muestra elaborada de proteína. La fluorescencia de ThT se registró inmediatamente después de la adición de alícuotas de proteína a la mezcla de ThT de 470 a 560nm utilizando una longitud de excitación de 450 nm. Las medidas se realizaron a temperatura ambiente utilizando un espectrofluorímetro modelo RF-5301PC de la marca comercial Shimadzu. La fluorescencia de ThT se siguió a pH 8,0 ya que previamente se comprobó que a este pH la señal de fluorescencia era adecuada. El experimento se realizó por duplicado.

3.2.3. Experimentos de calorimetría de valoración isotérmica (ITC)

La calorimetría de valoración isoterma es una técnica calorimétrica utilizada en estudios de biofísica y de farmacología que permite determinar cuantitativamente de manera directa diferentes parámetros termodinámicos de unión entre una proteína y un ligando o catión metálico. Los diferentes parámetros se obtienen mediante la medición del calor liberado o absorbido a presión constante durante una reacción dada [Makoska, 2016]. Asimismo, con el tratamiento matemático adecuado se puede obtener el valor de la constante de unión α Sin-metal.

Las mediciones de ITC se realizaron por duplicado en un instrumento de la marca TA, modelo nano-ITC, a 25°C. La celda de medida se llenó del volumen necesario de las diferentes disoluciones tamponadas de α Sin nativa y oxidada para obtener una concentración 200 μ M de dicha proteína, y se mantuvo a una agitación de 250rpm. En la jeringa de inyección de 50 μ L, se introdujo una disolución de Cu(II) 2mM y glicina 4mM en tampón Tris pH 7,4 y NaCl 150mM. Ambas disoluciones fueron desgasificadas antes de su uso. A continuación, la disolución de α Sin fue valorada con 30 inyecciones de 1,43 μ L de Cu(II), y con espacios entre inyecciones de 400s. Las valoraciones se realizaron a 25°C. Finalmente, los datos obtenidos fueron analizados mediante el modelo de ajuste Sequential Three Site (S3SM) en el software Nano Analyzer, a un intervalo de confianza del 90%.

3.2.4. Experimentos de dispersión dinámica de luz (DLS)

Se han realizados experimentos de dispersión dinámica de luz (DLS) para determinar la formación de agregados proteicos en presencia de Al(III). Si se incide con un haz de luz monocromática, como un láser, sobre una solución con partículas en movimiento browniano, se provoca un efecto Doppler cuando la luz incide en la partícula en movimiento. Una característica de este movimiento browniano es que las moléculas pequeñas se mueven más rápido que las grandes. Tras la irradiación con luz monocromática visible de alta coherencia espacial y temporal, se dispersa una pequeña fracción de luz. La intensidad de esta luz dispersada fluctúa en función del tiempo debido a que las distancias entre las partículas van continuamente cambiando. Esto lleva a una interferencia constructiva o destructiva. La fluctuación de intensidad en función del tiempo puede ajustarse a una función de autocorrelación. La decadencia de la correlación está directamente relacionada con el movimiento de las partículas, a su coeficiente de dispersión, y por lo tanto a sus dimensiones [Lorber, 2012].

Este estudio se ha realizado para la α Sin en su forma oxidada y en su forma glicada. En un Eppendorf de 1mL se adicionó el volumen necesario de las diferentes disoluciones tamponadas de α Sin oxidada y glicada para obtener una concentración 30 μ M de proteína. Seguidamente, se adicionó el volumen necesario de Al(III) para lograr una concentración final de 150 μ M en el Eppendorf. Se completó el volumen restante con la disolución tampón Tris 20mM pH 7,4 y NaCl 150mM. La muestra resultante se incubó a 37°C y 750rpm durante 4 días, se utilizó un Thermo Shaker modelo TS-100 de la marca comercial Biosan.

Se realizó una lectura diaria de DLS utilizándose 200 μ L de la disolución anterior. Las medidas se obtuvieron a una temperatura de 25°C con el DLS Zeta Potential Analyzer, modelo ZS90 de la marca comercial Malvern. Se utilizó una radiación láser roja de una longitud de onda de 633nm y la lectura se realizó a 90°.

3.2. Tratamiento matemático de los resultados experimentales

3.2.1. Determinación de las constantes de unión mediante fluorescencia

La fluorescencia de una sustancia puede modificarse debido a un proceso conocido como quenching o atenuación de fluorescencia y se puede dar por dos mecanismos: quenching dinámico y quenching estático.

En los dos tipos de quenching se requiere el contacto molecular de la sustancia atenuadora con el fluoróforo. En el caso del quenching dinámico, el atenuador colisiona con el fluoróforo cuando éste se encuentra en su estado excitado, provocando una recuperación rápida a su estado fundamental sin la emisión de un fotón. Mientras que en el quenching estático, la disminución de la fluorescencia se debe principalmente a la formación de un complejo que no es fluorescente [Bharathi, 2008]. Ambos mecanismos pueden ser descritos mediante la ecuación de Stern-Volmer (1).

$$\frac{I_0}{I_Q} = 1 + K_{sv} \cdot [Q] \quad (1)$$

Para un proceso controlado por difusión, I_0 y I_Q son las intensidades de fluorescencia en ausencia y presencia de quencher, respectivamente; K_{SV} es la constante de Stern-Volmer; y $[Q]$ es la concentración de quencher.

Para la determinación de las constantes de unión se utiliza una segunda ecuación derivada de la ecuación (1), conocida como ecuación de Stern-Volmer modificada o doble logarítmica, ecuación (2) [Makowska, 2016; Wang, 2010].

$$\log \frac{I_0 - I_Q}{I_Q} = \log Ka + n \cdot \log [Q] \quad (2)$$

De la misma forma que antes, I_0 y I_Q representan las intensidades de fluorescencia en ausencia y presencia de quencher (atenuador); Ka es la constante de unión entre ligando-proteína; y n representa el número de unión del quencher a la proteína.

3.3.2. Seguimiento de la formación de fibras.

Para analizar la formación de fibras, se representa la intensidad máxima de emisión de la Tioflavina T frente al tiempo de incubación (**Figura 5**). La formación de fibras transcurre en un proceso de tres etapas: a) una primera etapa de nucleación donde se forman los primeros fragmentos de fibras; b) una segunda etapa de crecimiento de las fibras proteicas; y c) una etapa final de saturación donde se llega a un estado de equilibrio en la formación de fibras.

La **Ecuación 3** es una ecuación empírica que representa una función sigmoidea. Esta expresión ha sido utilizada ampliamente, ya que describe la cinética de formación de fibras proteicas [Nielsen, 2001].

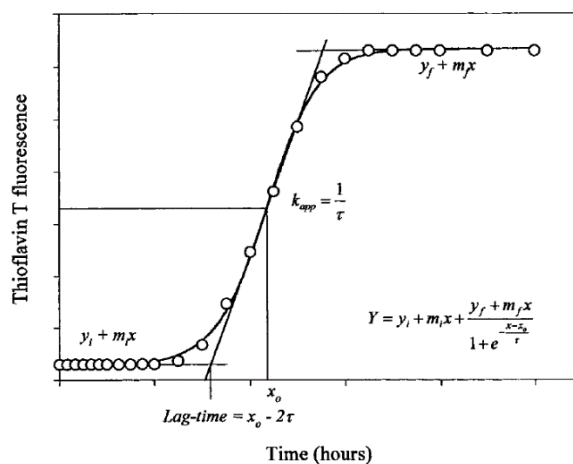


Figura 5. Ilustración esquemática del aumento sigmoide de la fluorescencia de Tioflavina T en la formación de fibras de aSin [Nielsen, 2001].

$$y = (y_i + m_i \cdot x) + \frac{(y_f + m_f \cdot x)}{1 + e^{-\frac{x-x_0}{\tau}}} \quad (3)$$

y representa la fluorescencia, x_0 es el tiempo en que se registra el 50% de la fluorescencia máxima. La constante de velocidad aparente, k_{app} , para el crecimiento de las fibras viene dado por $1/\tau$. m_i y m_f representan la pendiente del periodo de incubación y del periodo de nucleación, respectivamente. Otro parámetro característico es el tiempo de retraso o incubación que viene dado por $x_0 - 2\tau$.

3.3.3. Determinación de las constantes de unión mediante ITC

Integrando los datos de calor liberado, a presión constante, por unidad de tiempo (mJ/s) se puede obtener el cambio de entalpía en cada valoración. Aplicando la **Ecuación (4)** se puede determinar la constante de disociación de la interacción entre la α Sin y los diferentes cationes metálicos.

$$Q = \frac{(1 + [M]nK_d + K_d[L_T]) - \left[(1 + [M]nK_d + K_d[L_T])^2 - 4[M]nK_d^2[L_T] \right]^{1/2}}{\frac{2K_d}{V \cdot \Delta H}} \quad (4)$$

Q representa el calor liberado, V es el volumen de la celda del calorímetro, ΔH es la entalpía (kJ/mol), K_d (M^{-1}) es la constante de disociación, [M] y $[L_T]$ representan la concentración de proteína y ligando respectivamente, y n representa el número de unión.

La energía libre de Gibbs (ΔG) se determina a partir de la constante de unión (5). La variación de entropía (ΔS) se puede obtener de la segunda ley de la termodinámica (6).

$$\Delta G = -RT \cdot \ln K \quad (5)$$

$$\Delta G = \Delta H - T \cdot \Delta S \quad (6)$$

3.3.4. Análisis de los resultados obtenidos por DLS

Las condiciones experimentales que se han utilizado en este trabajo no son las adecuadas para la correcta determinación del radio hidrodinámico de los agregados formados. Esto se debe a la baja concentración utilizada de proteína. De este modo, únicamente se ha podido realizar un análisis cualitativo de cómo varía la formación de agregados en función del tiempo de incubación.

4. Resultados y discusión

4.1. Determinación de las constantes de unión mediante fluorescencia

En la **Figura 6** se muestra la variación de la fluorescencia intrínseca de la α Sin nativa a medida que se aumenta la concentración de catión metálico. Al aumentar la concentración de Cu(II) y Fe(III) la fluorescencia intrínseca de los residuos de tirosina presentes en la α Sin disminuye. En cambio, al incrementar la concentración de Al(III) la fluorescencia aumenta ligeramente. Los resultados que se han obtenido siguen el mismo comportamiento que los obtenidos por Uversky y *col.* [Uversky, 2001]. La unión del Al(III) a la α Sin conduce a cambios en el entorno de los residuos de tirosina de la proteína. El aumento en la fluorescencia intrínseca de la α Sin se debe principalmente a la inhibición de grupos desactivadores de fluorescencia, en concreto grupos carboxílicos y amida presentes en las cadenas laterales. Se ha descrito que dichos grupos, cercanos a residuos de tirosina, interactúan con el anillo aromático excitado de la tirosina provocando una disminución de la fluorescencia intrínseca [Feitelson, 1969]. Por otra parte, como se ha mencionado anteriormente, estudios DFT demuestran que el Al(III)

interacciona de manera importante con los residuos D-119, D-121, N-122 y E-123 que están cercanos a los residuos tirosina del extremo C-terminal. Así pues, la interacción del Al(III) provoca una disminución de la desactivación de estos grupos, aumentando así la fluorescencia intrínseca de la α Sin.

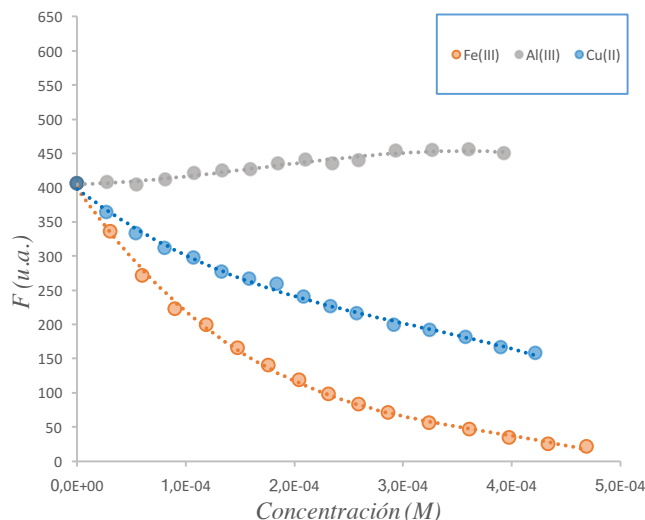


Figura 6. Variación de la intensidad de fluorescencia de la disolución $4,5\mu\text{M}$ de α Sin nativa, a pH 7,4 y NaCl 150mM y a 37°C , en función de la cantidad de Cu(II), Fe(III) y Al(III) añadido. Se utilizó una $\lambda_{ex} = 275\text{nm}$ y $\lambda_{em} = 305\text{nm}$

Los resultados anteriores indican que el Cu(II) y el Fe(III) provocan una disminución en la fluorescencia intrínseca de los residuos tirosina. EL ajuste de los resultados experimentales a la ecuación de Stern-Volmer (Ecuación 1) permite determinar el valor de K_{sv} .

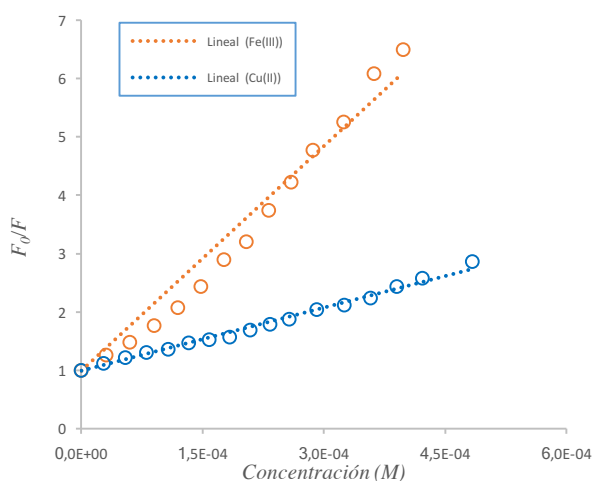


Figura 7. Ajuste de los datos obtenidos de la adición de alícuotas de Cu(II) y Fe(III) a una disolución $4,5\mu\text{M}$ de α Sin nativa, a pH 7,4 y NaCl 150mM y a 37°C , de acuerdo a la ecuación de Stern-Volmer. Se utilizó una $\lambda_{ex} = 275\text{nm}$ y $\lambda_{em} = 305\text{nm}$

Ambas representaciones se ajustan a la ecuación de Stern-Volmer, lo que indica que el proceso involucra un proceso de quenching. El ajuste lineal que se obtiene con el

Cu(II) es mucho mejor que el ajuste del Fe(III). Para este último catión, se aprecia una cierta curvatura en el ajuste. Ambos resultados experimentales podrían explicarse por la formación de complejos estables catión-proteína, fenómeno que disminuye la fluorescencia intrínseca de los residuos tirosina.

La aplicación de la ecuación Stern-Volmer modificada (Ecuación 2) permite obtener los valores de constante de unión proteína-metal y el número de sitios de unión.

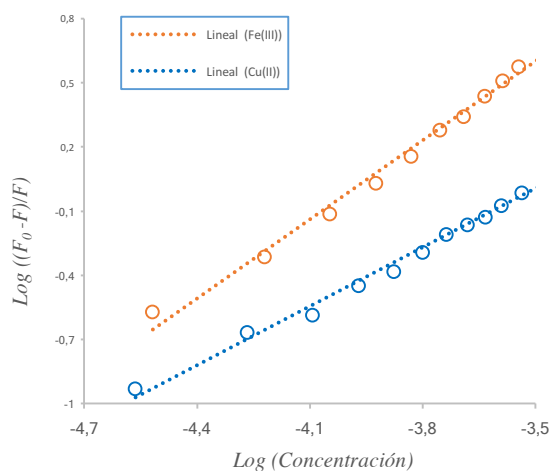


Figura 8. Ajuste de los datos obtenidos de la adición de alícuotas de Cu(II) y Fe(III) a una disolución $4,5\mu\text{M}$ de α Sin nativa, a pH 7,4 y NaCl 150mM y a 37°C , de acuerdo a la ecuación de Stern-Volmer modificada. Se utilizó una $\lambda_{\text{ex}} = 275\text{nm}$ y $\lambda_{\text{em}} = 305\text{nm}$

Como se observa en la figura anterior, se obtiene un buen ajuste lineal para la representación de Stern-Volmer modificada. Como primera aproximación, se puede observar que la pendiente que se obtiene para el Fe(III) es mayor que el Cu(II). El número de sitios de unión a la proteína (Tabla 1) para ambos cationes metálicos es cercano a la unidad.

Por otra parte, para las diferentes MTPs de la α Sin, es decir, para la forma CEL y la forma oxidada se ha realizado el mismo tratamiento de los datos experimentales.

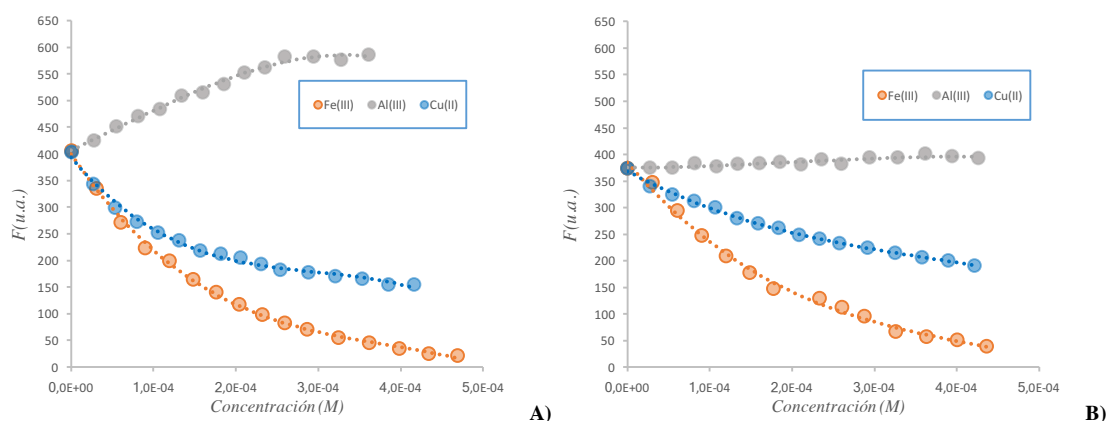


Figura 9. Variación de la intensidad de fluorescencia de la disolución $4,5\mu\text{M}$ de la α Sin CEL (A) y la α Sin oxidada (B), a pH 7,4 y NaCl 150mM y a 37°C , en función de la cantidad de Cu(II), Fe(III) y Al(III) añadido. Se utilizó una $\lambda_{\text{ex}} = 275\text{nm}$ y $\lambda_{\text{em}} = 305\text{nm}$

Como se puede apreciar en la **Figura 9**, el comportamiento que se obtiene al adicionar alícuotas de Cu(II), Fe(III) y Al(III) a la α Sin CEL y oxidada es análogo al comportamiento de la α Sin nativa: la adición de Cu(II) y Fe(III) disminuye la fluorescencia intrínseca de la proteína; mientras que la adición de Al(III) la aumenta o se mantiene constante. El comportamiento difiere únicamente en la magnitud del cambio, sobre todo cuando se añade Al(III). En la MPT α Sin CEL, la fluorescencia intrínseca de los residuos tirosina aumenta en presencia de Al(III), y este efecto es mayor que en el caso de la proteína nativa y el Al(III), lo que sugiere que el Al(III) presenta mayor afinidad por los residuos carboxílicos del dominio C-terminal (residuos D-119, D-121, N-122 y E-123) inhibiendo la acción de estos grupos desactivadores de fluorescencia. En cambio, con la oxidación de los residuos metionina (M1, M5, M116 y M127) la presencia de Al(III) no afecta a la fluorescencia intrínseca de los residuos tirosina. De este modo, si el Al(III) interacciona con la proteína, lo hace sin perturbar el entorno químico de los residuos tirosina, ya que según la **Figura 9B** no se aprecia cambio alguno en la fluorescencia intrínseca de la α Sin.

Con los valores experimentales obtenidos en las formas modificadas de la α Sin también se ha realizado el ajuste a las ecuaciones de Stern-Volmer (**Figura 10**) y Stern-Volmer modificada (**Figura 11**).

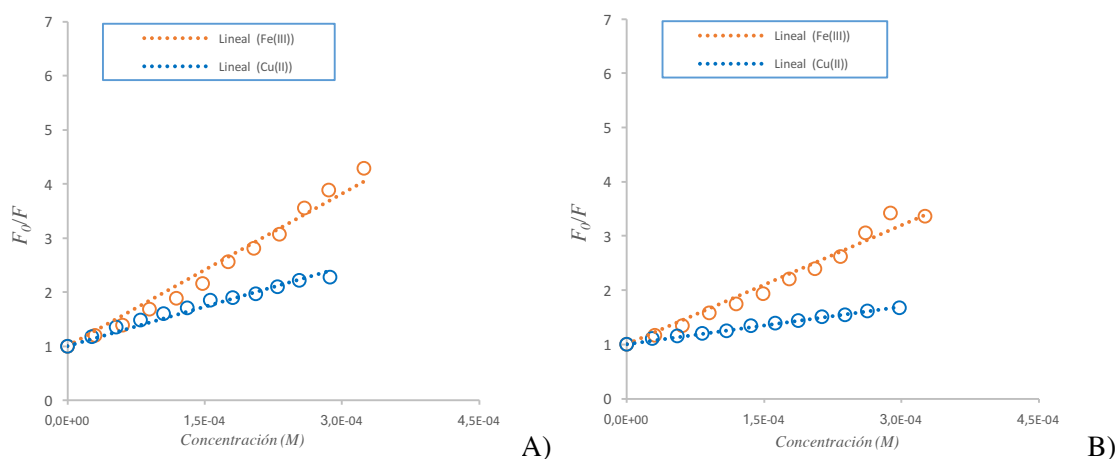


Figura 10. Ajuste de los datos obtenidos de la adición de alícuotas de Cu(II) y Fe (III) a una disolución 4,5 μ M de α Sin CEL (A) y de α Sin Oxidada (B), a pH 7,4 y NaCl 150mM y a 37°C, de acuerdo a la ecuación de Stern-Volmer. Se utilizó una $\lambda_{ex} = 275nm$ y $\lambda_{em} = 305nm$

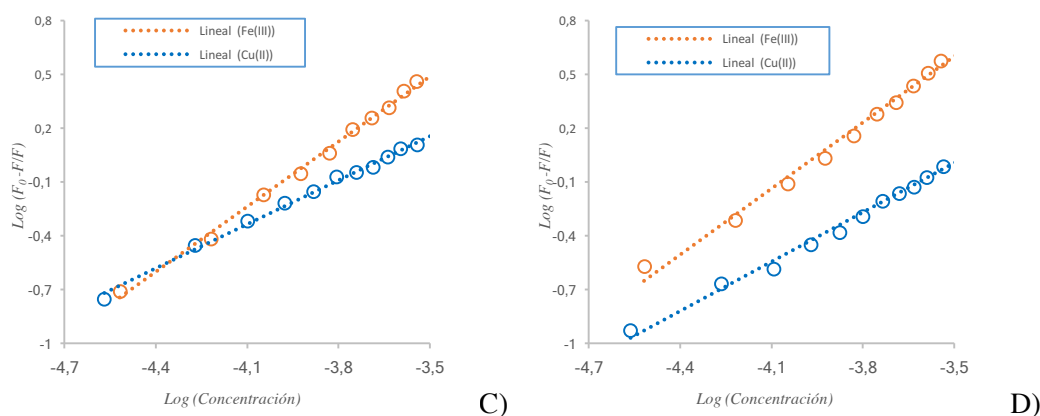


Figura 11. Ajuste de los datos obtenidos de la adición de alícuotas de Cu(II) y Fe (III) a una disolución 4,5 μ M de α Sin CEL (C) y de α Sin Oxidada (D), a pH 7,4 y NaCl 150mM y a 37°C, de acuerdo a la ecuación de Stern-Volmer modificada. Se utilizó una $\lambda_{ex} = 275\text{nm}$ y $\lambda_{em} = 305\text{nm}$

Los valores obtenidos de constantes y sitios de unión se muestran en las **Tablas 1 y 2**.

Tabla 1. Valor de constante de Stern-Volmer (K_{sv}), constante de unión (K_a) y sitio de unión (n), junto a la desviación estándar, obtenidos para el Cu(II) y las diferentes MPTs de la α Sin a 37°C.

	$K_{sv} (M^{-1})$	$K_a (M^{-1})$	n
Nativa	$(3,56 \pm 0,06) \cdot 10^3$	$(2,29 \pm 1,15) \cdot 10^3$	$0,95 \pm 0,02$
CEL	$(4,34 \pm 0,19) \cdot 10^3$	$(4,17 \pm 0,01) \cdot 10^2$	$0,72 \pm 0,01$
Oxidada	$(2,23 \pm 0,12) \cdot 10^3$	$(6,46 \pm 0,01) \cdot 10^2$	$0,85 \pm 0,01$

Los valores obtenidos de K_{sv} de la **Tabla 1** son similares e independientes de la modificación postrasduccional de la sinucleína. El valor del sitio de unión (n) es aproximadamente 1. Estudios realizados por otros autores utilizando ITC y RMN indican que la α Sin presenta tres sitios de unión para el Cu(II): residuos 1-5, His50 y residuos 116-127 [Ranjan, 2017]. Por lo tanto, la técnica de fluorescencia no es capaz de distinguir más de un sitio de unión. El principal motivo debe ser la posición alejada de los residuos tirosina respecto a los sitios de unión del Cu(II), por lo que la variación de la fluorescencia intrínseca de la tirosina sólo permite obtener un sitio de unión del Cu(II) a la proteína. Teniendo en cuenta la posición de los residuos tirosina (Y35, Y125, Y133 y Y136) lo más probable es que el sitio de unión determinado por fluorescencia sea en la región C-terminal (116-127), descrito por otros autores [Rasia, 2005] [Ranjan, 2017].

Por otra parte, los valores de las constantes de asociación son ligeramente diferentes. El valor de K_a para el Cu(II) con la α Sin en su forma nativa es 4~6 veces mayor que las MPTs analizadas. De modo que la glicación de los residuos lisina 96, 97 y 102 o la oxidación de los residuos metionina 116 y 127 modifican ligeramente la afinidad del Cu(II) por la proteína.

En la **Tabla 2** se muestran los valores obtenidos para el Fe(III). El número de sitios de unión (*n*) que se obtiene con el Fe(III) es de aproximadamente 1,4, valor superior al obtenido con Cu(II). Pen y *col.* determinaron mediante espectrometría de masas con electrospray (ES-MS), y voltametría cíclica (VC) una estequiometría 1:1 para complejo Fe(III)- α Sin [Peng, 2010]. Al utilizar Fe(III), el valor de K_{sv} que se obtiene para la forma nativa y modificadas son semejantes entre ellos, y de un orden de magnitud superior al valor obtenido en presencia de Cu(II).

La constante de asociación que se obtiene para la unión α Sin-Fe(III) es 50 veces mayor que la obtenida en presencia de Cu(II). La dureza como ácido de Lewis del catión Fe(III), según la teoría HSABs de Pearson, es mayor que la del Cu(II). Por lo cual, la estabilidad de los complejos que forme el Fe(III) será mayor que cuando se utiliza Cu(II), obteniendo así un valor superior de constante de asociación. Por otra parte, las constantes de asociación obtenidas para las MPTs de la α Sin analizadas con el Fe(III) son entre 3-5 veces inferiores a la constante obtenida para la α Sin nativa. De forma análoga a lo indicado con el Cu(II), las modificaciones postraduccionales deben alterar ligeramente la conformación de la proteína y el entorno químico de los residuos tirosina, principalmente los residuos Y125, Y133 y Y136 responsables de la fluorescencia intrínseca de la proteína.

Tabla 2. Valor de constante de Stern-Volmer (K_{sv}), constante de unión (K_a) y sitio de unión (*n*), junto a la desviación, obtenidos para el Fe(III) y las diferentes MPTs de la α Sin a 37°C.

	$K_{sv} (M^{-1})$	$K_a (M^{-1})$	<i>n</i>
Nativa	$(1,28 \pm 0,03) \cdot 10^4$	$(1,07 \pm 0,01) \cdot 10^5$	$1,27 \pm 0,05$
CEL	$(1,09 \pm 0,21) \cdot 10^4$	$(6,31 \pm 0,01) \cdot 10^4$	$1,53 \pm 0,13$
Oxidada	$(7,32 \pm 0,92) \cdot 10^3$	$(8,23 \pm 0,02) \cdot 10^4$	$1,23 \pm 0,13$

4.2. Determinación de las constantes de unión mediante ITC

En la **Figura 12** se muestra la valoración isoterma de la α Sin nativa y Oxidada con el Cu(II). A medida que se adiciona Cu(II) a la celda de medida se libera calor (proceso exotérmico) hasta que se alcanza una saturación de la proteína. Los datos experimentales se han ajustado a un modelo de tres sitios de unión independientes que han permitido determinar las constantes de unión y la variación entálpica de la interacción entre la α Sin y el catión metálico (**Tabla 3**).

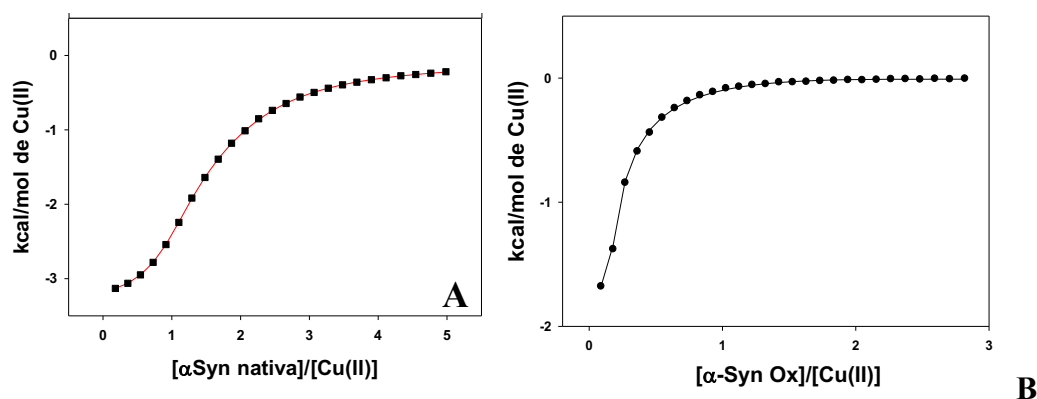


Figura 12. Titulación con el complejo Cu(II)-Gly (1:2) a la: A) α Sin nativa 200 μ M; B) α Sin oxidada 200 μ M a pH 7,4 y NaCl 150mM y a 37°C. Ajuste realizado con el modelo S3SM.

Tabla 3. Valores de K_d y ΔH de los sitios de afinidad a Cu(II) en las α Sin nativa, CEL y Oxidada, obtenidos mediante S3SM en el software Nano Analyzer de TA instrument. Experimentos realizados a pH 7,4 con tampón Tris 20mM y 150mM NaCl y a 25°C

	α Sin nativa	α Sin-CEL*	α Sin-Oxi
K_{d1} (μ M)	4,0 \pm 0,2	53 \pm 8	26 \pm 7
K_{d2} (μ M)	66 \pm 3	24.8 \pm 1	92 \pm 10
K_{d3} (mM)	2,1 \pm 0,1	0,34 \pm 0,1	1,0 \pm 0,3
ΔH_1 (kcal/mol)	-3,24 \pm 0,01	-4,3 \pm 0,2	-3,3 \pm 0,3
ΔH_2 (kcal/mol)	-2,30 \pm 0,04	-1,5 \pm 0,2	1,5 \pm 0,3
ΔH_3 (kcal/mol)	-3,7 \pm 0,3	-1.1 \pm 0,7	-5.5 \pm 0,6

*Datos extraídos del trabajo realizado, en las mismas condiciones experimentales, por Martínez-Orozco y col. [Martínez-Orozco, 2019].

La técnica de ITC ha permitido determinar los valores termodinámicos de los 3 sitios de unión del Cu(II) a la α Sin. Los datos obtenidos muestran como las MPTs sobre la α Sin alteran su capacidad para unirse al Cu(II). Respecto al primer punto de unión, que según la bibliografía corresponde a los residuos 1-5, la glicación de la lisina K6 o la oxidación de las metioninas M1 y M5 disminuye la afinidad del Cu(II) por este sitio de unión, aumentando el valor de la constante de disociación en casi un orden de magnitud. En el segundo y tercer punto de unión no hay cambios significativos de la constante de unión con la modificación postraducciona. Es importante destacar que los valores obtenidos de las constantes de disociación en el tercer sitio de unión son del mismo orden de magnitud que los obtenidos por la técnica de fluorescencia (0.5-2.5 mM).

Finalmente, los valores obtenidos de variación entálpica son negativos, a excepción del valor determinado para la sinucleína oxidada y el segundo sitio de unión, indicando que el proceso de formación de complejos entre el Cu(II) y las diferentes formas de la α Sin son procesos exotérmicos.

4.3. Formación de fibra de la α Sin nativa en presencia de Al(III), Cu(II) y Fe(III).

En este Trabajo de Fin de Grado también se ha estudiado cómo la presencia de diferentes cationes metálicos puede acelerar la formación de fibras en la α Sin nativa. En la **Figura 13** se observa como la muestra control (en ausencia de catión metálico) no forma fibras durante el tiempo de incubación utilizado. En cambio, en presencia de cationes metálicos se ha detectado la formación de fibras. Por ejemplo, en presencia de Al(III), a las 20 h de la monitorización se aprecia un aumento importante de la fluorescencia del ThT, indicativo de la formación de fibras. Esta subida se mantiene hasta aproximadamente las 50 h del experimento, a partir del cual se estabiliza la señal. Por otra parte, la presencia de Cu(II) y Fe(III) en la disolución de α Sin parecen ejercer un efecto similar para la formación de fibras. Si bien el efecto es inferior al obtenido en presencia de Al(III), indicando una cinética más lenta en la formación de fibras.

La interacción entre la α Sin y los diferentes cationes metálicos puede provocar cambios estructurales en la α Sin, dando lugar a una mayor propensión a agregarse. Esto se debe a que los cationes metálicos actúan como contraiones positivos, contrarrestando la repulsión electrostática de la α Sin debido a su carga negativa en el dominio C-terminal [Ly, 2008]. Estudios de dicroísmo circular han demostrado cambios en la estructura secundaria de la α Sin después de su unión a Al(III), Cu(II), Fe(III) y Co(III) [Uversky, 2001]. El importante cambio que produce el Al(III) se debe principalmente a su elevada densidad de carga. El efecto que produce el Fe(III) y el Cu(II) en la formación de fibras es parecido, ya que ambos cationes metálicos poseen una densidad de carga similar. Los resultados expuestos están de acuerdo con los obtenidos por otros autores [Uversky, 2001].

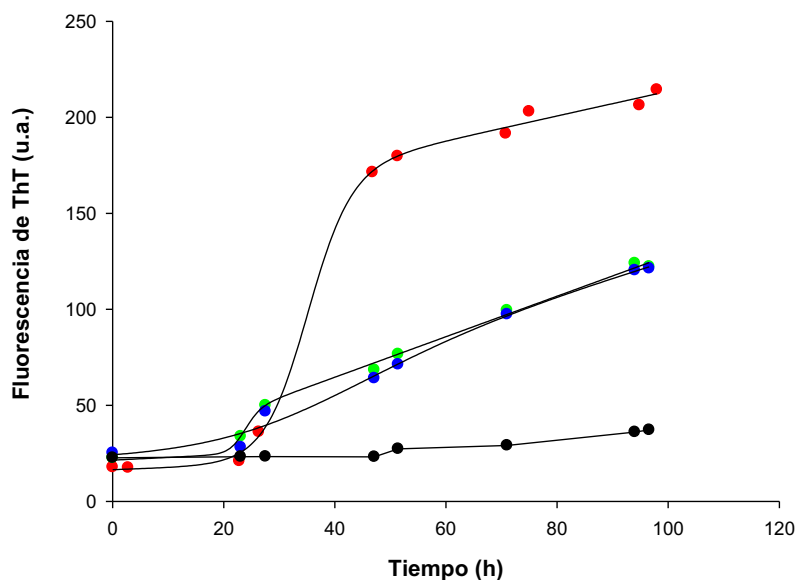


Figura 13. Monitorización de la formación de fibras de α Sin nativa (●) $30\mu\text{M}$ en/sin presencia de Cu(II) (●), Fe(III) (●) y Al(III) (●), a pH 7,4 y NaCl 150mM y temperatura ambiente. Se utilizó una $\lambda_{ex} = 450\text{nm}$ y $\lambda_{em} = 485\text{nm}$. Ajuste realizado con el programa SigmaPlot.

Con el programa SigmaPlot se ha realizado el ajuste de los resultados experimentales a la **Ecuación 3** que describe la cinética de formación de fibra. El valor de la constante aparente (K_{ap}) describe cuantitativamente el crecimiento de fibras de la segunda fase del proceso. Se han obtenido los valores de K_{ap} $0,25 \pm 0,05h^{-1}$ para el Al(III) y $0,085 \pm 0,008h^{-1}$ para el Cu(II)/Fe(III). Es decir, el Al(III) cataliza más la formación de fibras que el Cu(II) y el Fe(III).

4.4. Formación de fibras de la α Sin CEL en presencia de Al(III), Cu(II) y Fe(III).

En la **Figura 14**, se muestra la monitorización de la formación de fibras para la forma CEL de la α Sin. Ya sea en presencia o en ausencia de cationes metálicos, no se detecta ningún cambio significativo en la fluorescencia extrínseca del ThT, por lo que se puede apoyar la premisa de que no se forman fibras proteicas. Lee y *col.* demostraron que la glicación de la α Sin con metilglioxal induce la oligomerización de la α Sin e inhibe la formación de fibras [Lee, 2009]. La inhibición de la formación de fibras se da por el bloqueo de los primeros núcleos de fibrilación, necesario para la formación de fibras. Por lo tanto, la glicación de la α Sin con ácido pirúvico para formar la α Sin N- ϵ -carboxietilisina (CEL) debe conducir a una estructura menos compacta y más dinámica que inhibe la formación de los primeros núcleos necesarios para el crecimiento fibrilar. Por lo tanto, los resultados obtenidos en este TFG sugieren que la adición de diferentes cationes metálicos no logran estabilizar los primeros núcleos proteicos necesarios para la formación de fibras.

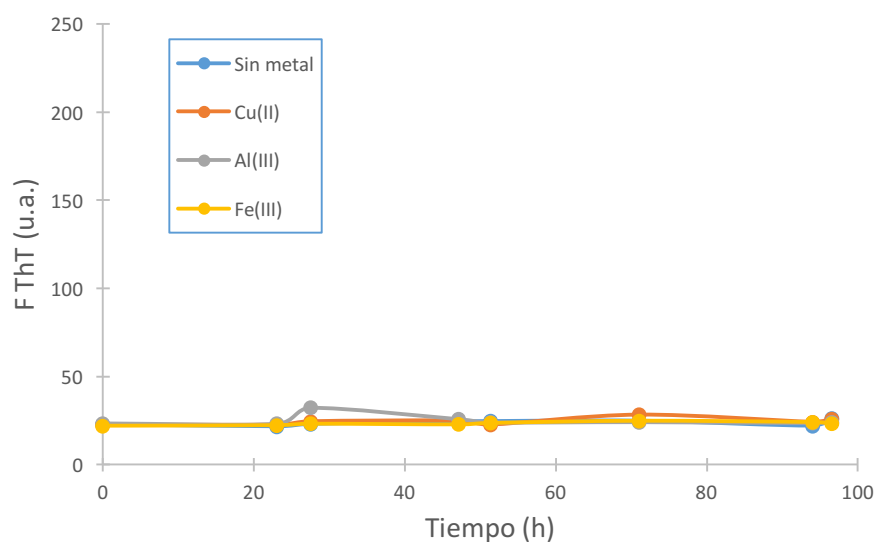


Figura 14. Monitorización de la formación de fibras de α Sin CEL $30\mu M$ en/sin presencia de Cu(II), Fe(III) y Al(III), a pH 7,4 y NaCl 150mM y temperatura ambiente. Se utilizó una $\lambda_{ex} = 450nm$ y $\lambda_{em} = 485nm$

4.5. Formación de fibras de la α Sin Oxidada en presencia de Al(III), Cu(II) y Fe(III).

En último lugar, se ha evaluado la capacidad de formación de fibras para la α Sin con los residuos metionina oxidados a sulfóxido de metionina. El resultado, como se observa en la **Figura 15**, es el mismo que se obtuvo para la α Sin glicada. Es decir, durante el ensayo experimental no se apreció cambio alguno en la fluorescencia extrínseca del ThT, lo que indica la no formación de fibras proteicas. Estudios realizados por Breydo y *col.* han sugerido que la inhibición de la fibrilación de la α Sin es proporcional al número de metioninas oxidadas [Breydo, 2012]. Debido a la localización N- y C-terminal de los residuos metionina (M1, M5, M116 y M127), su oxidación altera la disposición estructural de la α Sin, modificando la interacción de los extremos N- y C-terminal autoinhibitoria de la α Sin necesarios para la no formación de fibras. En 2010 Zhou y *col.* demostraron en un estudio realizado con la α Sin oxidada se determinó que la oxidación de los residuos metionina de la α Sin fortalece las interacciones intramoleculares entre los extremos N y C, inhibidoras de la formación de fibras [Zhou, 2010].

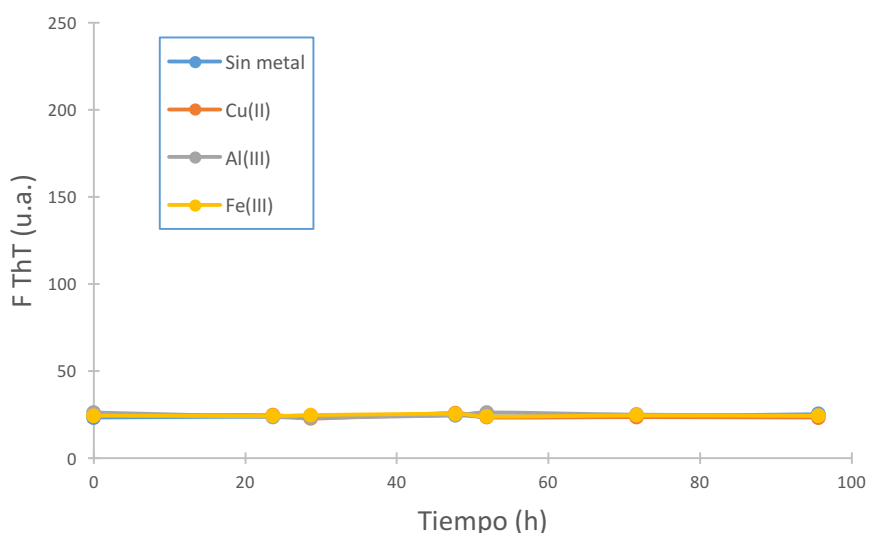


Figura 15. Monitorización de la formación de fibras de α Sin Oxidada $30\mu\text{M}$ en/sin presencia de Cu(II), Fe(III) y Al(III), a pH 7,4 y NaCl 150mM y temperatura ambiente. Se utilizó una $\lambda_{ex} = 450\text{nm}$ y $\lambda_{em} = 485\text{nm}$

Con la oxidación de los residuos metionina, los diferentes cationes metálicos analizados no promueven la formación de fibras. Así como en la α Sin nativa la presencia del Al(III) provocaba un aumento importante en la formación de fibras, esta vez el Al(III) parece no interactuar con el dominio C-terminal. Los resultados descritos en el apartado de fluorescencia indicaban que la fluorescencia intrínseca de los residuos tirosina no se modificaba por la presencia de Al(III), lo que apoya la idea de que el aluminio no interactúa con la α Sin oxidada en dominios cercanos a los residuos tirosina.

4.6. Detección de agregados proteicos para la α Sin CEL y Oxidada en presencia de Al(III).

Como se ha comprobado anteriormente, la forma glicada y oxidada de la α Sin no forman fibras en el tiempo y en las condiciones utilizadas en este TFG. Por tanto, en este apartado se ha decidido estudiar si dichas MPTs dan lugar a la formación de agregados proteicos en presencia/ausencia de Al(III). Se ha escogido el aluminio porque es el catión metálico que más acelera la formación de fibras de la α Sin nativa. Los resultados obtenidos se muestran en las siguientes figuras.

En la **Figura 16a** se representa el radio hidrodinámico que se obtiene por DLS en función del tiempo de incubación. Así pues, se observa cómo la cinética de formación de agregados de la α Sin CEL se ve incrementada en presencia de Al(III). Mientras que a las 70h del experimento la formación de agregado en presencia de Al(III) llega a una estabilización, la muestra control comienza a experimentar un incremento retardado en la formación de agregados, alcanzándose el máximo a las 90h del experimento.

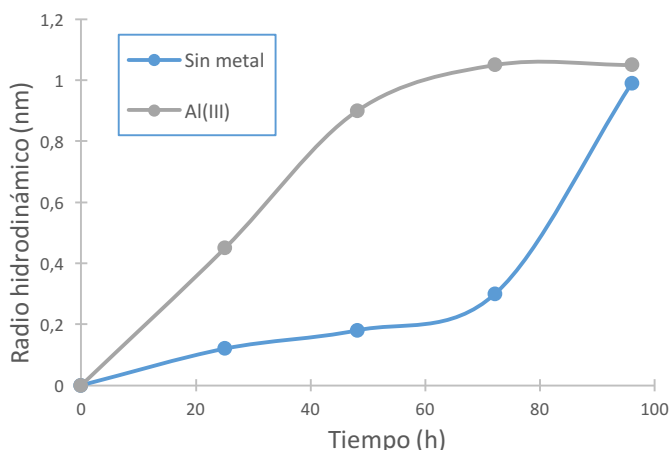


Figura 16a. Monitorización de la formación de agregados de α Sin CEL $30\mu\text{M}$ con/sin Al(III), a pH 7,4 y NaCl 150mM y a 37°C .

La formación de agregados para la α Sin Oxidada también se evaluó en presencia de Al(III). Los resultados (**Figura 16b**) demuestran que, para el mismo tiempo de incubación, la formación de agregados se da de forma más lenta que para la forma CEL. Los cambios, ya sea en presencia como en ausencia de Al(III), se observan aproximadamente a las 75 h. Sin embargo, en la forma CEL los primeros cambios en la formación de agregados se pudieron apreciar a las 25 h del experimento (**Figura 16a**). De esta forma, se concluye que el Al(III) no influye en la cinética de formación de agregados para la forma oxidada de la α Sin. Este último dato, junto a los datos anteriores de la no variación de la fluorescencia intrínseca de los residuos tirosina y la no aceleración de la formación de fibras para la α Sin oxidada, vuelve a apoyar la hipótesis de que el Al(III) no interacciona con la forma oxidada de la α Sin.

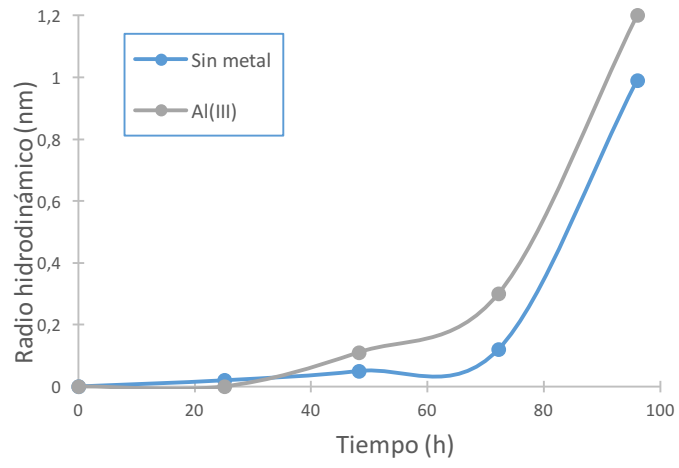


Figura 16b. Monitorización de la formación de agregados de α Sin Oxidada $30\mu\text{M}$ con/sin Al(III) , a pH 7,4 y NaCl 150mM y a 37°C .

5. Conclusiones

Con el fin de describir el papel de diferentes MPTs observadas *in vivo* sobre las propiedades de la α -sinucleína, el presente trabajo de fin de grado estudia el efecto de la glicación (residuos lisina) y la oxidación (residuos metionina), sobre la capacidad de la α Sin de interactuar con el Cu(II), Fe(III) y Al(III). Los resultados obtenidos en este estudio permiten concluir:

- Los cationes estudiados alteran la fluorescencia intrínseca de los residuos tirosina (Y39, Y125, Y133 y Y136) presentes en la α Sin. El Cu(II) y el Fe(III) disminuyen la fluorescencia por un proceso de quenching para la α Sin nativa, CEL y oxidada. En cambio, la posible unión del Al(III) a los residuos D-119, D-121, N-122 y E-123 a la α Sin nativa y CEL conduce a un aumento en la fluorescencia, ya que se inhiben grupos desactivadores de fluorescencia (carboxílicos y amidas); mientras que no altera la fluorescencia de la α Sin oxidada.
- La espectroscopia de fluorescencia ha permitido obtener las constantes de unión aparente entre el Cu(II) y el Fe(III) con la α Sin y sus MPTs, probablemente las del tercer sitio de unión descrito en la bibliografía. Los resultados indican una menor afinidad de los cationes metálicos con la forma CEL y Oxidada. La afinidad del Fe(III) por la α Sin es mayor que con el Cu(II), debido a su mayor densidad de carga y a la mayor estabilidad de sus complejos. La técnica de fluorescencia no ha permitido describir los 3 sitios de unión que se establece entre el Cu(II) y la α Sin.
- Mediante experimentos de calorimetría de valoración isotérmica (ITC) se ha confirmado una menor afinidad de las MPTs de la α Sin por el Cu(II). Esta técnica sí ha permitido diferenciar los 3 sitios de unión por el Cu(II). Además, se han obtenido parámetros termodinámicos que indican que la interacción entre la α Sin y el Cu(II) es un proceso exotérmico.
- El uso de un fluoróforo como el ThT ha permitido concluir que la α Sin nativa en presencia de Al(III), Fe(III) y Cu(II) acelera su formación de fibras. El aluminio, debido a su elevada densidad electrónica y a su capacidad de unión al extremo C-terminal, interfiere con las interacciones autoinhibitorias entre los extremos N y C, aumentando así de forma importante la velocidad de formación de fibras.
- La glicación de los residuos lisina y la oxidación de los residuos metionina de la α Sin no aceleran la formación de fibras. Mediante el seguimiento de la fluorescencia extrínseca del ThT se ha podido determinar que la presencia del Al(III), Fe(III) y Cu(II) no catalizan la formación de fibras de dichas MPTs.
- Mediante estudios DLS se ha podido determinar que el Al(III) aumenta la formación de agregados proteicos en la α Sin CEL. En la forma oxidada de la α Sin, la formación de agregados proteicos es más lenta y la presencia de Al(III) no influye en la cinética de formación de agregados.
- Los resultados obtenidos indican que la oxidación de los residuos metionina (M1, M5, M116 y M127) inhibe la unión entre la α Sin y el Al(III).

6. Bibliografía

- [Anderson, 2006] Anderson, J., Walker, D., Goldstein, J., de Laat, R., Banducci, K., Caccavello, R., Barbour, R., Huang, J., Kling, K., Lee, M., Diep, L., Keim, P., Shen, X., Chataway, T., Schlossmacher, M., Seubert, P., Schenk, D., Sinha, S., Gai, W. and Chilcote, T. (2006). Phosphorylation of Ser-129 Is the Dominant Pathological Modification of α -Synuclein in Familial and Sporadic Lewy Body Disease. *Journal of Biological Chemistry*, 281(40), pp.29739-29752.
- [Bartels, 2011]. Bartels, T., Choi, J. and Selkoe, D. (2011). α -Synuclein occurs physiologically as a helically folded tetramer that resists aggregation. *Nature*, 477(7362), pp.107-110.
- [Bendor, 2013]. Bendor, J., Logan, T. and Edwards, R. (2013). The Function of α -Synuclein. *Neuron*, 79(6), pp.1044-1066.
- [Benito León, 2018] Benito León, J. (2018). Epidemiología de la enfermedad de Parkinson en España y su contextualización mundial. *Revista de Neurología*, 66(04), p.125.
- [Bharathi, 2008] Bharathi and Rao, K. (2008). Molecular Understanding of Copper and Iron Interaction with α -Synuclein by Fluorescence Analysis. *Journal of Molecular Neuroscience*, 35(3), pp.273-281.
- [Biancalana, 2010] Biancalana, M. and Koide, S. (2010). Molecular mechanism of Thioflavin-T binding to amyloid fibrils. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1804(7), pp.1405-1412.
- [Binolfi, 2006] Binolfi, A., Rasia, R., Bertocini, C., Ceolin, M., Zweckstetter, M., Griesinger, C., Jovin, T. and Fernández, C. (2006). Interaction of α -Synuclein with Divalent Metal Ions Reveals Key Differences: A Link between Structure, Binding Specificity and Fibrillation Enhancement. *Journal of the American Chemical Society*, 128(30), pp.9893-9901.
- [Breydo, 2012] Breydo, L., Wu, J. and Uversky, V. (2012). α -Synuclein misfolding and Parkinson's disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1822(2), pp.261-285.
- [Burre, 2012] Burre, J., Sharma, M. and Sudhof, T. (2012). Systematic Mutagenesis of α -Synuclein Reveals Distinct Sequence Requirements for Physiological and Pathological Activities. *Journal of Neuroscience*, 32(43), pp.15227-15242.
- [Camponeschi, 2013] Camponeschi, F., Valensin, D., Tessari, I., Bubacco, L., Dell'Acqua, S., Casella, L., Monzani, E., Gaggelli, E. and Valensin, G. (2013). Copper(I)- α -Synuclein Interaction: Structural Description of Two Independent and Competing Metal Binding Sites. *Inorganic Chemistry*, 52(3), pp.1358-1367.
- [Castellani, 1996] Castellani, R., Smith, M., Richey, G. and Perry, G. (1996). Glycooxidation and oxidative stress in Parkinson disease and diffuse Lewy body disease. *Brain Research*, 737(1-2), pp.195-200.
- [Deleersnijder, 2013] Deleersnijder, A., Gerard, M., Debyser, Z. and Baekelandt, V. (2013). The remarkable conformational plasticity of alpha-synuclein: blessing or curse? *Trends in Molecular Medicine*, 19(6), pp.368-377.
- [Fauvet, 2012] Fauvet, B., Mbefo, M., Fares, M., Desobry, C., Michael, S., Ardah, M., Tsika, E., Coune, P., Prudent, M., Lion, N., Eliezer, D., Moore, D., Schneider, B., Aebischer, P., El-Agnaf, O., Masliah, E. and Lashuel, H. (2012). α -Synuclein in Central Nervous System and from Erythrocytes, Mammalian Cells, and *Escherichia coli* Exists Predominantly as Disordered Monomer. *Journal of Biological Chemistry*, 287(19), pp.15345-15364.
- [Feitelson, 1969] FEITELSON, J. (1969). ENVIRONMENTAL EFFECTS ON THE FLUORESCENCE OF TYROSINE AND ITS HOMOLOGUES. *Photochemistry and Photobiology*, 9(5), pp.401-410.
- [Foderà, 2008] Foderà, V., Groenning, M., Vetri, V., Librizzi, F., Spagnolo, S., Cornett, C., Olsen, L., van de Weert, M. and Leone, M. (2008). Thioflavin T Hydroxylation at Basic pH and Its Effect on Amyloid Fibril Detection. *The Journal of Physical Chemistry B*, 112(47), pp.15174-15181.
- [Kumar, 2007] Kumar, S., Mohanty, S. and Udgaonkar, J. (2007). Mechanism of Formation of Amyloid Protofibrils of Barstar from Soluble Oligomers: Evidence for Multiple Steps and Lateral Association Coupled to Conformational Conversion. *Journal of Molecular Biology*, 367(4), pp.1186-1204.
- [Lee, 2009] Lee, D., Park, C., Paik, S. and Choi, K. (2009). The modification of α -synuclein by dicarbonyl compounds inhibits its fibril-forming process. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1794(3), pp.421-430.

- [Lorber, 2012] Lorber, B., Fischer, F., Bailly, M., Roy, H. and Kern, D. (2012). Protein analysis by dynamic light scattering: Methods and techniques for students. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 40(6), pp.372-382.
- [Ly, 2008] Ly, T. and Julian, R. (2008). Protein-metal interactions of calmodulin and α -synuclein monitored by selective noncovalent adduct protein probing mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 19(11), pp.1663-1672
- [Martínez-Orozco, 2019] Martínez-Orozco, H., Mariño, L., Uceda, A., Ortega-Castro, J., Vilanova, B., Frau, J. and Adrover, M. (2019). Nitration and Glycation Diminish the α -Synuclein Role in the Formation and Scavenging of Cu²⁺-Catalyzed Reactive Oxygen Species. *ACS Chemical Neuroscience*.
- [Makoska, 2016] Makowska, J., Żamojć, K., Wyrzykowski, D., Uber, D., Wierzbička, M., Wiczak, W. and Chmurzyński, L. (2016). Binding of Cu(II) ions to peptides studied by fluorescence spectroscopy and isothermal titration calorimetry. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 153, pp.451-456.
- [McCann, 2014]. McCann, H., Stevens, C., Cartwright, H. and Halliday, G. (2014). α -Synucleinopathy phenotypes. *Parkinsonism & Related Disorders*, 20, pp.S62-S67.
- [Nielsen, 2001] Nielsen, L., Khurana, R., Coats, A., Frokjaer, S., Brange, J., Vyas, S., Uversky, V. and Fink, A. (2001). Effect of Environmental Factors on the Kinetics of Insulin Fibril Formation: Elucidation of the Molecular Mechanism†. *Biochemistry*, 40(20), pp.6036-6046.
- [Ono, 2011] Ono, K., Ikeda, T., Takasaki, J. and Yamada, M. (2011). Familial Parkinson disease mutations influence α -synuclein assembly. *Neurobiology of Disease*, 43(3), pp.715-724.
- [Pall, 1987] Pall, H., Blake, D., Gutteridge, J., Williams, A., Lunec, J., Hall, M. and Taylor, A. (1987). RAISED CEREBROSPINAL-FLUID COPPER CONCENTRATION IN PARKINSON'S DISEASE. *The Lancet*, 330(8553), pp.238-241.
- [Peng, 2010] Peng, Y., Wang, C., Xu, H., Liu, Y. and Zhou, F. (2010). Binding of α -synuclein with Fe(III) and with Fe(II) and biological implications of the resultant complexes. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 104(4), pp.365-370.
- [Plotegher, 2014]. Plotegher, N., Gratton, E. and Bubacco, L. (2014). Number and Brightness analysis of alpha-synuclein oligomerization and the associated mitochondrial morphology alterations in live cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1840(6), pp.2014-2024.
- [Ponzini, 2019] Ponzini, E., De Palma, A., Cerboni, L., Natalello, A., Rossi, R., Moons, R., Konijnenberg, A., Narkiewicz, J., Legname, G., Sobott, F., Mauri, P., Santambrogio, C. and Grandori, R. (2019). Methionine oxidation in α -synuclein inhibits its propensity for ordered secondary structure. *Journal of Biological Chemistry*, 294(14), pp.5657-5665.
- [Ramis, 2017] Ramis, R., Ortega-Castro, J., Vilanova, B., Adrover, M. and Frau, J. (2018). A Systematic DFT Study of Some Plausible Zn(II) and Al(III) Interaction Sites in N-Terminally Acetylated α -Synuclein. *The Journal of Physical Chemistry A*, 122(2), pp.690-699.
- [Ranjan, 2017] Ranjan, P., Ghosh, D., Yarramala, D., Das, S., Maji, S. and Kumar, A. (2017). Differential copper binding to alpha-synuclein and its disease-associated mutants affect the aggregation and amyloid formation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1861(2), pp.365-374.
- [Rasia, 2005] Rasia, R., Bertocini, C., Marsh, D., Hoyer, W., Cherny, D., Zweckstetter, M., Griesinger, C., Jovin, T. and Fernandez, C. (2005). Structural characterization of copper(II) binding to α -synuclein: Insights into the bioinorganic chemistry of Parkinson's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(12), pp.4294-4299.
- [Rybicki, 1993] Rybicki, B., Johnson, C., Uman, J. and Gorell, J. (1993). Parkinson's disease mortality and the industrial use of heavy metals in Michigan. *Movement Disorders*, 8(1), pp.87-92.
- [Salahuddins, 2014]. Salahuddin, P., Rabbani, G. and Khan, R. (2014). The role of advanced glycation end products in various types of neurodegenerative disease: a therapeutic approach. *Cellular and Molecular Biology Letters*, 19(3).
- [Serpell, 2000] Serpell, L., Berriman, J., Jakes, R., Goedert, M. and Crowther, R. (2000). Fiber diffraction of synthetic alpha-synuclein filaments shows amyloid-like cross-beta conformation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(9), pp.4897-4902.
- [Shults, 2006] Shults, C. (2006). Lewy bodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(6), pp.1661-1668.

- [Stadtman, 2006]** Stadtman, E. (2006). Protein Oxidation in Aging and Age-Related Diseases. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 928(1), pp.22-38.
- [Sun, 2012]**. Sun, Y., Chang, Y., Chen, H., Su, Y., Su, H. and Li, C. (2012). Risk of Parkinson Disease Onset in Patients with Diabetes: A 9-year population-based cohort study with age and sex stratifications. *Diabetes Care*, 35(5), pp.1047-1049.
- [Theillet, 2016]**. Theillet, F., Binolfi, A., Bekei, B., Martorana, A., Rose, H., Stuver, M., Verzini, S., Lorenz, D., van Rossum, M., Goldfarb, D. and Selenko, P. (2016). Structural disorder of monomeric α -synuclein persists in mammalian cells. *Nature*, 530(7588), pp.45-50.
- [Uversky, 2001]** Uversky, V., Li, J. and Fink, A. (2001). Metal-triggered Structural Transformations, Aggregation, and Fibrillation of Human α -Synuclein. *Journal of Biological Chemistry*, 276(47), pp.44284-44296.
- [Wang, 2010]** Wang, L., Liu, R., Chi, Z., Yang, B., Zhang, P. and Wang, M. (2010). Spectroscopic investigation on the toxic interactions of Ni²⁺ with bovine hemoglobin. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 76(2), pp.155-160.
- [Wang, 2011]**. Wang, W., Perovic, I., Chittuluru, J., Kaganovich, A., Nguyen, L., Liao, J., Auclair, J., Johnson, D., Landeru, A., Simorellis, A., Ju, S., Cookson, M., Asturias, F., Agar, J., Webb, B., Kang, C., Ringe, D., Petsko, G., Pochapsky, T. and Hoang, Q. (2011). A soluble α -synuclein construct forms a dynamic tetramer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(43), pp.17797-17802.
- [Yang, 2017]** Yang, Y., Hsieh, T., Li, C., Liu, C., Lin, W., Chiang, J., Li, T. and Lin, C. (2017). Increased risk of Parkinson disease with diabetes mellitus in a population-based study. *Medicine*, 96(3), p.e5921.
- [Zhou, 2010]** Zhou, W., Long, C., Reaney, S., Di Monte, D., Fink, A. and Uversky, V. (2010). Methionine oxidation stabilizes non-toxic oligomers of α -synuclein through strengthening the auto-inhibitory intramolecular long-range interactions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1802(3), pp.322-330.