



Universitat
de les Illes Balears

EFECTO DE DIFERENTES MODIFICACIONES POST-TRADUCCIONALES SOBRE LA CAPACIDAD DE LA α -SINUCLÉINA PARA UNIRSE AL Cu(II) Y SOBRE SU CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

Humberto Martínez Orozco

Memoria del Trabajo de Fin de Máster

Máster Universitario en Ciencia y Tecnología Química
(Especialidad en Química Biológica)

de la

UNIVERSITAT DE LES ILLES BALEARS

Curso Académico 2016-2017

05 de septiembre del 2017

Nombre Tutor del Trabajo: Dr. Miquel Adrover Estelrich

Nombre Cotutor: Dr. Bartolomé Vilanova Canet

AGRADECIMIENTOS

Es para mí una fortuna haber podido concluir este proyecto en este país tan hermoso y, especialmente, en esta isla tan maravillosa como lo es Mallorca. Agradezco infinitamente a Fundación Carolina y a la Universidad de las Islas Baleares por esta oportunidad que ha sido satisfactoria desde el inicio hasta el final del máster.

Mi padre y mi abuelo siempre han inculcado en mí lo valioso que resulta ser el trabajo, y una vez más lo he visto con mis propios ojos, pues no hay nada más grato que los frutos que deja el esfuerzo. Agradezco de todo corazón a mi familia, amigos y seres queridos en México que han soportado mi ausencia, y quienes nunca han dejado de creer en mí.

Mi abuela siempre ha dicho que las cosas llegan a su debido momento y que nunca debemos de perder la fe. Ese momento culmina con este trabajo, que es producto de muchos y no solo mío, pues he caído en un grupo excepcional como lo es REACMOL. Agradezco a todos ellos y en especial a mis tutores, al Dr. Miquel Adrover y al Dr. Bartolomé Vilanova, así como a mi mentora, Laura Mariño, por todo su apoyo, atención y conocimientos inculcados que han fortalecido mi trayectoria académica.

Quiero agradecer a Biel Martorell y a Rosa Gomila por todo su apoyo en mis experimentos, y a todos los profesores del máster por sus sabios conocimientos impartidos. También quiero agradecer al Dr. Manolo Estela por brindarme un hogar y a la Dra. Carmen Rotger por todo su apoyo durante el máster.

Agradezco también a todas aquellas personas que hicieron de mi estancia la mejor visión que puedo tener de haber estudiado en Europa, los considero amigos y que sepan que pueden contar conmigo para lo que sea, pues hicieron de mis días en Mallorca de los mejores momentos que he vivido: Dr. David F. Payeras, Dr. Carlos Palomino, Dr. Rodrigo Casanovas, Joan Mas, Belen, Rafael Ramis, Mónica Umaña, Susana Gutierrez, Oscar Rodríguez, Esperanza Dalmau, Javier Downes, Paulino del Juan, Xisca Uve y al Dr. Rafael Minjares.

Gracias.

RESUMEN

La enfermedad de Parkinson (EP) es la segunda enfermedad neurodegenerativa de mayor prevalencia, y se caracteriza por la muerte de neuronas dopaminérgicas. La EP está asociada a la α -sinucleína (α Syn), una proteína nuclear y sináptica que forma agregados insolubles y que son causantes de la aparición de esta enfermedad. Distintos factores como las modificaciones post-traduccionales (MPTs), niveles elevados de metales y el estrés oxidativo aceleran la agregación de la α Syn. *In vivo*, MPTs como la glicación no enzimática o la nitración alteran su conformación y han sido asociadas con el incremento de estrés oxidativo a nivel celular. Sin embargo, recientemente se ha visto que la α Syn es capaz de inhibir la formación de especies reactivas de oxígeno y radicales libres durante la degradación oxidativa de ácido ascórbico catalizada por Cu(II), ya que posee la capacidad de unirse a este catión. El papel exacto de la α Syn como agente quelante y como reguladora del estrés oxidativo, así como los cambios que producen en ella dichas MPTs, no se conocen y, por esta razón, este trabajo aborda el estudio de la capacidad de la α Syn para unirse al Cu(II) y su capacidad antioxidante. Para ello, se ha inducido la modificación de la α Syn nativa mediante su glicación con metilglioxal, su alquilación reductiva y su nitración. Todas las α Syn producidas fueron caracterizadas y, posteriormente, estudiadas mediante diversas técnicas experimentales. Los resultados demostraron que las metodologías de producción y purificación utilizadas permiten la obtención de especies monoméricas con ausencia de oligómeros. Las MPTs alteran la capacidad de la α Syn para unirse a Cu(II) de forma diferente, de tal manera que la glicación con metilglioxal y la nitración disminuyen esta capacidad mientras que la modificación selectiva de las cadenas laterales de Lys con *N*-(carboximetil)-lisina y *N*-(carboxietil)-lisina la incrementan. La capacidad antioxidante de la α Syn también se ve afectada por la presencia de MPTs, y aunque existen diferencias entre una y otra, el efecto general de la modificación de la α Syn con las MPTs, es una mayor formación de especies reactivas de oxígeno y radicales libres y, en consecuencia, un incremento del estrés oxidativo.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	7
1.1 La enfermedad de Parkinson	7
1.1.1 Prevalencia y etiología	7
1.1.2 Primeras evidencias patológicas de la enfermedad de Parkinson.....	8
1.2 La sinapsis en el Sistema Nervioso Central.....	8
1.2.1 Procesos sinápticos y tráfico de vesículas	8
1.3 La α -sinucleína	9
1.3.1 Estructura y función	9
1.3.2 La agregación y su implicación patológica	11
1.3.3 Capacidad de unión a metales	12
1.4. Estrés oxidativo	13
1.4.1 Origen y descripción de las especies reactivas de oxígeno: Funciones y su relación con la enfermedad de Parkinson.....	13
1.5 Las modificaciones post-traduccionales sobre la α -sinucleína.....	15
1.5.1 Glicación	16
1.5.2 Implicaciones patológicas de la glicación de la α -sinucleína.....	16
1.5.3 Nitración.....	17
1.5.4 Implicaciones patológicas de la nitración de la α -sinucleína	18
2. OBJETIVO.....	19
3. MATERIALES Y MÉTODOS	20
3.1 Materiales	20
3.1.1 Disoluciones tampón utilizadas.....	20
3.2 Métodos experimentales.....	20
3.2.1 Obtención, purificación y caracterización de la α -sinucleína nativa y especies modificadas.	20
3.2.1.1 α -sinucleína nativa	20
3.2.1.2 α -sinucleína glicada con metilglioxal.....	22
3.2.1.2.1 Determinación del Coeficiente de Absorción Molar de α -sinucleína glicada	22
3.2.1.3 α -sinucleína nitrada	23
3.2.1.3.1 Determinación del Coeficiente de Absorción Molar de la α -sinucleína nitrada.....	24
3.2.1.4 Síntesis química de α Syn-CEL y α Syn-CML	24
3.2.1.5 Digestión proteolítica de la α -sinucleína nativa	25

3.2.2 Inhibición de la degradación de ácido ascórbico.....	26
3.2.3 Estudio de la cinética de formación del radical $\cdot\text{OH}$	27
3.2.4 Estudio de la capacidad para neutralizar radicales $\cdot\text{OH}$ y $\cdot\text{O}_2^-$	27
3.2.4.1 Radical $\cdot\text{OH}$ (método CUPRAC).....	27
3.2.4.2 Radical $\cdot\text{O}_2^-$ (método NBT).....	29
3.2.4.3 Efecto de los radicales libres sobre el peso molecular proteico.	30
3.2.5 Ensayo de peróxido de hidrógeno	30
3.2.6 Calorimetría de valoración isotérmica.....	31
4. RESULTADOS.....	32
4.1 Producción, purificación y caracterización de la α -sinucleína nativa y modificadas químicamente	32
4.2 Determinación de la concentración de α -sinucleína glicada y nitrada	36
4.3 El efecto de las modificaciones post-traduccionales en la capacidad de unión a Cu(II)	37
4.4 Las modificaciones post-traduccionales de la α -sinucleína alteran su poder de protección sobre la degradación oxidativa del ácido ascórbico	41
4.5 La αSyn nativa es capaz de inhibir la formación y secuestrar radicales libres	44
4.6 La glicación y nitración de α -sinucleína alteran su capacidad antioxidante.....	46
4.6.1 La glicación con metilglioxal	47
4.6.2 Modificación química (alquilación reductiva)	49
4.6.3 Nitración con tetranitrometano.....	50
5. CONCLUSIONES	54
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

1. INTRODUCCIÓN

1.1 La enfermedad de Parkinson

1.1.1 Prevalencia y etiología

La enfermedad de Parkinson (EP) se ha convertido en la segunda enfermedad neurodegenerativa de mayor prevalencia (Cacabelos, 2017). Su tasa de incidencia mundial se estima entre 1.2-22/100000 personas por año (Wirdefeldt, 2011), principalmente en personas de entre 70-79 años. En España, existen al menos 300000 casos con EP, suponiendo un coste anual de 17000€ por paciente (García-Ramos, 2016).

La EP se caracteriza por la degeneración de neuronas dopaminérgicas de la *substantia nigra* y la consecuente disminución en la producción de dopamina cerebral (Wirdefeldt, 2011). Los pacientes con EP suelen presentar: temblores, rigidez, acinesia, bradicinesia y anomalías en la postura (Hamani, 2003). En la *substantia nigra* se originan las señales de movimiento voluntario que son dirigidas hacia el área motora de la corteza cerebral, concretamente hacia las neuronas motoras inferiores, mediante procesos sinápticos accionados por dopamina. En la EP la disminución de la concentración de dopamina produce un incremento en la inhibición de estas señales y, por lo tanto, se altera el control de los movimientos voluntarios sobre los músculos (**Fig. 1**).

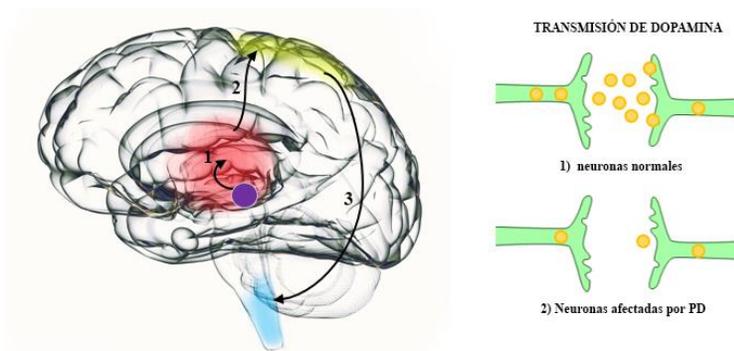


Figura 1. Transmisión de dopamina. Representación esquemática de la *substantia nigra* (morado), ganglios basales (rojo), región motora de la corteza cerebral (amarillo) y neuronas motoras inferiores (azul). En las neuronas dopaminérgicas normales, la producción de dopamina promueve la actividad de los ganglios basales (1) sobre el control de los movimientos voluntarios mediante circuitos neuronales con el área motora de corteza cerebral (2) y las neuronas motoras inferiores (3). Dicha función es afectada en pacientes con EP donde los niveles de dopamina se observan disminuidos.

1.1.2 Primeras evidencias patológicas de la enfermedad de Parkinson

En 1919 se realizó un estudio post-mortem de la *substantia nigra* en 54 cerebros de pacientes con EP. En todos los casos se observó la pérdida de neuronas dopaminérgicas y la presencia de depósitos intracelulares (Trétiakoff, 1919) denominados “cuerpos de Lewy”, en honor a su descubridor, el neuropatólogo Friedrich H. Lewy. Estos depósitos también fueron encontrados en cerebros de pacientes con la enfermedad de Alzheimer (EA) (Joachim, 1992). Estudios inmunohistoquímicos revelaron que la α -sinucleína (α Syn) constituye el componente principal de los cuerpos de Lewy (Spillantini, 1997). A raíz de ello, surgieron numerosas investigaciones que se centraron en descifrar la manera en que la α Syn se asociaba a la EP.

1.2 La sinapsis en el Sistema Nervioso Central

1.2.1 Procesos sinápticos y tráfico de vesículas

Las alteraciones del control de movimientos voluntarios asociadas al EP implican una serie de modificaciones en la sinapsis, proceso que conlleva el intercambio de información en el cerebro mediante el trabajo conjunto de las neuronas (Südhof, 1995). La sinapsis ocurre dentro de zonas especializadas en los espacios extracelulares. Dichas zonas están compuestas por axones que actúan como polo transmisor y dendritas que funcionan como polos receptores (Ferreira, 2002).

Durante la sinapsis se movilizan cientos de sustancias químicas, denominadas neurotransmisores (NT). Estas moléculas regulan la comunicación interneuronal mediante excitación o inhibición de las señales que van dirigidas hacia los distintos tejidos del cuerpo. La liberación de NT ocurre mediante un proceso denominado tráfico de vesículas (Südhof, 1995). Inicialmente, los NT son empaquetados en vesículas sinápticas (VS) y son movilizados a la membrana plasmática en respuesta a estímulos. Posteriormente, el NT es liberado por exocitosis, proceso regulado por la acción de iones Ca^{2+} . Finalmente, un proceso de endocitosis recicla los componentes fosfolipídicos de las vesículas para que sean utilizadas nuevamente. Cada ciclo de sinapsis se da en aproximadamente 1 min, en el que la fase de fusión/exocitosis ocurre en aproximadamente 1 ms (Betz, 1992; Ryan, 1993).

El tráfico de VS implica múltiples fases en las que participan distintas proteínas y lípidos, aunque el mecanismo exacto mediante el cual ocurre no se conoce todavía. Las VS se agrupan en “piscinas de reserva” (PRVS) y son liberadas en función de la respuesta a estímulos (Esposito, 2012). El proceso de movilización de PRVS depende de la producción de ATP mitocondrial (Verstreken, 2003). Las PRVS son movilizadas y preparadas para la fusión mediante la acción de un complejo formado por tres proteínas: sinaptobrevina, syntaxina y SNAP25 (Rizo, 2008). La fase de fusión, durante la exocitosis, está controlada por el flujo de Ca^{2+} en respuesta a la despolarización de la membrana plasmática (Nizami, 2010). El Ca^{2+} se enlaza a la proteína reguladora sinaptotagmina e induce cambios conformacionales que fuerzan la fusión de las PRVS (Südhof, 2009) y a la liberación de la dopamina al espacio sináptico. Finalmente, proteínas como la endofilina, dinamina y Rab5, regulan la endocitosis de fosfolípidos para el reciclaje de las PRVS (Esposito, 2012). La dopamina que no ha sido utilizada durante la sinapsis es bombeada de vuelta hacia el citoplasma (Takahashi, 1997).

1.3 La α -sinucleína

1.3.1 Estructura y función

La α Syn es una proteína nuclear y presináptica, presente en altas concentraciones en las terminaciones neuronales, bien en forma soluble o asociada a la membrana (Maroteaux, 1988; Maroteaux, 1991; Breydo, 2012). Esta proteína es codificada por el gen SNAC localizado en la región 4q21-q22 del genoma humano, su peso molecular es de 14460 Da y se compone de 140 aminoácidos (Chen, 1995). La α Syn presenta tres dominios: un extremo N-terminal (M1-N65), un dominio central NAC (V66-V95) y el extremo C-terminal (K96-A140) (Jakes, 1994). Además, la α Syn presenta siete repeticiones del motivo KTKEGV altamente conservado en los dominios N-terminal y NAC (Breydo, 2012).

La α Syn es una proteína monomérica e intrínsecamente desordenada (IDPs) y por ello, carece de estructura secundaria. Sin embargo, existen dos corrientes opuestas que difieren en la descripción estructural de su estado nativo. Estudios de sedimentación (Weinreb, 1996), de dicroísmo circular y de FTIR (Uversky, 2001b) demostraron que la α Syn es un monómero elongado y completamente desplegado. Por otro lado, se observó que la α Syn obtenida a partir de eritrocitos adoptaba una estructura helicoidal en forma tetramérica

(Bartels, 2011). Sin embargo, estudios posteriores concluyeron que la α Syn obtenida de cerebro de ratas, de glóbulos rojos y expresada en *E. coli*, se encontraba en forma monomérica y desplegada (Burré, 2013; Fauvet, 2012a).

La función concreta de la α Syn no se conoce con exactitud. Su presencia en las terminaciones nerviosas apunta que podría participar en la neurotransmisión y en la sinapsis (Maroteaux, 1988). Sin embargo, prácticamente no influye en la señalización presináptica (Withers, 1997) y la supresión del gen que codifica para la α Syn en ratones, prácticamente no afecta al desarrollo y diferenciación neuronal (Abeliovich, 2000).

En los últimos años han surgido evidencias que apuntan a la implicación directa de la α Syn en los procesos neuronales mediante su unión a membranas. La α Syn es capaz de unirse a VS de pequeño diámetro (Davidson, 1998), modificando su tamaño (Murphy, 2000). La α Syn carece de un dominio transmembranal o de anclaje lipídico, lo cual sugiere que su interacción con las membranas ocurre de forma similar a como lo hace en vesículas artificiales (Bendor, 2013); es decir, mediante la formación de una α -hélice con propiedades anfipáticas en la región N-terminal (Davidson, 1998). Estudios *in vivo* sobre extractos cerebrales demostraron que la α Syn se une fuertemente a las PRVS (Fortin, 2004).

Experimentos *in vitro* e *in vivo* demostraron que la α Syn actúa como reguladora de la pre-sinapsis, estabilizando el complejo SNARE-sinaptobrevina-2/VAMP2 (Burré, 2010), por lo que puede considerarse como una chaperona (Burré, 2014). Estas observaciones sugieren que los cambios conformacionales adoptados por la α Syn permiten su asociación a membranas para regular el acondicionamiento de las VS, su fusión a membrana plasmática mediante la unión al complejo SNARE y, por lo tanto, su influencia sobre la liberación de dopamina al espacio sináptico.

Recientemente, se constató que la α Syn participa en la regulación del Ca(II) mitocondrial al favorecer las interacciones entre el retículo endoplásmico y la mitocondria (Cali, 2012). Además, se asocia a las membranas MAM (mitochondria-associated endoplasmic reticulum membranes) que regulan distintas funciones fisiológicas de la mitocondria (Guardia-Laguarta, 2015).

A su vez, la α Syn puede formar complejos con diversos iones metálicos como Al, Ca, Cu, Fe, Pb, Mg, Mn y Zn (Breydo, 2012). El papel fisiológico de la α Syn como agente quelante todavía no está claro. La unión de metales a la α Syn induce cambios

conformacionales y promueve su agregación (Paik, 1999; Uversky, 2001a). Sin embargo, estudios *in vitro* han demostrado que la formación del complejo α Syn-Cu(II) inhibe la capacidad de dicho ion para catalizar la formación de radicales libres (Pedersen, 2016).

1.3.2 La agregación y su implicación patológica

Las neuronas de pacientes con EP presentan diferentes tipos de agregados: cuerpos de Lewy, neuritas de Lewy o depósitos esféricos en los axones (Giasson, 2001). La α Syn es el componente mayoritario de los cuerpos de Lewy (Spillantini, 1997), tanto en forma de fibras amiloideas como de oligómeros (Hashimoto, 1998; Wang, 2016). Sin embargo, el tejido periférico no se ve afectado en la EP debido a que la α Syn plasmática no forma agregados (Miller, 2004; Bartels, 2011).

El mecanismo de formación de los agregados de α Syn se inicia a partir del monómero, el cual puede sufrir cambios conformacionales que dan lugar a especies intermedias parcialmente plegadas (Uversky, 2001b). Éstas actúan como moldes para el ensamblaje de otros monómeros, formando oligómeros solubles. Posteriormente, dichos oligómeros sufren un crecimiento que tiene como resultado la formación final de fibras amiloideas (**Fig. 2**)(Wood, 1999).

Estudios de difracción de rayos X de fibras de α Syn muestran un patrón estructural característico que consiste en la formación de láminas β colocadas de forma perpendicular al eje longitudinal de la fibra (Serpell, 2000). Estas están esencialmente constituidas por 12 aminoácidos ($V^{71}TGVTAVAQTV^{86}$) del dominio NAC (Giasson, 2001) y dicha organización implica un incremento de la hidrofobicidad de la estructura.

Las mutaciones detectadas en α Syn que inducen el desarrollo de EP son esencialmente la A30P (Krüger, 1998) y la E46K (Zarranz, 2004), las cuales aceleran la formación de oligómeros y fibras (Ono, 2011). Sin embargo, no sólo las mutaciones influyen sobre la velocidad de agregación. Otros factores endógenos y exógenos como metales, pesticidas, modificaciones post-traduccionales (MPTs) e interacciones proteína-proteína (Deleersnijder, 2013) pueden facilitar la formación de agregados.

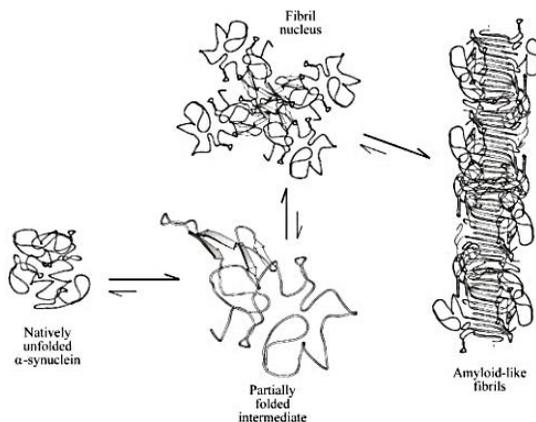


Figura 2. Modelo de fibrilación de la α Syn. (Uversky, 2001b).

1.3.3 Capacidad de unión a metales

Algunos metales de transición son esenciales para la vida, ya que participan en muchos de los mecanismos de óxido-reducción. En 1997, un estudio poblacional demostró que la exposición crónica a metales como Fe, Cu, Mn, Hg y Zn constituía un factor de riesgo asociado a la EP (Gorell, 1997). A partir de ello, se empezó a investigar la capacidad de la α Syn para unirse a metales, hecho que en muchos casos (como es el del Cu(II)) implica la modificación de las propiedades estructurales y funcionales de la proteína.

Fisiológicamente, el Cu(II) forma complejos con diferentes biomoléculas como la ceruloplasmina, la albúmina o la transcupreina (Paik, 1999). Sin embargo, son muchas otras las que pueden coordinarlo, hecho que implica la propia disfunción de la biomolécula.

Diferentes estudios han demostrado que la α Syn se une al Cu(II) mediante una estequiometría 1:1 (Moriarty, 2014). Sin embargo, experimentos de calorimetría de valoración isotérmica (ITC) demostraron que la α Syn presentaba dos lugares independientes de unión al Cu(II). Uno entre los residuos 1-9 (MDVFMKGLS) y el otro entre 48-52 (VAHGV), con valores de K_d de 1.7 y 13 μ M respectivamente (Bharathi, 2007). La región 1-9 es la de mayor afinidad y se une mediante el grupo amino de la Met1, el nitrógeno amida y el carboxilato de la Asp2 (Binolfi, 2010). Además, la His50 juega un papel crucial en la unión (Dudzik, 2011; Drew, 2008), ya que junto a la Met1 y al Asp2 coordina el átomo de Cu(II) (Rasia, 2005; De Ricco, 2015). La unión del Cu(II) en la región N-terminal de α Syn promueve la formación de estructuras cuaternarias mediante interacciones intermoleculares a través de la coordinación del Cu(II) (Drew, 2015).

Por otra parte, se ha observado que la α Syn aislada de muestras biológicas presenta su región N-terminal acetilada (Bartels, 2011; Fauvet, 2012b). Su acetilación no induce cambios conformacionales destacables (Fauvet, 2012b), pero inhibe la capacidad de la región N-terminal para formar complejos con Cu(II) (Moriarty, 2014). La forma N-acetilada de la α Syn únicamente puede unirse a este catión en otros sitios de menor afinidad, como la región 48-52 y la región C-terminal, que abarca los aminoácidos 110-140 interaccionando con los residuos Asp119, Asp121, Asn122 y Glu123 (Moriarty, 2014; Rasia, 2005).

Se ha observado que la α Syn en presencia de Cu(II) y H₂O₂ sufre reacciones de oxidación que inducen a su oligomerización (Paik, 2000). Los oligómeros formados a partir del complejo α Syn-Cu(II) se estabilizan mediante la formación de interacciones electrostáticas de largo alcance entre las regiones N- y C-terminales, las cuales aumentan su solubilidad y dificultan su elongación (Bertoncini, 2005). Sin embargo, las fibras formadas a partir de estos complejos presentan una estructura similar a la observada en las generadas en ausencia de metal (Rasia, 2005). Por otra parte, la agregación de la α Syn se acelera cuando esta se une al Al(III) o al Fe(III) (Uversky, 2001a), metales que facilitan su nucleación (Fernández, 2004).

1.4. Estrés oxidativo

1.4.1 Origen y descripción de las especies reactivas de oxígeno: Funciones y su relación con la enfermedad de Parkinson

El estrés oxidativo se define como la perturbación del equilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y los antioxidantes, lo que generalmente induce daño tisular (Halliwell, 1994).

Las ROS se producen a partir del oxígeno molecular como resultado de los procesos metabólicos normales en las células. Existen dos tipos de ROS: i) los radicales libres que contienen electrones no apareados, hecho que les otorga una elevada reactividad; ii) y los radicales no libres, que se originan a partir de dos radicales libres que comparten sus electrones no apareados. En las células esencialmente se generan tres tipos de ROS: el radical hidroxilo (\cdot OH), el anión superóxido (\cdot O₂⁻) y el peróxido de hidrógeno (H₂O₂).

El **radical hidroxilo** ($\cdot\text{OH}$) se genera a partir de la reducción de una molécula de oxígeno molecular (O_2). Una vez formado, el $\cdot\text{OH}$ puede oxidar lípidos, proteínas o ADN mediante reacciones sucesivas (1, 2 y 3) (Miller, 1990).



El **anion superóxido** ($\cdot\text{O}_2^-$) no es tan reactivo como el $\cdot\text{OH}$, pero puede ser convertido fácilmente a H_2O_2 por la acción de la enzima superóxido dismutasa que cataliza la reacción (4) (Lotharius, 2002).



Al igual que el anión $\cdot\text{O}_2^-$, el **peróxido de hidrógeno** (H_2O_2) presenta baja reactividad, pero puede degradarse formando radicales $\cdot\text{OH}$ mediante reacciones catalizadas por Fe^{2+} o Cu^{2+} (reacción de Fenton) (Halliwell, 1990).

Las ROS, especialmente los radicales $\cdot\text{OH}$, causan la oxidación de biomoléculas y, en consecuencia, propician el desarrollo patológico (Halliwell, 1994; Horton, 1987). Cuando diferentes ROS actúan de forma combinada, los efectos tóxicos son más potentes. Por ejemplo, la peroxidación de lípidos suele ocurrir debido a la acción simultánea de $\cdot\text{O}_2^-$ y H_2O_2 en presencia de Fe^{2+} o Cu^{2+} , hecho que da lugar a peróxidos lipídicos que alteran la fluidez de la membrana celular e incrementan la permeabilidad de iones Ca^{2+} , hecho que causa la muerte celular (Halliwell, 1992).

La formación de ROS también juega un papel importante en diversas rutas de señalización, por lo que resultan de importancia en la homeostasis del cuerpo humano. Por ejemplo, el anión $\cdot\text{O}_2^-$ actúa como señalizador de la fagocitosis (Wu, 2003); mientras que el H_2O_2 actúa como molécula de señalización durante la regulación de la apoptosis y la proliferación celular (Hachiya, 2005).

La oxidación de la dopamina en presencia de oxígeno constituye uno de los mecanismos principales de formación de ROS en las neuronas (Pileblad, 1988). Este proceso está relacionado con la sobreproducción de Fe(II) , cofactor de la tirosina hidroxilasa,

implicada en la síntesis de dopamina. A raíz de ello, se forma dopaminquinona, $\cdot\text{O}_2^-$ o H_2O_2 (Graham, 1978). Estos ROS favorecen el plegamiento de la αSyn y aceleran su agregación (Kim, 2002). Por otro lado, la dopaminquinona modifica la αSyn mediante la formación de aductos covalentes que inhiben la formación de fibras pero aumentan la cantidad de protofilamentos (Conway, 2001). Así, dichas modificaciones químicas disminuyen la capacidad de la αSyn para unirse a las membranas y al complejo SNARE, modificando el proceso de formación de VS.

A su vez, los complejos de αSyn con cationes metálicos promueven también la formación de ROS en el interior de las neuronas, proceso observado esencialmente para las formas oligoméricas de la αSyn (Chen, 2015).

Sin embargo, estudios *in vitro* han demostrado que la formación del complejo entre la αSyn monomérica nativa y el Cu(II) inhibe la formación de ROS debido a la disminución en la concentración de Cu(II) libre en solución. Así, mediante la formación del complejo αSyn -Cu(II) se evita que este catión catalice la formación de $\cdot\text{O}_2^-$, H_2O_2 y $\cdot\text{OH}$ (Guilloreau, 2007). A su vez, se ha constatado que la αSyn monomérica presenta una alta eficacia *in vitro* captando radicales $\cdot\text{OH}$ (Pedersen, 2016), proceso que explicaría la elevada susceptibilidad de dicha proteína a modificar su función y estructura en presencia de ROS.

1.5 Las modificaciones post-traduccionales sobre la α -sinucleína

Las MPTs son modificaciones químicas que se dan sobre las proteínas una vez han sido sintetizadas. Una MPT generalmente implica la adición covalente de un grupo funcional sobre un sitio específico de la proteína, hecho que influye directamente sobre su funcionalidad (Duan, 2015).

Son diversas las MPTs detectadas *in vivo* sobre la αSyn , tales como la fosforilación, la ubiquitinación, la nitración, la acetilación, etc. (Giráldez-Pérez, 2014). Además, la αSyn aislada de los cuerpos de Lewy de personas con EP suele presentar MPTs (Beyer, 2013), por lo que su estudio es de crucial importancia en la comprensión de los mecanismo moleculares que inducen al desarrollo del EP.

En el presente trabajo, se estudian dos de las MPTs que ocurren *in vivo* de forma aberrante (no enzimática) y que se asocian con el incremento del estrés oxidativo en pacientes con EP. Éstas son la glicación y la nitración.

1.5.1 Glicación

La glicación proteica es una MPT descrita inicialmente en alimentos por Louis-Camille Maillard. Se inicia con la formación reversible de una base de Schiff a partir de la reacción entre el grupo carbonilo de azúcares y grupos amino de las proteínas (Maillard, 1912). Posteriormente, dicha base de Schiff se reordena formando un compuesto de Amadori (Hodge, 1955), que finalmente evoluciona formando los productos finales de la glicación (AGEs) (Ahmed, 2003). A su vez, los productos de Amadori pueden sufrir autoxidación, generando compuestos dicarbonílicos o α -oxoaldehídos como el glioxal (GO), el metilglioxal (MGO) o la 3-deoxiglucosona (3-DG) (Baynes, 1999), los cuales contribuyen también a la formación de AGEs (Münch, 2000). Los AGEs suelen ser compuestos de color amarillocafé, fluorescentes e insolubles que se acumulan en las proteínas alterando sus funciones y estructura (Lapolla, 2005). Además de perder sus funciones específicas, las proteínas modificadas mediante AGEs incrementan su susceptibilidad a degradarse, liberando AGEs en el organismo, los cuales presenta elevada toxicidad (Singh, 2014).

El MGO es el α -oxoaldehído más reactivo, concretamente es un 20000% más reactivo que la glucosa y es el agente glicante más importante en el espacio intracelular (Thornalley, 2005). Por ello, en el presente estudio se ha utilizado el MGO como agente glicante de la α Syn, una proteína también intracelular. El MGO intracelular se produce debido a la degradación del gliceraldehído-3-fosfato (GAP) y dihidroxiacetona fosfato (DHAP) (Phillips, 1993), aunque también se origina durante las reacciones de autoxidación de los carbohidratos, bases de Schiff y compuestos de Amadori. En cualquier caso, el MGO reacciona con las lisinas proteicas formando *N*-(carboxietil)-lisina (CEL) (Ahmed, 1997) y dímero de MGO-Lys (MOLD) (Frye, 1998).

1.5.2 Implicaciones patológicas de la glicación de la α -sinucleína

Es sabido que los pacientes con EP modifican su tolerancia a la glucosa (Boyd, 1971; Sandyk, 1993). Consecuentemente, muchos de ellos presentan hiperglucemia (Lipman, 1974), hecho que relaciona a la diabetes mellitus del tipo 2 con la EP. De hecho, experimentos realizados en ratones con EP demostraron que el incremento en la ingesta de grasas induce la degeneración de neuronas dopaminérgicas (Morris, 2010) y acelera la aparición de defectos locomotores (Rotermund, 2014). Además, estas dietas producen un incremento en los niveles

de glucosa y de MGO, favoreciendo la glicación. El exceso de MGO puede reaccionar con la α Syn, entre otras proteínas, induciendo resistencia a la degradación proteolítica y facilitando su oligomerización (Vicente Miranda, 2016).

Los AGEs formados durante la glicación proteica son reconocidos por receptores específicos: los RAGEs (Schmidt, 2000). En pacientes con EP, los niveles de RAGEs se incrementan notablemente (Dalfó, 2005), lo que prueba que la glicación está directamente relacionada con la EP.

El mecanismo exacto de agregación de la α Syn glicada se desconoce. Ni siquiera se tienen indicios si éste podría ser similar al de la nativa. La α Syn glicada con MGO (α Syn-MGO) *in vitro* no altera su estado desordenado (Dalfó, 2005). Sin embargo, se ha constatado que los oligómeros obtenidos a partir de la α Syn-MGO son más tóxicos que los obtenidos a partir de la α Syn nativa. Dichos oligómeros interactuarían con las membranas y modificarían su permeabilidad mediante la formación de poros, alterando severamente la homeostasis y, posteriormente, induciendo la muerte neuronal. Además, es importante mencionar que las proteínas glicadas son capaces de contribuir a la formación de ROS. Así, la α Syn-MGO podría incrementar las concentraciones de ROS intracelulares que, a su vez, incrementarían la relevancia del binomio estrés oxidativo/glicación (Guerrero, 2013).

Otras de las posibles implicaciones patológicas de la α Syn glicada sucederían a nivel del DNA. La α Syn nativa es capaz de interactuar con el DNA modificando su estructura. Por tanto, la glicación de la α Syn probablemente modifique el efecto de dicha interacción así como su estabilidad (Guerrero, 2013). Además, los AGEs son capaces de interactuar con las histonas H1, de tal manera que la α Syn-MGO podría afectar a la organización de la cromatina y a la expresión genética (Pashikanti, 2011).

1.5.3 Nitración

La nitración es una MPT relacionada con el incremento del estrés oxidativo que contribuye al daño neuronal y con ello, al desarrollo de enfermedades neurodegenerativas (Burai, 2015). Durante el estrés oxidativo se forman radicales libres como el $\text{NO}\cdot$ y el $\cdot\text{O}_2^-$, los cuáles reaccionan entre sí para formar peroxinitrito (ONOO^-) (Beckman, 1994), altamente tóxico debido a su elevada capacidad oxidante. A su vez, el NO_2 también puede reaccionar con el $\cdot\text{O}_2^-$ para generar ONOO^- . Sin embargo, la formación de NO_2 es un proceso normal y las

células son capaces de eliminarlo (Beckman, 1996). Bajo ciertas condiciones, el ONOO^- es degradado al radical $\text{NO}_2\cdot$, el cual reacciona directamente con los residuos de Tyr de las proteínas para formar 3-nitrotirosina (Radi, 2004). Esta MPT ha sido detectada en las Tyr39, Tyr125, Tyr133 y Tyr136 de αSyn presente en cuerpos de Lewy en pacientes con EP (Giasson, 2000). Durante la reacción de las Tyr con ONOO^- se pueden formar ditirosinas al establecerse de forma cruzada un enlace carbono-carbono entre dos tirosinas cercanas (Balasubramanian, 2017) y con ello, la formación de oligómeros.

1.5.4 Implicaciones patológicas de la nitración de la α -sinucleína

Poco se sabe del papel de la αSyn nitrada en el desarrollo de la EP. Sin embargo, experimentos *in vivo* en ratas modelo han demostrado que la nitración de αSyn produce una mezcla de monómeros y oligómeros de proteína nitrada cuya toxicidad neuronal es mayor que la de las especies obtenidas a partir de la αSyn nativa. La acción de las diferentes formas nitradas de la αSyn induce la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la *substantia nigra* (Yu, 2010). También, se ha identificado la presencia de 3-nitrotirosina en cuerpos de Lewy, sugiriendo que la nitración y el estrés oxidativo participan de alguna manera en la formación de agregados (Duda, 2000). Finalmente, es importante destacar que la formación de fibras de αSyn nitrada activa los procesos inflamatorios, acelerando la degradación de neuronas dopaminérgicas (Reynolds, 2008).

2. OBJETIVO

Este trabajo de fin de máster presenta el objetivo general de evaluar los efectos de diferentes MPTs sobre la capacidad de la α Syn para inhibir/estimular la formación de radicales libres.

Este objetivo general, se puede desglosar en los siguientes objetivos parciales.

- a) Producción, purificación y caracterización de la α Syn nativa y modificada.
- b) Efecto de las MPTs sobre la capacidad de la α Syn para unirse a Cu(II).
- c) Efecto de las MPTs sobre la capacidad antioxidante de la α Syn (radicales \cdot OH, anión \cdot O₂⁻ y H₂O₂).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales

Los compuestos utilizados en este trabajo, excepto la α Syn, fueron comprados a las empresas Sigma-Aldrich, Scharlau, ACROS Organics o Dosindos. Para la realización de los diferentes trabajos experimentales, se utilizó agua ultrapura obtenida mediante el sistema de purificación Milli-Q® de Millipore Corporation. La diálisis de las diferentes muestras se realizó utilizando membranas Slide-A-Lyzer® de Thermo Scientific, con un peso molecular de corte de 2000-3500 Da.

3.1.1 Disoluciones tampón utilizadas

Disolución Tampón (DT)

DT1. TRIS-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, PMSF/Pefabloc SC 1 mM, pH 8.0

DT2. TRIS-HCl 10 mM, pH 7.4

DT3. TRIS-HCl 10 mM, NaCl 600 mM, pH 7.4

DT4. Fosfato sódico 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4

DT5. TRIS-HCl 0.1 M, KCl 0.1 M, pH 8.0

DT6. Fosfato sódico 150 mM, pH 7.4

DT7. Fosfato sódico 100 mM, pH 7.4

DT8. Fosfato sódico 20 mM, pH 9.0.

3.2 Métodos experimentales

3.2.1 Obtención, purificación y caracterización de la α -sinucleína nativa y especies modificadas

3.2.1.1 α -sinucleína nativa

Para obtener la α Syn nativa se utilizó una cepa de *E.coli* modificada genéticamente con un plásmido que incluye la secuencia de nucleótidos que traducida, genera la α Syn, así como la de una β -lactamasa que brinda resistencia a ampicilina. Una alícuota (2 μ l) de una suspensión celular de dicha cepa, se adicionó a 25 mL del medio de cultivo Luria Bertani (LB) (25 g/L), previamente esterilizado. Se adicionó ampicilina (100 μ g/mL) y se incubó durante 12 h a 37 °C y 180 rpm. Posteriormente, la suspensión celular resultante se adicionó a 1 L de medio

LB que contenía ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y se incubó a 37 °C/180 rpm hasta que la disolución presentó una absorbancia a 600 nm >0.6 . Posteriormente, se adicionó 1 mL de isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) 1 M con el fin de inducir la expresión proteica, y se incubó a 37 °C y 180 rpm durante 4 h. Las células fueron separadas del medio mediante centrifugación (4 °C, 4000 rpm durante 15 min) y el pellet resultante se re-suspendió en DT1 mediante agitación durante 1 h en un baño de hielo (SP1). Posteriormente, se llevó a cabo la lisis celular en SP1 mediante tres ciclos de 2 min en un baño de ultrasonido (SP2). Se centrifugó SP2 a 10000 xg y 4 °C durante 20 min con el fin de descartar el precipitado y recuperar el sobrenadante. Se añadió sulfato de estreptomicina a dicho sobrenadante hasta una concentración de 1% (m/v) y se agitó durante 1 h en baño de hielo con el fin de precipitar los ácidos nucleicos (SP3). Se centrifugó SP3 a 13500 xg y 4 °C durante 30 min y se recuperó el sobrenadante al que se añadió sulfato de amonio hasta una concentración de 0.295 g/mL, momento en que se agitó durante 1 h en baño de hielo con el fin de precipitar la αSyn producida (SP4). La solución SP4 se centrifugó a 13500 xg y 4 °C durante 30 min y se descartó el sobrenadante. El precipitado fue disuelto en 1/20 veces el volumen inicial de medio LB en DT2.

La αSyn nativa fue purificada utilizando un equipo cromatográfico GE ÄKTA Start equipado con colector de fracciones Frac30, y utilizando una columna de intercambio aniónico GE Healthcare RESOURCETM Q de 6 mL. Se aplicó un gradiente de NaCl desde 0 a 600 mM utilizando DT2 y DT3 como fase móvil, con un flujo de 4 mL/min. El método de detección fue UV-VIS utilizando una longitud de onda de 280 nm.

La caracterización tanto de la αSyn como de su grado de pureza se realizó mediante el uso combinado de electroforesis y MALDI-TOF/TOF. Para la electroforesis SDS-PAGE se utilizó un gel BIORAD Mini-PROTEAN® TGXTM, utilizando 30 μL de la αSyn purificada previamente tratado con una disolución Laemmi+DTT. La electroforesis se llevó a cabo a 180 V durante 2 h y el gel fue teñido con colorante azul Coomassie®. La espectroscopia MALDI-TOF/TOF se utilizó para determinar la masa molecular de la αSyn producida. 1 μL de muestra desalinizada se mezcló con 1 μL de la disolución matriz (10 mg de ácido sinapínico en una disolución de acetonitrilo:agua 50:50 con ácido trifluoroacético (TFA) al 0.1%) y se colocaron sobre una placa de acero (MPT 384). La muestra fue secada con aire y se analizó por duplicado en un espectrómetro Bruker Autoflex III MALDI-TOF/TOF,

equipado con un láser de N₂ pulsado de 200-Hz. Los voltajes de las fuentes de ionización 1 y 2 fueron de 20 kV y 18.5 kV, respectivamente. El voltaje de la lente fue de 7.5 kV. La calibración se realizó utilizando un test estándar bacterial de Bruker (3600-17000 Da).

Posteriormente, la muestra purificada de α Syn se dializó en DT4 y su concentración se determinó mediante absorbancia UV-VIS a 280 nm. El coeficiente de absorción molar de la α Syn a 280 nm fue estimado a partir de su secuencia primaria mediante la plataforma on-line ExpASy-ProtParam (5960 M⁻¹ cm⁻¹).

3.2.1.2 α -sinucleína glicada con MGO

Para la glicación de α Syn con MGO (α Syn-MGO) se preparó una muestra 20 μ M de α Syn en presencia de 50 mM de MGO en DT4 y se incubó durante 24 h a 37 °C. Posteriormente, la muestra se dializó en agua para eliminar el exceso de MGO y fue separada mediante el sistema cromatográfico GE ÄKTA Start, utilizando una columna de exclusión de tamaño GE Healthcare Superdex™ 75 10/300 GL (24 mL). Como fase móvil se utilizó DT4 a un flujo de 0.5 mL/min.

La masa molecular de α Syn-MGO, así como su heterogeneidad, se determinó mediante espectrometría MALDI-TOF/TOF utilizando el mismo método descrito para la α Syn nativa. La concentración aproximada de α Syn-MGO se obtuvo mediante espectroscopia UV-VIS a 280 nm, utilizando el coeficiente de absorción molar determinado para la α Syn-MGO ($\epsilon_{\text{glicada}}$) (ver el siguiente apartado 3.2.1.2.1).

3.2.1.2.1 Determinación del Coeficiente de Absorción Molar de la α -sinucleína glicada

Para determinar el $\epsilon_{\text{glicada}}$ a 280 nm se preparó, en DT4, una disolución que contenía α Syn nativa (20 μ M) y MGO (50 mM) (α Syn+MGO), y otra que únicamente contenía MGO (50 mM). Los espectros de absorción UV-VIS de ambas muestras fueron adquiridos de forma individual cada 60 min durante 24 h a 37°C, utilizando un espectrofotómetro Shimadzu UV-2401PC acoplado a un controlador de temperatura TCC-240A y usando celdas de 0.1 cm de paso óptico. El espectro UV-VIS de la α Syn-MGO se obtuvo restando los espectros de las disoluciones α Syn+MGO y MGO solo y, sabiendo que la concentración inicial de α Syn nativa era 20 μ M, se pudo estimar el valor de $\epsilon_{\text{glicada}}$ a 280 nm.

3.2.1.3 α -sinucleína nitrada

La nitración de la α Syn (α Syn-NO₂) se realizó mediante síntesis química, utilizando tetranitrometano (TNM) que reacciona con el anillo de las Tyr proteicas, introduciendo un grupo nitro en posición *orto* formando 3-nitrotirosina (3-NT) (**Fig. 3**) (Riordan, 1966; Burai, 2015).

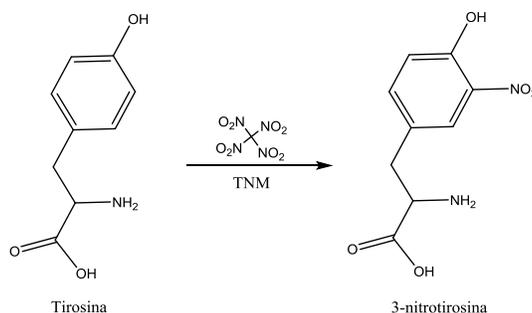


Figura 3. Nitración de tirosina mediante TNM.

Para llevar a cabo la nitración, se preparó 25 mL de una disolución de α Syn (10 μ M) en DT5 desgasificado, en presencia de TNM en exceso (35 μ L de TNM 10% en etanol). La mezcla se incubó a 30 °C durante 3 h. Posteriormente, se eliminaron las sales y el TNM que no había reaccionado utilizando una columna de desalinización GE Healthcare HiTrap™ de 5 mL, acoplada al cromatógrafo GE ÄKTA Start, utilizando agua como fase móvil. A las fracciones recogidas se les añadió fosfato sódico y NaCl hasta una concentración final de 20 mM y 150 mM, respectivamente y el pH se ajustó a 7.4.

Para confirmar la formación de 3-NT sobre las cuatro Tyr de la α Syn, la masa molecular de α Syn-NO₂ fue determinada mediante espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF, utilizando las mismas condiciones descritas para la α Syn nativa.

La concentración aproximada de α Syn-NO₂ se obtuvo a partir del coeficiente de absorción molar a 280 nm obtenido en el apartado 3.2.1.3.1.

3.2.1.3.1 Determinación del Coeficiente de Absorción Molar de la α -sinucleína nitrada

Con el fin de determinar el coeficiente de absorción molar de la α Syn-NO₂ ($\epsilon_{\text{nitrada}}$), se adquirieron los espectros UV-VIS de 1 mL de una disolución preparada en DT5 que contenía α Syn nativa (2 μ M) y a la que se adicionó 1 μ L de TNM 1% (V/V) en etanol. Los espectros se adquirieron durante 3 horas a 30 °C, utilizando celdas de 1 cm de paso óptico. En presencia de TNM apareció una banda a 350 nm que incrementó su intensidad con el tiempo de incubación por lo que, a las 3 h, la muestra se dializó en agua ultrapura para eliminar el exceso de TNM y el espectro se adquirió de nuevo a 25°C. El espectro de la α Syn-NO₂ dializada presentó dos bandas con máximos 280 y 420 nm característicos de la presencia de 3-NT (De Filippis, 2006). El $\epsilon_{\text{nitrada}}$ se obtuvo a partir de la absorbancia a 280 nm, aplicando la ecuación de Lambert-Beer y sabiendo que la concentración de inicial de α Syn era 2 μ M.

3.2.1.4 Síntesis química de α Syn-CEL y α Syn-CML

La CEL y la N-(carboximetil)lisina (CML) son dos de los AGEs más comunes formados durante la glicación, independientemente de la naturaleza química del agente glicante. Por ello y considerando su estructura, se diseñó una ruta sintética que permitiera su formación sobre la α Syn (**Fig. 4**).

Dicho proceso de síntesis se llevó a cabo mediante la incubación de la α Syn nativa (200 μ M) en DT6, en presencia de ácido glioxílico (50 mM) o ácido pirúvico (50 mM) y NaBH₃CN 75 mM, para formar la α Syn-CML o la α Syn-CEL, respectivamente (**Fig. 4**). Ambas soluciones fueron incubadas durante 48 h a 50 °C. Al final de la reacción, la muestra fue dializada en la disolución DT4 para eliminar los reactivos en exceso.

La masa molecular de la α Syn-CEL y α Syn-CML fue determinada mediante espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF utilizando las mismas condiciones descritas para la α Syn nativa. Las concentraciones de las disoluciones de α Syn-CML y α Syn-CEL se obtuvieron mediante espectroscopia UV-VIS a 280 nm, utilizando el mismo coeficiente de absorción molar de la α Syn nativa (5960 M⁻¹ cm⁻¹), puesto que ni la CML ni la CEL generan nuevos grupos cromóforos ni modifican los que presenta la α Syn.

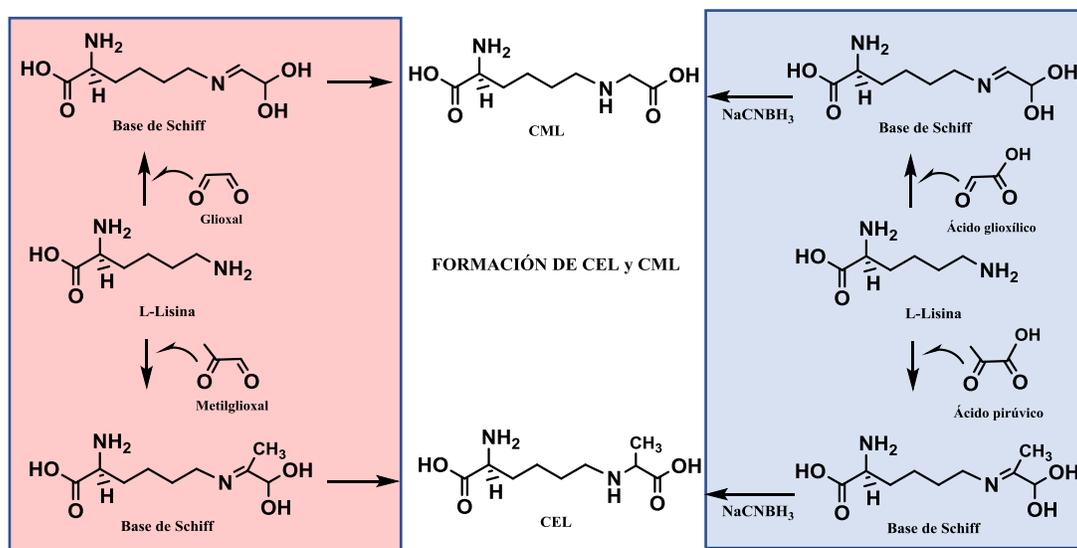


Figura 4. Mecanismos de reacción de la glicación no enzimática (rojo) y la modificación química (azul) de residuos de Lys para formar CEL y CML

3.2.1.5 Digestión proteolítica de la α -sinucleína nativa

Con el fin de determinar el efecto de la fragmentación del esqueleto peptídico sobre la capacidad de la α Syn nativa para inhibir la formación de radicales, se digirió la α Syn con endoproteinasa Glu-C (*Staphylococcus aureus* protesa V8). La Glu-C es capaz de hidrolizar los enlaces peptídicos de los residuos de Glu y Asp. La digestión proteolítica se realizó sobre 3 mL de una disolución de α Syn nativa (150 μ M) en DT4, adicionando 100 μ L de una disolución ya preparada de Glu-C e incubando a 25 $^{\circ}$ C durante 15 h.

La caracterización de los fragmentos se realizó mediante espectroscopia de MALDI-TOF/TOF. 1 μ L de la disolución se combinó con 1 μ L de la matriz (ácido α -ciano-4-hidroxicinámico preparada en 70:30 acetonitrilo:agua con un 0.1% de TFA). La muestra, depositada sobre una placa MPT 384, fue secada con aire y se analizó utilizando el equipo y las condiciones descritas en el apartado 3.2.1.2. La calibración se realizó con un patrón Brucker de péptidos II. Las masas se compararon con las obtenidas en la digestión teórica, realizada mediante la plataforma PeptideMass-ExpPASy.

3.2.2 Inhibición de la degradación de ácido ascórbico

El ácido ascórbico (AA), en presencia de Cu(II), se oxida dando lugar a la formación de ROS y radicales libres (**Fig. 5**) (Guilloreau, 2007). El AA absorbe en la región UV mostrando un máximo a 265 nm en DT4, por lo que la degradación de AA catalizada por Cu(II) puede ser seguida mediante espectroscopia UV-VIS (Pedersen, 2016). Este hecho permite evaluar la capacidad de la α Syn nativa y de sus formas modificadas como inhibidores de la degradación del AA catalizada por Cu(II).

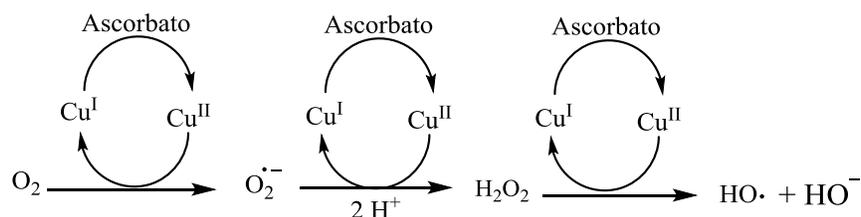


Figura 5. Reacción de producción de radicales libres y ROS durante la degradación de AA catalizada por Cu(II) (Guilloreau, 2007).

Para la realización de estos estudios, se preparó una disolución de CuCl₂ 100 μ M en agua, a partir de una solución 20 mM preparada en 40 mM de glicina. Este procedimiento se adoptó para prevenir la formación de especies insolubles de hidróxido de cobre al adicionar el Cu(II) al tampón DT4 (Hong, 2009). Por otra parte, se preparó una disolución madre de AA 3 mM en agua ultrapura. Esta disolución se preparó al momento, utilizándose únicamente durante 24 h y conservando a 4 °C en recipientes ámbar con el fin de evitar su degradación. A su vez, se prepararon disoluciones 10 mM de EDTA, de N-(metil)-glicina (un análogo de la CML) y de N-(metil)-DL-alanina (un análogo del CEL) en agua ultrapura.

Las cinéticas de degradación del AA se adquirieron por triplicado a 25 °C utilizando disoluciones que contenían 70 μ M de AA en DT4. Las disoluciones estudiadas fueron: i) AA; ii) AA + 1-5 μ M de EDTA; iii) AA + 2.5 μ M de Cu(II); iv) 2.5 μ M de Cu(II); v) AA + 2.5 μ M de Cu(II) + 5/10 μ M de α Syn nativa, α Syn-MGO, α Syn-NO₂, α Syn-CML o α Syn-CEL; vi) AA + 2.5 μ M de Cu(II) + 160 μ M de N-(metil)-DL-alanina o N-(metil)-glicina. Los ensayos se realizaron adquiriendo la absorbancia a 265 nm durante 150 min, utilizando un espectrofotómetro Shimadzu UV-2401PC y celdas de cuarzo de 1 cm.

3.2.3 Estudio de la cinética de formación del radical $\cdot\text{OH}$

El ácido cumarin-3-carboxílico (3-CCA) se oxida en presencia de radicales $\cdot\text{OH}$ para formar el ácido 7-hidroxicumarin-3-carboxílico (7-OH-3-CCA) (**Fig. 6**), el cual emite radiación fluorescente a un máximo de emisión de 450 nm al aplicar una longitud de onda de excitación de 395 nm. Por ello, se utilizó 3-CCA para evaluar la capacidad de la αSyn nativa y sus formas modificadas, para inhibir la formación de radicales $\cdot\text{OH}$ durante la degradación del AA catalizada por Cu(II).

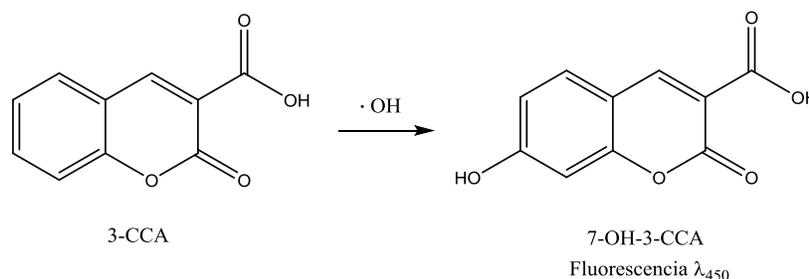


Figura 6. Reacción de formación de 7-OH-3-CCA

Las cinéticas de formación del radical $\cdot\text{OH}$ se estudiaron por triplicado para las disoluciones descritas como i), ii), iii), iv), v) i vi) en el apartado 3.2.2. A todas ellas, preparadas en DT4, se les adicionó 3-CCA hasta una concentración final de 100 μM a partir de una disolución madre 20 mM preparada en DT8. Los experimentos se realizaron durante 150 min a 25 °C en un espectrofluorímetro VARIAN Cary Eclipse acoplado a un controlador de temperatura.

3.2.4 Estudio de la capacidad para neutralizar radicales $\cdot\text{OH}$ y $\cdot\text{O}_2^-$

3.2.4.1 Radical $\cdot\text{OH}$ (método CUPRAC)

El método CUPRAC consiste en analizar la capacidad secuestradora de radicales $\cdot\text{OH}$ de un compuesto antioxidante en competición con salicilato. Los radicales $\cdot\text{OH}$ se forman *in situ* debido a la presencia simultánea de H_2O_2 y Fe(II). El método incluye la adición de EDTA, el cual forma complejos con el Fe(II) y evita su unión a la αSyn . El exceso de H_2O_2 , una vez concluida la reacción, se elimina por adición de catalasa, evitando así interferencias posteriores. La Neocuproína (Nc), un compuesto orgánico heterocíclico con propiedades quelantes, forma un complejo con Cu(II), el cual es reducido a Cu(I) por los hidroxisalicilatos (ArOH) formados por la reacción del salicilato con los $\cdot\text{OH}$. El complejo Nc-Cu(I) es de color amarillo y posee un máximo de absorbancia a 450 nm (**Fig. 7**). Si la αSyn es capaz de

secuestrar el radical $\cdot\text{OH}$, se inhibirá la formación de hidroxisalicilatos y con ello, se reduce la absorbancia a 450 nm debido a una menor formación del complejo Nc-Cu(I).

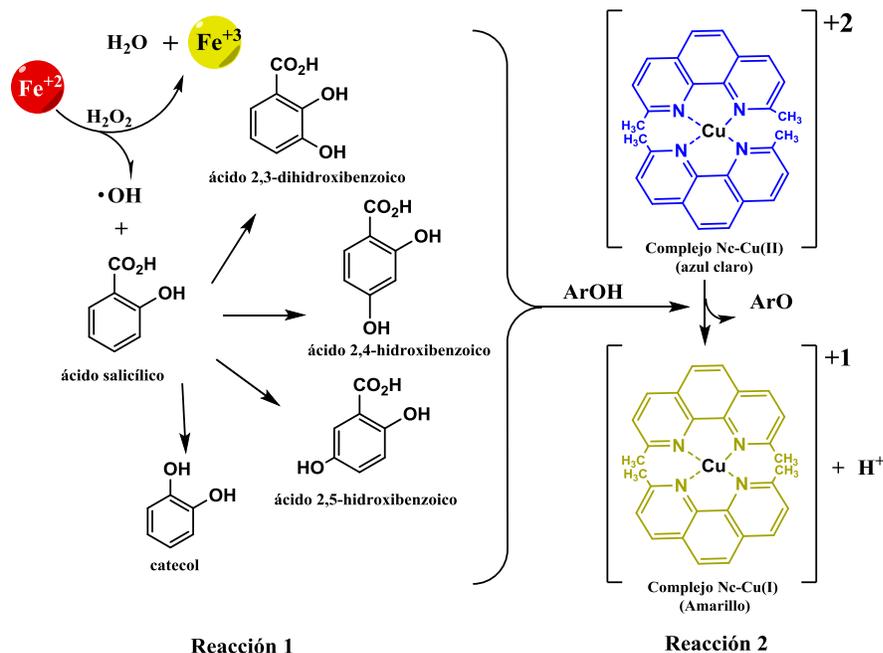


Figura 7. Mecanismo de reacción del método CUPRAC. Reacción 1, formación de radical $\cdot\text{OH}$ y generación de hidroxisalicilatos (ArOH). Reacción 2, formación de Nc-Cu(I) a partir de la reacción redox entre Nc-Cu(II) y ArOH.

Con el fin de evaluar si la αSyn nativa y modificadas son capaces de secuestrar $\cdot\text{OH}$, se llevó a cabo el ensayo CUPRAC una vez preparadas las siguientes disoluciones madres en agua: ácido salicílico 10 mM, FeCl_2 20 mM (adicionando 40 μL de HCl 1 M por mL de disolución), EDTA 20 mM, H_2O_2 10 mM, CuCl_2 10 mM; acetato de amonio (NH_4Ac) 1 M; una disolución de Nc 7.5 mM en etanol; y una solución de catalasa (298 U/mL) en tampón DT4. Para la realización del ensayo, inicialmente se preparó 1 mL de una mezcla de reacción (R1) en DT4 que contenía 0.5 μM de ácido salicílico + 0.5 μM de Fe(II) + 0.5 μM de EDTA + 10 μM de αSyn nativa, αSyn -MGO, αSyn -NO₂, αSyn -CML o αSyn -CEL, o alternativamente 160 μM de N-(metil)-DL-alanina o N-(metil)-glicina + 0.5 μM de H_2O_2 . Los reactivos se adicionaron en el orden descrito. La mezcla se incubó a 37 °C y a 500 rpm durante 10 min. Posteriormente, se añadió catalasa 298 U/mL hasta una concentración final de 15 U/mL, se agitó 30 s y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 30 min. Adicionalmente se preparó 1 mL de otra mezcla de reacción (R2) en agua que contenía: 1 μM de Cu(II) + 0.75 μM de Nc + 0.2 M NH_4Ac + 100 μL de R1. La disolución se dejó reposar 2.5 h a temperatura ambiente. El blanco incluyó los reactivos + 100 μL de H_2O en

lugar de R1. Finalmente, se adquirieron los espectros UV-VIS de R2 a 25 °C. Los ensayos se realizaron a cada muestra por triplicado.

3.2.4.2 Radical $\cdot\text{O}_2^-$ (método NBT)

El método NBT consiste en la formación del radical $\cdot\text{O}_2^-$ a partir la reducción del fenazin metosulfato (FMS) mediante la acción de la enzima nicotinamida adenosin deshidrogenasa (NADH) (**Fig. 8**). Los radicales $\cdot\text{O}_2^-$ reaccionan con el nitroazul de tetrazoilo (NAT) dando lugar al formazan, un compuesto que presenta un color violeta y una absorbancia máxima a 350 nm. Si las αSyn (tanto nativa como modificada) son capaces de secuestrar el $\cdot\text{O}_2^-$, inhibirán la formación de formazan y con ello, reducirá la absorbancia a dicha longitud de onda.

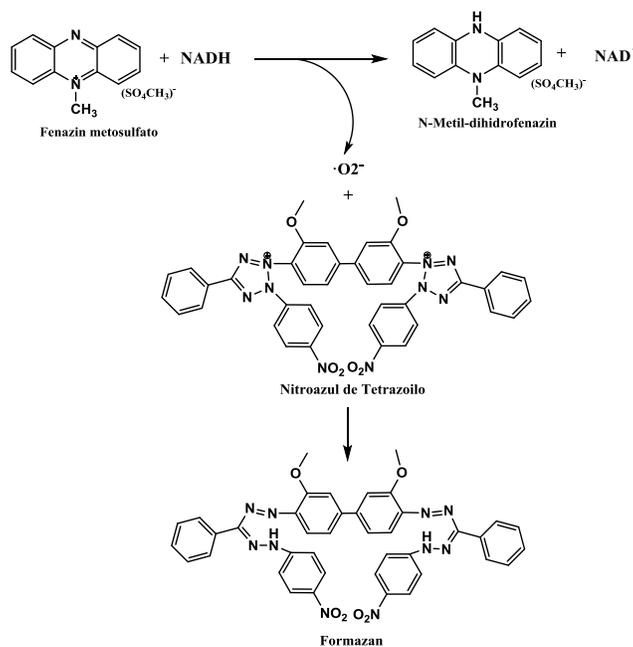


Figura 8. Esquema de reacciones en la metodología NBT. Los radicales $\cdot\text{O}_2^-$ formados por la reacción entre FMS y NADH, reducen el NAT a la especie formazan la cual presenta una absorbancia máxima a 350 nm.

Con el fin de estudiar la capacidad de las diferentes αSyn como neutralizantes de radicales $\cdot\text{O}_2^-$ se prepararon las siguientes disoluciones en DT7: FMS 30 μM , NADH 338 μM y NAT 200 μM . Todas estas disoluciones se guardaron a 4-8 °C en recipientes ámbar. A partir de ellas, se prepararon 2 mL de una mezcla de reacción que contenía: 10 μM de αSyn nativa, modificada o fragmentada o bien, 160 μM de N-(metil)-DL-alanina o N-(metil)-glicina diluidas en 500 μL de DT7. A la disolución resultante, se le adicionó rápidamente y

en el siguiente orden: 500 μL de NADH 338 μM y 500 μL de FMS 30 μM . La solución se agitó e inmediatamente se adicionaron 500 μL de NAT 200 μM . Una vez mezclado, se incubó 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se adquirieron los espectros UV-VIS a 25 °C. Como blanco se utilizó DT7 y como control se preparó una muestra sin proteína. Los ensayos se realizaron por triplicado.

3.2.4.3 Efecto de los radicales libres sobre el peso molecular proteico.

Si las αSyn son capaces de neutralizar radicales, este proceso implicaría necesariamente el incremento de su peso molecular. Por ello, se evaluó las posibles modificaciones covalentes que deberían ocurrir sobre las diferentes αSyn (nativa y modificadas) durante la degradación de AA catalizada por Cu(II). Para ello, se tomaron 100 μL de las disoluciones de αSyn (nativa o modificada) preparadas en DT4, en presencia o en ausencia de 2.5 μM Cu(II). Adicionalmente, estas disoluciones se estudiaron también en presencia de 70 μM de AA. Todas estas mezclas de reacción se incubaron a 25 °C y se añadió TFA al 0.2 % (v/v) después de 0 y 150 min de incubación. Las muestras fueron analizadas mediante MALDI-TOF/TOF utilizando las mismas condiciones descritas en el apartado 3.2.1.1.

3.2.5 Ensayo de peróxido de hidrógeno

Es sabido que durante la degradación del AA catalizada por Cu(II) también se genera H_2O_2 . Es por ello que se analizó el efecto de la αSyn nativa y de las diferentes variantes modificadas sobre la formación del mismo. Para ello, se utilizó el kit comercial MAK165 (Sigma-Aldrich), que permite cuantificar la concentración de H_2O_2 . El fundamento del ensayo es la transformación de un substrato dado (RS) en su forma radicalaria ($\cdot\text{RS}$) mediante la acción catalítica de peroxidasa (HRP). Este proceso únicamente se da en presencia de H_2O_2 , con una relación 1:1 con el RS. Posteriormente, dos moléculas $\cdot\text{RS}$ reaccionan entre sí generando resorufina, un compuesto fluorescente (λ_{em} 590 nm) cuya formación es proporcional a la concentración de H_2O_2 en solución.

Para la cuantificación de H_2O_2 , inicialmente se realizó una curva de calibración. Se preparó una disolución madre 20 mM de H_2O_2 y a partir de ella se prepararon las siguientes diluciones: 0, 0.5, 2, 4, 10, 20, 30 y 50 μM de H_2O_2 en el tampón incluido en el kit. El RS fue reconstituido en DMSO y la HRP en el tampón comercial (20 U/mL). A partir de ambos

se preparó una disolución que contenía 50 μL de RS, 200 μL de HRP y 4.75 mL de disolución tampón incluida en el kit (MX). La curva de calibración se realizó por duplicado en una microplaca, mezclando 50 μL de cada disolución de H_2O_2 con 50 μL de MX. La disolución resultante se incubó durante 30 min a temperatura ambiente y, posteriormente, se registraron las intensidades de fluorescencia (λ_{exc} 540 y λ_{em} 590 nm). Para ello, se utilizó el fluorímetro VARIAN Cary Eclipse con accesorio para lector de microplacas.

Una vez realizada la recta de calibrado se analizó el efecto de las diferentes αSyn (nativa o modificadas) sobre la formación de H_2O_2 durante la degradación de AA catalizada por Cu(II). Para ello se mezclaron 50 μL de muestra que contenía αSyn , Cu(II) y AA con 50 μL de MX en una microplaca. Las concentraciones finales en la disolución resultante fueron: 10 μM de proteína, 2.5 μM de Cu(II) y 70 μM de AA. La formación de H_2O_2 inicia tras la adición de AA, por lo que este fue el último añadido. Una vez mezclado se adquirieron sus intensidades fluorescentes (λ_{exc} 540 y λ_{em} 590 nm) durante 200 min. A su vez, también se monitorizaron las cinéticas en ausencia de proteína, con Cu (II) solo y con AA solo. Como blanco se utilizó AA 70 μM en tampón incluido en el kit. Los experimentos con muestra de proteína se realizaron por triplicado.

3.2.6 Calorimetría de valoración isotérmica

En este TFM se realizaron valoraciones calorimétricas con el fin de determinar cómo las MPTs estudiadas modificaban la capacidad de la αSyn para formar complejos con Cu(II). Las valoraciones calorimétricas se llevaron a cabo por duplicado en un Nano-ITC marca TA instruments, utilizando una concentración de αSyn 150 μM en DT4. Se utilizó una jeringa de 50 μL que contenía una disolución de CuCl_2 3 mM y glicina 6 mM en DT4. Se realizaron 34 inyecciones de 1.43 μL , con un retraso inicial de 60 s, y con espacios entre inyecciones de 400 s y agitación de 250 rpm. Las valoraciones se realizaron a 25 $^\circ\text{C}$. Los datos generados en el análisis fueron evaluados mediante 3 modelos de ajuste (Multiple Sites (MSM), Sequential Two Site (S2SM) y Sequential Three Site (S3SM)) en el software Nano Analyzer, a un intervalo de confianza del 90%.

4. RESULTADOS

4.1 Producción, purificación y caracterización de la α -sinucleína nativa y modificadas químicamente

Inicialmente, se procedió a la producción, purificación y caracterización de la α Syn nativa, y posteriormente a utilizarla para producir las diferentes α Syn modificadas químicamente con las MPTs objeto de estudio en este trabajo.

Una vez producida, la α Syn recombinante fue purificada mediante cromatografía de intercambio aniónico (CIA). Las diferentes fracciones del pico mayoritario (t_r ~14 min; **Fig. 9A**), fueron analizadas utilizando electroforesis de SDS-PAGE, lo que mostró la presencia de una única banda a ~14200 Da (**Fig. 10**). Posteriormente, se utilizó el MALDI-TOF/TOF para determinar el peso molecular exacto de la proteína responsable de dicha banda. El peso fue de 14464 Da (**Fig. 9B**), lo que se correspondía a la α Syn nativa. Su espectro UV-VIS mostró un máximo a 275 nm, debido a la presencia de Tyr (**Fig. 9C**).

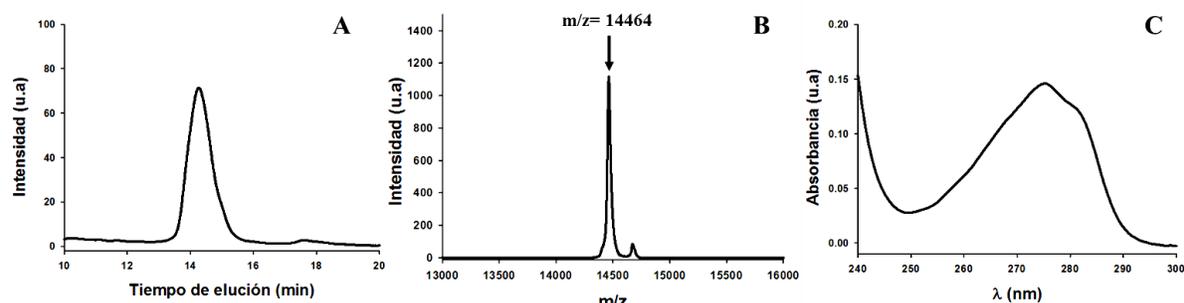


Figura 9. Caracterización de α Syn nativa. A) Cromatograma de CIA correspondiente a la purificación de la α Syn; B) Espectro MALDI-TOF/TOF del contenido del pico cromatográfico mostrado en el panel A; C) El espectro UV-VIS de la α Syn nativa (100 μ M) monomérica y purificada en DT4 a 25 °C.

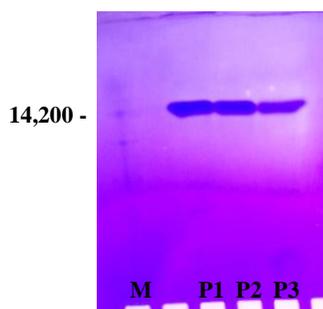


Figura 10. Gel SDS-PAGE de las tres fracciones en las que se separó el pico cromatográfico de la Fig. 9A. Las tres fracciones (P1-P3) coinciden con la banda de ~14,200 Da del marcador. No se observa la presencia de contaminantes o de especies oligoméricas.

Mediante cromatografía de exclusión de tamaño (CET), se separó la α Syn-MGO monomérica ($t_r=47$ min) del MGO en exceso que no pudo ser eliminado mediante diálisis previa ($t_r=74$ min) (**Fig. 11A**). El espectro MALDI-TOF/TOF de las fracciones colectadas de α Syn-MGO, mostró un único pico entre 14800 y 16800 Da (**Fig. 11B**), lo que evidenció la incorporación de moléculas de MGO a la α Syn y la heterogeneidad del proceso de glicación. El espectro UV-VIS del α Syn-MGO presenta un máximo a 280 nm, correspondiente a las Tyr proteicas, y otro a 330 nm, característico de los AGEs formados durante la glicación (**Fig. 11C**) (Valencia, 2004). No se detectó la formación de oligómeros de α Syn-MGO bajo las condiciones experimentales utilizadas.

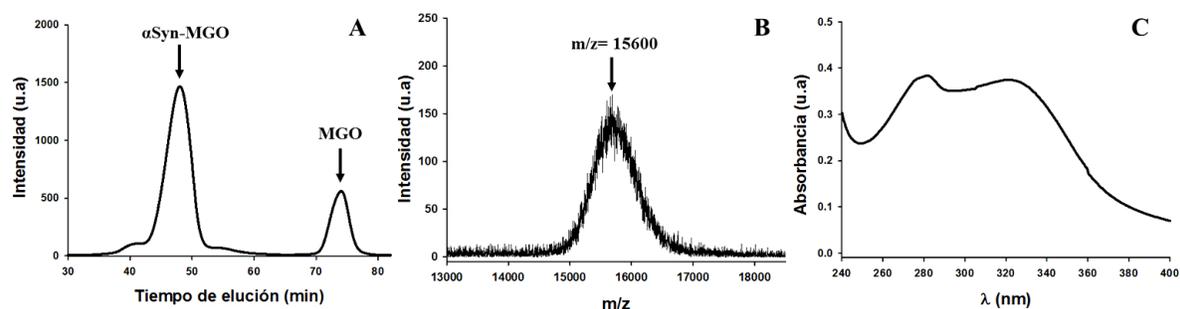


Figura 11. Caracterización de la α Syn-MGO monomérica. A) CET de la mezcla de reacción entre la α Syn y el MGO, una vez incubada y dializada; B) Determinación de la masa molecular de la α Syn-MGO ($m/z = 15600$ Da) mediante MALDI-TOF/TOF; C) El espectro UV-VIS de la α Syn-MGO (40 μ M) monomérica y purificada en DT4 a 25 °C.

La purificación de la α Syn-NO₂ monomérica se realizó a partir de la mezcla de reacción utilizando una columna de desalinización GE Healthcare HiTrap™ (**Fig. 12A**). El contenido del pico cromatográfico que apreció a un $t_r \sim 2.7$ min se determinó mediante MALDI-TOF/TOF (**Fig. 12B**). La masa molecular de la proteína presente en la disolución fue de 14638 Da, lo cual confirma la adición de cuatro grupos -NO₂ (46 g/mol) sobre las 4 Tyr que presenta la α Syn en su secuencia. No se detectó la formación de oligómeros de α Syn-NO₂ bajo las condiciones experimentales utilizadas. El espectro UV-VIS de α Syn-NO₂ en DT4 presenta dos máximos a 280 y 420 nm (**Fig. 12C**), este último característico de la 3-NT (De Filippis, 2006).

La caracterización de la α Syn-CEL monomérica se realizó mediante MALDI-TOF/TOF a partir de la mezcla de reacción dializada. Se observaron dos picos, uno a $m/z=15542$, correspondiente a la α Syn con sus 15 Lys modificadas mediante el grupo carboxietil (73 g/mol) (**Fig. 13A**), y otro más intenso a $m/z=15613$, que podría ser debido a

una bi-alquilación, reacción observada en las reacciones de alquilación reductiva que utilizan NaCNBH_3 como agente reductor (Baxter, 2001), o bien debido a la alquilación del extremo N-terminal de la αSyn .

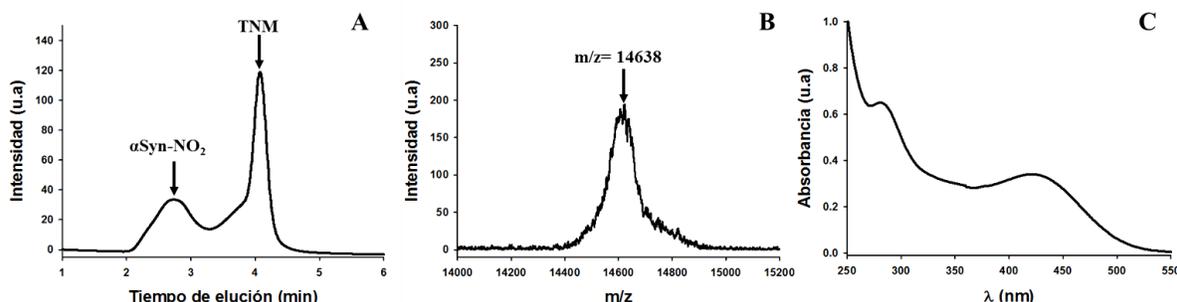


Figura 12. Caracterización de la $\alpha\text{Syn-NO}_2$ monomérica. A) Separación de la $\alpha\text{Syn-NO}_2$ y TNM sin reaccionar mediante columna de intercambio salino; B) Espectro MALDI-TOF/TOF de la $\alpha\text{Syn-NO}_2$ correspondiente a la fracción purificada; C) Espectro UV-VIS de la $\alpha\text{Syn-NO}_2$ (150 μM).

Por otro lado, el espectro MALDI-TOF/TOF de la $\alpha\text{Syn-CML}$ monomérica obtenida a partir de la purificación de la mezcla de reacción, reveló la presencia de diferentes formas de la αSyn con distinto número de residuos de Lys modificados por el grupo carboximetil (59 g/mol): CML_{10} , m/z=15041; CML_{11} , m/z=15099; CML_{12} , m/z=15156; CML_{13} , m/z=15211; CML_{14} , m/z=15270 y CML_{15} , m/z=15331 (**Fig. 13B**), hecho que evidencia la formación de un conjunto heterogéneo de especies.

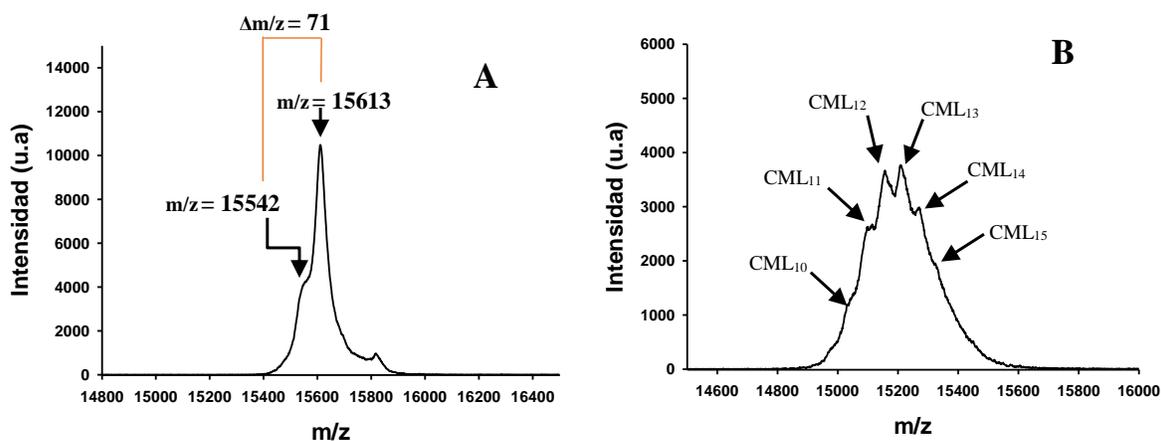


Figura 13. Caracterización de monómeros de la $\alpha\text{Syn-CEL}$ y la $\alpha\text{Syn-CML}$. A) Espectro de masas MALDI-TOF/TOF de la $\alpha\text{Syn-CEL}$. B) Espectro de masas MALDI-TOF/TOF de la $\alpha\text{Syn-CML}$.

Los espectros UV-VIS de la α Syn-CEL y la α Syn-CML (**Fig. 14**), son similares al de α Syn nativa, hecho de esperar puesto que la alquilación reductiva de las Lys no modifica el número ni la naturaleza de los cromóforos que presenta la α Syn.

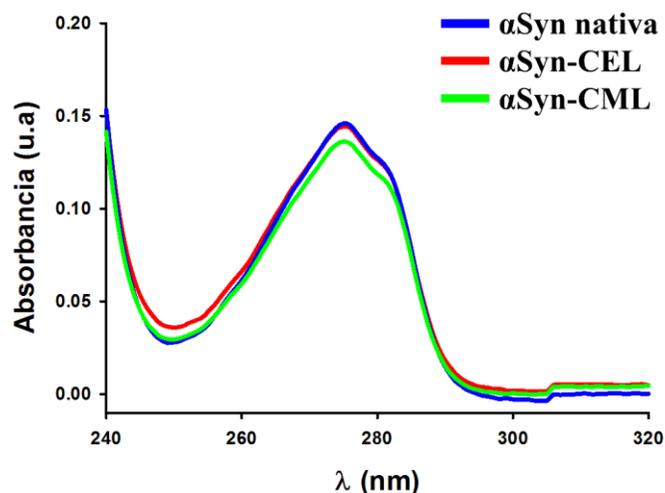


Figura 14. Espectros UV-VIS de la α Syn nativa (100 μ M), α Syn-CEL (100 μ M) y α Syn-CML (100 μ M) en DT4.

El espectro MALDI-TOF/TOF de la α Syn nativa sometida a digestión proteolítica con GLU-C (**Fig. 15**), evidencia tres masas moleculares que coinciden con las masas de fragmentos obtenidos mediante el programa MS-Digest, los cuales contienen la secuencia de aminoácidos 1-9 o 48-52 (**Tabla 1**).

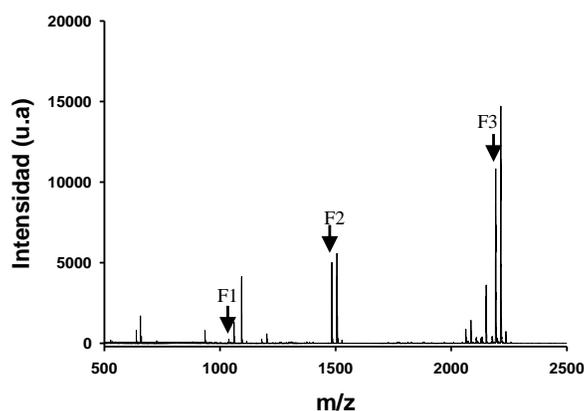


Figura 15. Caracterización mediante MALDI-TOF/TOF de fragmentos de la α Syn obtenidos por digestión proteolítica con GLU-C. Los valores de m/z de F1, F2 y F3, coinciden con las masas moleculares de fragmentos obtenidos mediante la herramienta MS-Digest (Tabla 1).

Tabla 1. Masas moleculares y secuencias de fragmentos de la α Syn obtenidos mediante digestión proteolítica con GLU-C. Los aminoácidos en negrita y de color morado hacen referencia a los residuos involucrados en los sitios de unión a Cu(II) en la α Syn.

Fragmento	(m/z) Experimental	(m/z) MS-Digest	Rango de aminoácidos	Secuencia
F1	1038.5	1038.5	47-57	G V V H G V A T V A E
F2	1483.7	1483.7	1-13	M D V F M K G L S K A K E
F3	2200.1	2200.1	36-57	G V L Y V G S K T K E G V V H G V A T V A E

4.2 Determinación de la concentración de α -sinucleína glicada y nitrada

Puesto que la modificación de la α Syn mediante MGO y su nitración inducen fuertes cambios en su espectro UV-VIS (**Figs. 11C y 12C**), las lecturas de absorbancia (considerando el coeficiente de absorción molar de la α Syn nativa) no son válidas para determinar dichas concentraciones en disolución.

El MGO presenta una fuerte absorción en la región de 280 nm, cuya intensidad varía con el tiempo de incubación en DT4. A su vez, dicha absorción solapa con el máximo de la α Syn, correspondiente a sus Tyr. Este hecho no supuso un problema para seguir la formación de AGEs durante la reacción de glicación, puesto que la absorbancia a 340 nm del MGO prácticamente no incrementa durante la incubación (**Fig. 16A**). Sin embargo, si lo fue para determinar el valor de $\epsilon_{\text{glicada}}$. Un hecho similar ocurrió durante la nitración de la α Syn. El TNM muestra un máximo de absorción a 350 nm en DT5, y su espectro solapa en parte con el de la α Syn (**Fig. 16B**), lo que imposibilita la determinación del $\epsilon_{\text{nitrada}}$.

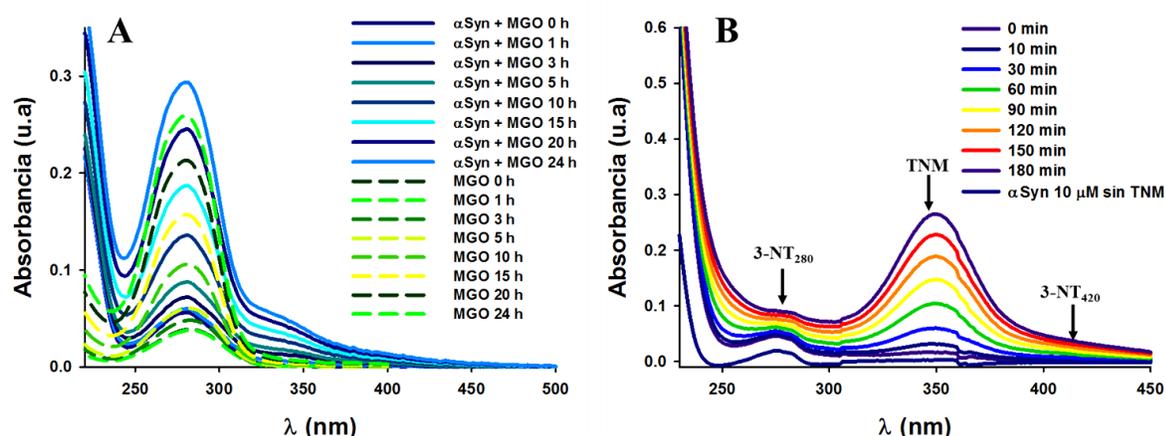


Figura 16. Efecto hipercrómico de A) MGO y B) TNM durante la glicación y nitración de la α Syn.

Para determinar la concentración de la α Syn-MGO, se supuso que su espectro era el resultado de la diferencia entre los espectros de la mezcla α Syn+MGO y del MGO solo a un mismo tiempo de incubación. Se calcularon los Δabs_{280} de la α Syn+MGO y del MGO a las 0, 1, 3, 5, 10, 15, 20 y 24 h de incubación y a partir de estos el $\epsilon_{\text{glicada}}$ a cada tiempo utilizando la ecuación de Lambert-Beer, asumiendo que la concentración de α Syn monomérica era constante. El valor de $\epsilon_{\text{glicada}}$ mostró un rápido incremento durante la incubación, hasta que después de 15 h permaneció relativamente constante, lo cual sugiere que la reacción de glicación ha concluido (**Fig. 17**). En base a este estudio, se estimó que la α Syn-MGO presentaba una $\epsilon_{280\text{nm}}$ de $34654 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a las 24 h de incubación.

Por otra parte, se observó que el pico que aparece a 350 nm durante la reacción de nitración (**Fig. 16B**), desaparece tras la diálisis. Sin embargo, el espectro de la α Syn-NO₂ dializada y desalinizada, no se parece al de la nativa (**Fig. 12C**), por lo que el $\epsilon_{280\text{nm}}$ de la α Syn nativa no podrá utilizarse para determinar la concentración de la α Syn-NO₂. Debido a que durante la separación cromatográfica la concentración inicial de α Syn-NO₂ se modifica, el $\epsilon_{\text{nitrada}}$ se estimó a partir de la absorbancia a 280 nm de la muestra dializada obteniéndose un valor de $27700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

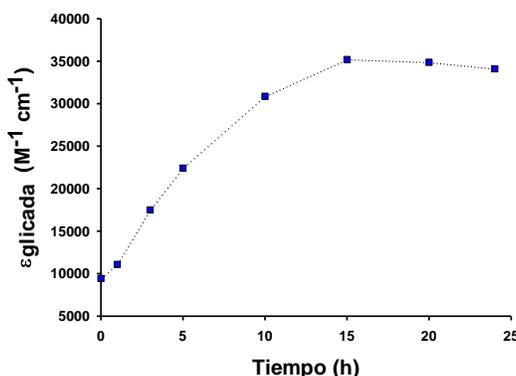


Figura 17. Variación del valor del coeficiente de absorción molar a 280nm de la α Syn-MGO (20 μ M) durante su reacción con el MGO (50 mM).

4.3 El efecto de las modificaciones post-traduccionales en la capacidad de unión a Cu(II)

La α Syn nativa es capaz de formar complejos con los iones Cu(II) en diferentes regiones de su secuencia, las cuales presentan diferente afinidad hacia este ion (Moriarty, 2014). Así, a pH fisiológico, el Cu(II) se coordina predominantemente con la Met1, Asp2 e His50 y, a

concentraciones elevadas se une mediante la Val49 y la His50 (De Ricco, 2015) y en la región C-terminal mediante los residuos de Asp119, Asp121 y Asp122 y Glu124 (Drew, 2008). Los valores de las constantes de disociación (K_d) y de las ΔH de unión, han sido determinadas en diferentes estudios mediante ITC y RMN (**Tabla 2**). Sin embargo, no se conocen los valores de estos parámetros para la α Syn glicada o nitrada.

Tabla 2. Valores de constantes cinéticas y ΔH a 25 °C de unión a Cu(II) en la α Syn nativa. Cada sitio corresponde a las siguientes secuencias de aminoácidos: Sitio₁= 3-9, Sitio₂= 48-52 y Sitio₃= 119-124.

Parámetro	(Binolfi, 2006; Binolfi, 2008, Binolfi, 2010, Rasia, 2005)	(Barathi, 2007)	(Ranjan, 2017)
K_{d1} (μ M)	0.100 ± 0.001	1.7	0.67 ± 0.02
K_{d2} (μ M)	35 ± 4	13.3	5.2 ± 0.3
K_{d3} (μ M)	≈ 1000		6.02 ± 0.50
ΔH_1 (cal/mol)		-1843×10^3	$(-9.9 \pm 0.07) \times 10^3$
ΔH_2 (cal/mol)		-111×10^3	$(-5.5 \pm 0.29) \times 10^3$
ΔH_3 (cal/mol)			$(-2.5 \pm 0.6) \times 10^3$

Mediante ITC se determinaron las K_d con Cu(II) de la α Syn nativa, glicada con MGO, nitrada con TNM y modificada con CML o CEL. Puesto que no es posible saber si dichas MTPs afectaban al número de sitios de unión entre el Cu(II) en la α Syn, los datos experimentales se ajustaron a un modelo de dos sitios de unión independientes (MSM), a un modelo de dos sitios de unión secuenciales (S2SM) y a un modelo de tres sitios de unión (S3SM) (**Tabla 3**). De los modelos anteriormente mencionados, el ajuste de los datos con S3SM resultó ser el más apropiado para las α Syn estudiadas debido a que el error de las mediciones fue menor y, además, permite evaluar los tres sitios de afinidad a Cu(II). Por ello, los resultados obtenidos con este modelo fueron comparados para analizar si existían diferencias entre las α Syn modificadas y la nativa.

Los valores de K_d obtenidos en este trabajo para la α Syn nativa fueron similares a los bibliográficos (**Tabla 2**). Sin embargo, la glicación y la nitración, modificaron sus valores. Todas las MPTs estudiadas alteraron la afinidad del sitio 1 hacia el Cu(II). A su vez, parece que la glicación con el MGO bloquea la unión de este catión en el sitio 2, mientras que incrementa la afinidad del sitio 3. En la α Syn-NO₂, el valor de K_d para el sitio 2 es similar al de α Syn nativa, pero aumenta drásticamente en el sitio 3. Finalmente, la formación de CEL y CML implica un incremento de la afinidad de los sitios 2 y 3.

Tabla 3. Valores de K_d y ΔH de los sitios de afinidad a Cu(II) en las α Syn nativa y modificadas, obtenidos mediante MSM, S2SM y S3SM en el software Nano Analyzer de TA instruments. Estos datos muestran como las MPTs sobre la α Syn alteran su capacidad para unirse a Cu(II) debido a cambios en sus constantes de afinidad.

	α Syn nativa	α Syn-MGO	α Syn-NO ₂	α Syn-CEL	α Syn-CML	
K_{d1} (μM)	76.0 ± 0.5	38183 ± 3818	61 ± 3	17.6 ± 0.9	15.80 ± 0.07	MSM
K_{d2} (μM)	4.7 ± 0.4	72 ± 5	11 ± 1	15.2 ± 0.7	20.6 ± 0.8	
n₁	1.10 ± 0.07	1.47 ± 0.17	1.09 ± 0.06	1.30 ± 0.06	1.67 ± 0.05	
n₂	1.03 ± 0.03	0.66 ± 0.01	0.77 ± 0.10	1.33 ± 0.06	1.53 ± 0.04	
ΔH₁ (kcal/mol)	-1.97 ± 0.25	-28 ± 19	-2.8 ± 0.1	10 ± 6	-4.98 ± 0.82	
ΔH₂ (kcal/mol)	-3.2 ± 0.3	-7.4 ± 0.3	-2.7 ± 0.3	-14 ± 7	-1.08 ± 0.73	
K_{d1} (μM)	5.0 ± 0.3	79 ± 21500	9.2 ± 0.3	115 ± 5	90540 ± 20010	S2SM
K_{d2} (μM)	86 ± 2	145 ± 276	81 ± 1	25.0 ± 0.8	0.13 ± 0.07	
ΔH₁ (kcal/mol)	-3.13 ± 0.01	-5 ± 440	-2.70 ± 0.01	-5.7 ± 0.1	-682 ± 255	
ΔH₂ (kcal/mol)	-2.36 ± 0.02	4 ± 441	-2.41 ± 0.02	-0.25 ± 0.15	673 ± 255	
K_{d1} (μM)	4.0 ± 0.2	185 ± 17	9.1 ± 0.2	53 ± 8	37 ± 16	S3SM
K_{d2} (μM)	66 ± 3	1490 ± 261	77 ± 1	24.8 ± 1	24 ± 4	
K_{d3} (mM)	2.1 ± 0.1	0.0040 ± 0.0005	99 ± 6	0.34 ± 0.1	0.061 ± 0.005	
ΔH₁ (kcal/mol)	-3.24 ± 0.01	-9.0 ± 0.5	-2.70 ± 0.01	-4.3 ± 0.2	-4.1 ± 0.3	
ΔH₂ (kcal/mol)	-2.30 ± 0.04	35 ± 8	-2.35 ± 0.02	-1.5 ± 0.2	-2.9 ± 0.3	
ΔH₃ (kcal/mol)	-3.7 ± 0.3	-3.3 ± 0.7	-0.88 ± 0.23	-1.1 ± 0.7	-3.1 ± 0.1	

Los resultados obtenidos muestran que la formación de AGEs durante la glicación con MGO en la α Syn disminuye su capacidad para unirse a Cu(II). Sin embargo, cuando las Lys son modificadas únicamente con CEL o CML, la afinidad hacia este catión se incrementa, hecho lógico puesto que dichos AGEs presentan grupos carboxilatos en su estructura química. El sitio 1 de unión al Cu(II) incluye residuos Lys (**Fig. 18**), por lo que su modificación podría afectar a la unión en este sitio, como se ha observado tanto en las α Syn modificadas por alquilación reductiva como en la glicada con MGO. Sin embargo, los sitios 2 y 3 no incluyen Lys en su secuencia y los valores de K_d también se modifican. Lo anterior sugiere que la modificación de los residuos de Lys cercanos a estos sitios podría favorecer cambios estructurales que impiden o incrementan la afinidad a Cu(II).

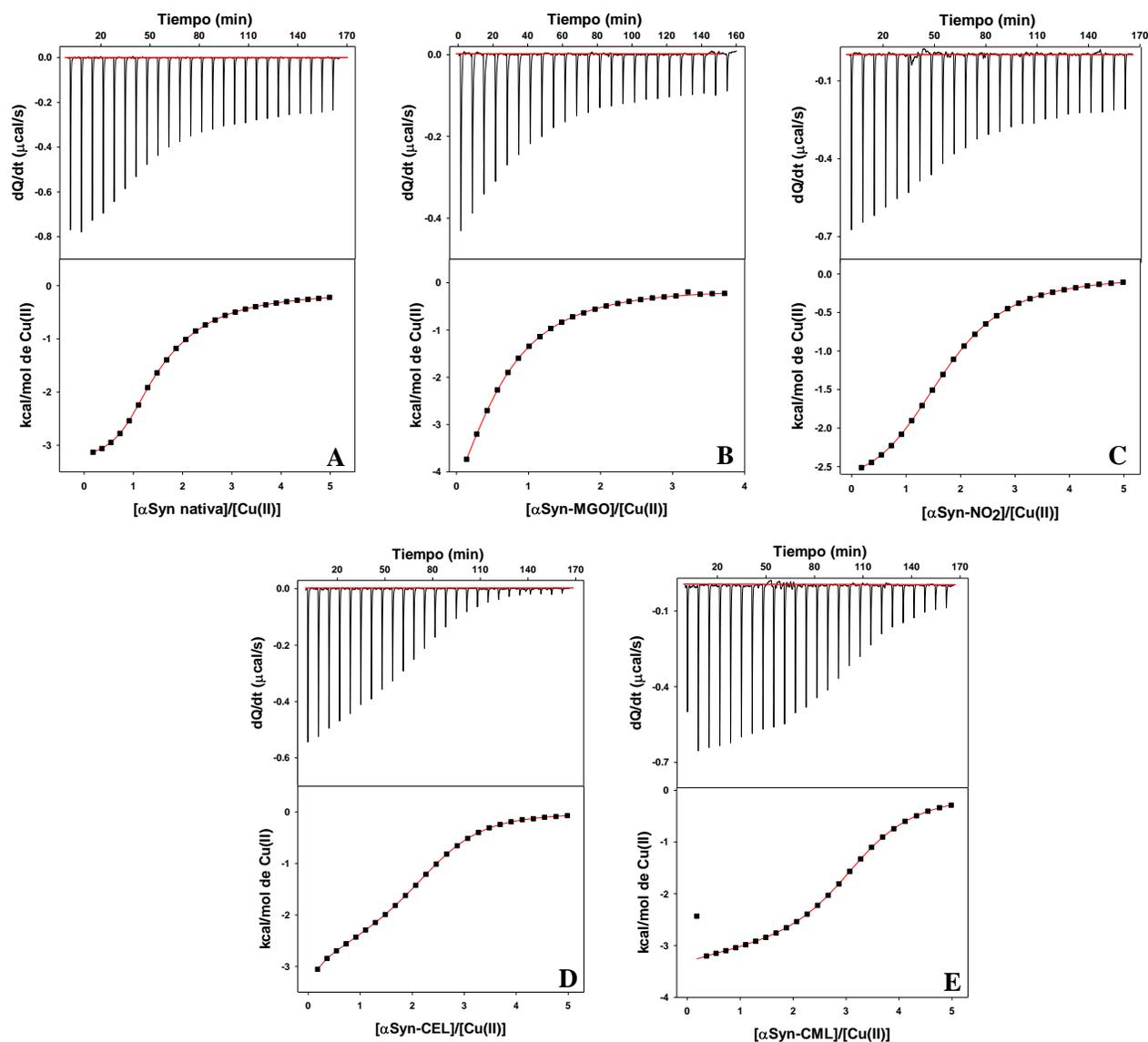


Figura 19. Titulación de complejo Cu(II)-Gly (1:2) en A) α Syn nativa 150 μ M; B) α Syn-MGO 150 μ M; C) α Syn-NO₂ 150 μ M; D) α Syn-CEL 150 μ M y E) α Syn-CML 150 μ M en DT4 a 25 °C. La línea roja en las gráficas inferiores resulta de ajuste no lineal utilizando el modelo S3SM.

4.4 Las modificaciones post-traduccionales de la α -sinucleína alteran su poder de protección sobre la degradación oxidativa del ácido ascórbico

Una vez estudiado como dichas MPTs afectan a la capacidad de la α Syn para coordinar los iones Cu(II), se estudió su influencia sobre la capacidad de inhibición de la degradación de AA catalizada por este metal. En el 2007, Guilloueu y colaboradores observaron que diferentes fibras β -amiloides era capaces de inhibir la degradación de AA (Guilloueu, 2007).

Ya más recientemente, esta misma capacidad ha sido observada para la α Syn nativa (Pedersen, 2016). Los resultados obtenidos en este trabajo confirman que la α Syn nativa es capaz de inhibir la degradación de AA catalizada por Cu(II). Bajo las condiciones experimentales escogidas, la absorbancia a 265 nm de AA disminuye completamente a los 20 min en presencia de Cu(II), mientras que la presencia de α Syn inhibe dicha degradación en función de la concentración presente en la disolución.

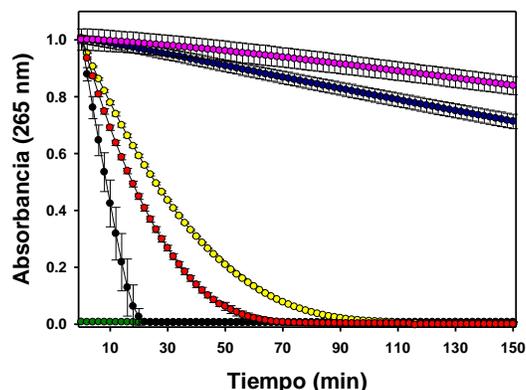


Figura 20. Capacidad de la α Syn para inhibir la de la degradación de AA catalizada por Cu(II). Se han llevado a cabo seis experimentos en DT4 (●) Cu(II) 2.5 μ M, (●) Cu(II) 2.5 μ M + AA 70 μ M, (●) Cu(II) 2.5 μ M + AA 70 μ M + α Syn nativa 5 μ M, (●) Cu(II) 2.5 μ M + AA 70 μ M + α Syn nativa 10 μ M, (●) AA 70 μ M y (●) AA 70 μ M + EDTA 5 μ M.

Cada MPT altera en forma distinta la capacidad de la α Syn para inhibir la degradación de AA catalizada por Cu(II). La glicación (α Syn-MGO) y la nitración (α Syn-NO₂) reduce un 50 y un 25% respectivamente, la capacidad de la α Syn nativa para retrasar la oxidación del AA. Contrariamente, tanto la formación de CEL como la de CML incrementan muy notablemente la capacidad inhibidora de la α Syn, tanto que esta ocurre a una velocidad similar a la observada para el AA en ausencia de Cu (II) (**Fig. 21**). La actividad inhibidora de esta reacción está relacionada con la capacidad de α Syn para coordinarse al Cu(II) (Pedersen, 2016). Los comportamientos observados en las cinéticas de la degradación de AA de las α Syn modificadas mostraron ser consistentes con los resultados obtenidos en los estudios de ITC, en donde la afinidad a Cu(II) disminuye en la α Syn-MGO y la α Syn-NO₂, mientras que aumenta para α Syn-CEL y α Syn-CML.

Se ha propuesto que la coordinación del Cu(II) podría darse entre los grupos ϵ -amino y los átomos de oxígeno de los carboxilatos de dos moléculas de CML (Seifert, 2004). Sin

embargo, la *N*-(metil)-glicina y *N*-(metil)-DL-alanina contienen estos grupos y bajo las condiciones utilizadas en este trabajo, estos análogos de CEL y CML no fueron capaces de inhibir la degradación de AA catalizada por Cu(II) (**Fig. 22**). Este hecho demuestra que la propia secuencia de la proteína es un factor clave para la formación de complejos con Cu(II) y posterior inhibición.

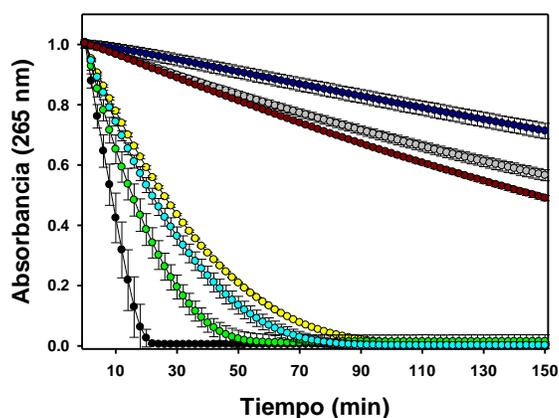


Figura 21. Efecto de las MPTs sobre la capacidad de α Syn para inhibir la de la degradación de AA catalizada por Cu(II). (●) Cu(II) 2.5 μ M + AA 70 μ M, (●) Cu(II) 2.5 μ M + AA 70 μ M + α Syn-MGO 10 μ M, (●) Cu(II) 2.5 μ M + AA 70 μ M + α Syn-NO₂ 10 μ M, (●) Cu(II) 2.5 μ M + AA 70 μ M + α Syn nativa 10 μ M, (●) Cu(II) 2.5 μ M + AA 70 μ M + α Syn-CEL 10 μ M, (●) Cu(II) 2.5 μ M + AA 70 μ M + α Syn-CML 10 μ M y (●) AA 70 μ M. Todos los experimentos fueron realizados en DT4.

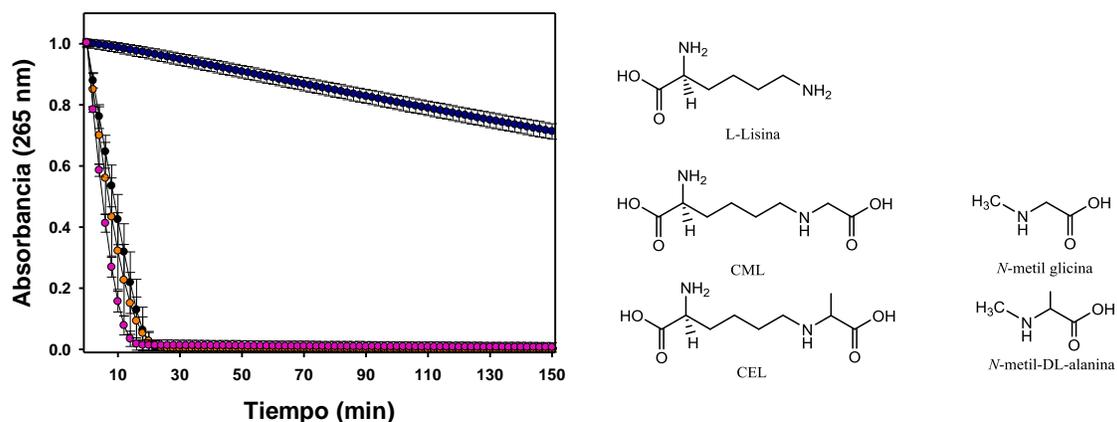


Figura 22. Capacidad de análogos de CEL y CML para inhibir la de la degradación de AA catalizada por Cu(II). (●) Cu(II) 2.5 μ M + AA 70 μ M, (●) Cu(II) 2.5 μ M + AA 70 μ M + N-metil glicina 160 μ M, (●) Cu(II) 2.5 μ M + AA 70 μ M + N-metil-DL-alanina 160 μ M, y (●) AA 70 μ M. Todos los experimentos fueron realizados en DT4. A la derecha se muestran las estructuras de L-Lisina, CML, CEL y los análogos utilizados en este experimento.

Los fragmentos de α Syn nativa generados por digestión proteolítica, también fueron capaces de inhibir la degradación de AA catalizada por Cu(II) (**Fig. 23**). La digestión con GLU-C dio lugar a fragmentos que contienen, de forma conjunta, los residuos Met1-Asp2 e His50 (**Tabla 1**). Sin embargo, dicha capacidad disminuye debido a la fragmentación, lo cual sugiere que la capacidad de unión al Cu(II) se ve afectada.

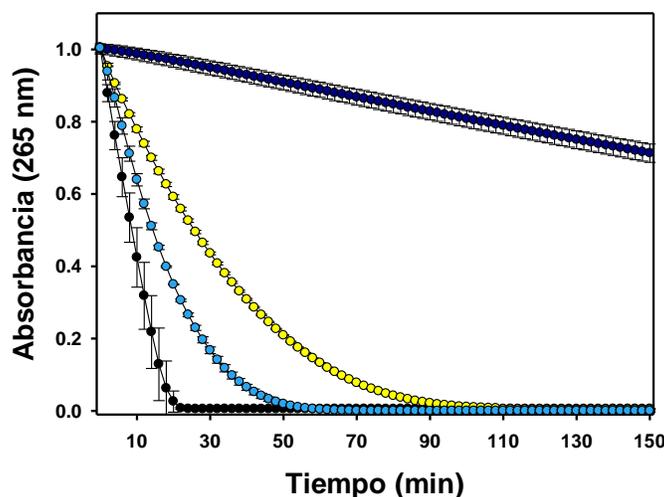


Figura 23. Capacidad de la α Syn fragmentada mediante digestión proteolítica para inhibir la degradación de AA catalizada por Cu(II). (●) Cu(II) 2.5 μ M + AA 70 μ M, (◐) Cu(II) 2.5 μ M + AA 70 μ M + fragmentos de α Syn (GLU-C) 10 μ M, (◑) Cu(II) 2.5 μ M + AA 70 μ M + α Syn nativa 10 μ M y (●) AA 70 μ M. Todos los experimentos fueron realizados en DT4.

4.5 La α -sinucleína nativa es capaz de inhibir la formación y secuestrar radicales libres

Proteínas como la A β o la α Syn inhiben la formación de radicales libres al formar complejos con Cu(II) (Huang, 1999; Pedersen, 2016). Sin embargo, también poseen la capacidad de secuestrarlos (Pedersen, 2016). Durante la degradación oxidativa de AA catalizada por Cu(II) se generan radicales libres (Guilloreau, 2007). Por ello, se utilizó dicho sistema para evaluar como las diferentes MPTs afectaban a la capacidad de la α Syn para inhibir la formación de radicales libres y secuestrarlos.

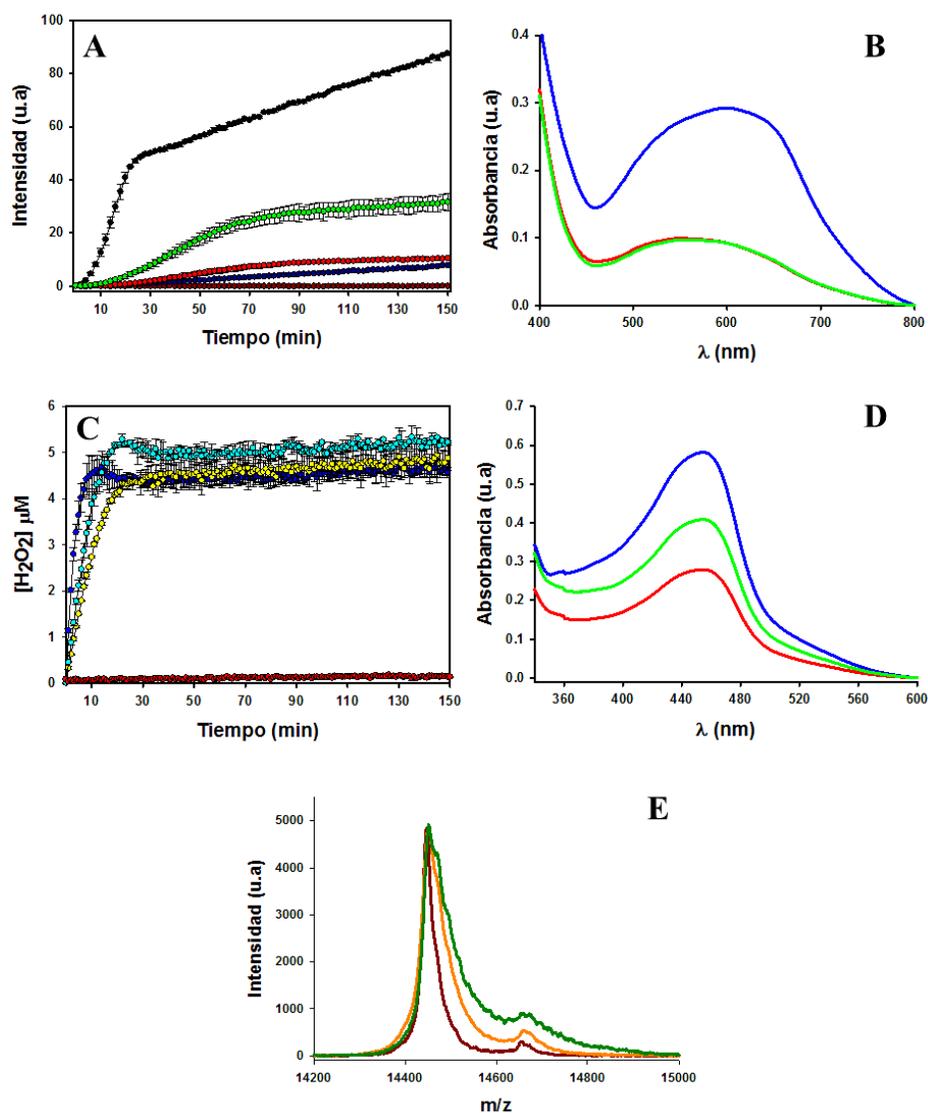


Figura 24. Capacidad de la α Syn nativa para inhibir la formación de radicales libres. A) Inhibición de la formación de radical \cdot OH. Medición de la intensidad de emisión a 450 nm ($\lambda_{exc}=395$ nm) de 7-OH-3-CCA en presencia de (●) Cu(II) 2.5 μ M solo, (●) AA 70 μ M solo, (●) Cu(II) 2.5 μ M + AA 70 μ M + α Syn 10 μ M, (●) Cu(II) 2.5 μ M + AA 70 μ M + α Syn 5 μ M y (●) Cu(II) 2.5 μ M + AA 70 μ M. B) Secuestro de radical \cdot O₂⁻. Espectro de absorción de la reacción por el método NBT en (—) ausencia de α Syn nativa, (—) presencia de α Syn nativa 10 μ M y (—) presencia de α Syn nativa 5 μ M. C) Formación de H₂O₂. Concentración en μ M de H₂O₂, obtenida a partir de la medición de la intensidad de emisión a 590 nm ($\lambda_{exc}=540$ nm) de resorufina, en (●) α Syn 10 μ M + AA 70 μ M, (●) α Syn 10 μ M + Cu(II) 2.5 μ M + AA 70 μ M, (●) α Syn 5 μ M + Cu(II) 2.5 μ M + AA 70 μ M y (●) Cu(II) 2.5 μ M + AA 70 μ M. D) Secuestro de radical \cdot OH. Espectro de absorción de la reacción por el método CUPRAC en (—) ausencia de α Syn nativa, (—) presencia de α Syn nativa 10 μ M y (—) presencia de α Syn nativa 5 μ M. E) Efecto de los radicales libres sobre la masa molecular de α Syn nativa. Espectros MALDI-TOF/TOF de (—) α Syn 10 μ M, (—) α Syn 10 μ M + Cu(II) 2.5 μ M, (—) α Syn 10 μ M + Cu(II) 2.5 μ M + AA 70 μ M a los 150 min de reacción. La α Syn secuestra e inhibe la formación de radicales libres, y su capacidad de secuestro involucra procesos oxidativos que modifican la masa molecular de la proteína.

Los resultados obtenidos mostraron que la α Syn nativa es capaz de inhibir la formación de radicales $\cdot\text{OH}$ (**Fig. 24A**) y de secuestrarlos una vez formados (**Fig. 24B**). La α Syn nativa también fue capaz de secuestrar el radical $\cdot\text{O}_2^-$ (**Fig. 24D**). Sin embargo, debido a que dicho radical no es tan reactivo como el radical $\cdot\text{OH}$ (Lotharius, 2002), la actividad secuestradora de estos últimos es mayor.

Por otra parte, se observó que la α Syn nativa poseía la capacidad de retardar la formación de H_2O_2 (**Fig. 24C**). El hecho de que la α Syn sea capaz de secuestrar radicales $\cdot\text{O}_2^-$ y unirse al Cu(II), explica su inhibición sobre la formación de H_2O_2 , y la menor formación de radicales $\cdot\text{OH}$, los cuáles también es capaz de secuestrar. Sin embargo, el secuestro de radicales libres por parte de la α Syn debería involucrar procesos oxidativos que modifiquen su masa molecular. Tal es así, que los espectros de MALDI-TOF/TOF de la α Syn nativa demostraron su oxidación durante la degradación de AA catalizada por Cu(II) como consecuencia del secuestro de radicales libres (**Fig. 24E**).

Por otra parte, se ha publicado que los complejos α Syn-Cu(II) también pueden generar radicales $\cdot\text{OH}$ al oxidar el AA mediante la reacción de Fenton (Huang, 1999; Wang, 2010). Este hecho explica porque la degradación oxidativa de AA catalizada por Cu(II), únicamente se retrasa y no es inhibida por completo. De hecho, la cantidad de H_2O_2 producida durante esta reacción tiende a ser mayor en presencia de α Syn que en ausencia de la misma (**Figura 24C**).

4.6 La glicación y nitración de α -sinucleína alteran su capacidad antioxidante

Otro de los objetivos de este trabajo fue evaluar si las diferentes MPTs estudiadas alteraban la capacidad de la α Syn para inhibir la formación del radical $\cdot\text{OH}$ y del H_2O_2 , y para secuestrar los radicales $\cdot\text{OH}$ y $\cdot\text{O}_2^-$. Es de esperar un incremento en la formación de radicales, dado que las MPTs están relacionadas con el incremento en su producción en la EP (Guerrero, 2013; Burai, 2015). Los resultados obtenidos demuestran que la glicación con MGO, la alquilación reductiva de Lys y la nitración con TNM alteran la capacidad de la α Syn para inhibir la formación de radicales.

4.6.1 La glicación con metilglioxal

La glicación de α Syn con MGO disminuye su capacidad para unir Cu(II), lo cual incrementa la concentración de Cu(II) libre, acelerando la degradación de AA y, por lo tanto, la formación de radicales libres debería ser mayor. Tal es así, que la α Syn-MGO presenta una capacidad inhibidora menor sobre la formación de radicales \cdot OH de la que mostraba la α Syn nativa (**Fig. 25A**). En este ensayo, también se observó que la α Syn-MGO es fluorescente bajo las condiciones del experimento (**Fig. 25F**). Dado que los AGEs mayoritarios formados son el CEL y MOLD, los cuales no son fluorescentes, este incremento de fluorescencia podría deberse a que durante la propia glicación, se forman radicales libres que inducen procesos oxidativos sobre la α Syn (Guerrero, 2013), los cuales incrementarían la fluorescencia de los diferentes grupos cromóforos, hecho que ocurre durante la oxidación del péptido A β catalizada por Cu(II) en presencia de H₂O₂ (Ali, 2005). La oxidación de la α Syn-MGO durante la glicación con MGO podría explicar también la heterogeneidad de especies proteicas resultantes.

A su vez, la formación de α Syn-MGO suprime totalmente la capacidad de la α Syn para secuestrar radicales \cdot OH (**Fig. 25D**) e incrementa su capacidad para secuestrar radicales \cdot O₂⁻ (**Fig. 25B**). En presencia de α Syn-MGO, la producción de H₂O₂ es mucho mayor que la observada en presencia de α Syn nativa, hecho que puede atribuirse a su la capacidad que tiene el α Syn-MGO para formar H₂O₂ en ausencia de Cu(II) (**Fig. 25C**). Es sabido que los AGEs entrecruzados promueven la formación de ROS en células SH-SY5Y (Shaikh, 2008). Por lo tanto, en ausencia de Cu(II), los AGEs entrecruzados y los aminoácidos oxidados durante la glicación con MGO podrían también jugar un papel importante en la formación de H₂O₂. La presencia de Cu(II) libre en solución, así como los complejos de α Syn-MGO-Cu(II) aceleran este proceso mediante las reacciones de Fenton y, en consecuencia, habrá una mayor formación de radicales \cdot OH. Los espectros MALDI-TOF/TOF de α Syn-MGO no permitieron obtener información concluyente acerca de los procesos oxidativos ocurridos durante la degradación de AA catalizada por Cu(II) debido a la heterogeneidad (**Fig. 25E**). Sin embargo, los radicales \cdot OH podrían acumularse debido a que la capacidad antioxidante en la α Syn-MGO se ve afectada y, de esta manera, su formación contribuiría al incremento del estrés oxidativo.

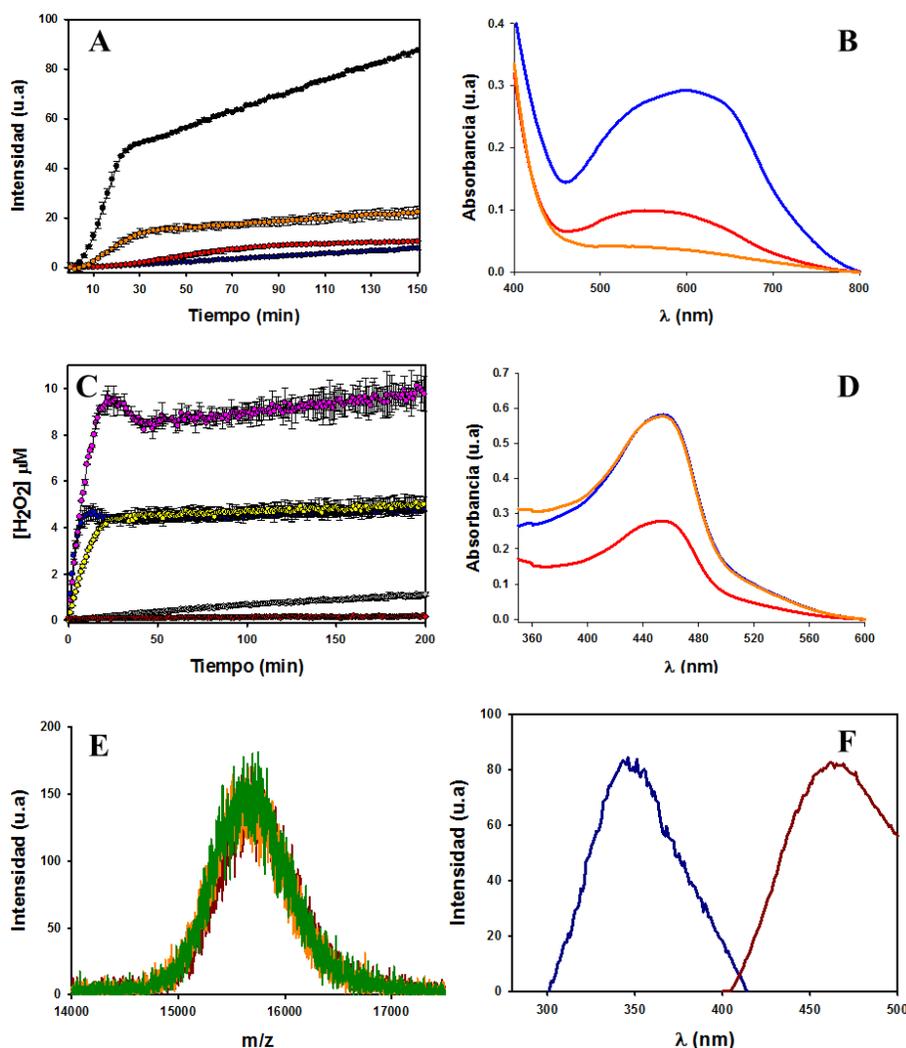


Figura 13. Efecto de la glicación de la α Syn nativa con MGO sobre la capacidad de inhibir la formación de radicales libres. A) Inhibición de la formación de radical \cdot OH. Medición de la intensidad de emisión a 450 nm ($\lambda_{exc}=395$ nm) de 7-OH-3-CCA en presencia de (●) AA 70 μ M solo, (●) Cu(II) 2.5 μ M + AA 70 μ M + α Syn 10 μ M, (●) Cu(II) 2.5 μ M + AA 70 μ M + α Syn-MGO 10 μ M y (●) Cu(II) 2.5 μ M + AA 70 μ M. B) Secuestro de radical \cdot O₂⁻. Espectro de absorción de la reacción por el método NBT en (—) ausencia de α Syn, (—) presencia de α Syn nativa 10 μ M y (—) presencia de α Syn-MGO 10 μ M. C) Formación de H₂O₂. Concentración en μ M de H₂O₂, obtenida a partir de la medición de la intensidad de emisión a 590 nm ($\lambda_{exc}=540$ nm) de resorufina, en (●) α Syn 10 μ M + AA 70 μ M, (●) α Syn-MGO 10 μ M + AA 70 μ M (●) α Syn 10 μ M + Cu(II) 2.5 μ M + AA 70 μ M, (●) α Syn-MGO 10 μ M + Cu(II) 2.5 μ M + AA 70 μ M y (●) Cu(II) 2.5 μ M + AA 70 μ M. D) Secuestro de radical \cdot OH. Espectro de absorción de la reacción por el método CUPRAC en (—) ausencia de α Syn, (—) presencia de α Syn nativa 10 μ M y (—) presencia de α Syn-MGO 10 μ M. E) Efecto de los radicales libres sobre la masa molecular de α Syn nativa. Espectros MALDI-TOF/TOF de (—) α Syn-MGO 10 μ M, (—) α Syn-MGO 10 μ M + Cu(II) 2.5 μ M, (—) α Syn-MGO 10 μ M + Cu(II) 2.5 μ M + AA 70 μ M a los 150 min de reacción. F) Espectro de (—) absorción y (—) emisión de α Syn-MGO 30 μ M en DT4. La glicación con MGO disminuye la capacidad de secuestro e inhibición de la formación de radicales \cdot OH e incrementa su capacidad para secuestrar radicales \cdot O₂⁻. La α Syn-MGO retrasa en menor medida la formación de H₂O₂ en presencia de Cu(II) en comparación con la α Syn nativa y, en ausencia de este catión, también promueve su formación.

4.6.2 Modificación química (alquilación reductiva)

La alquilación reductiva llevada a cabo en este trabajo pretende simular la glicación con MGO o GO, donde todas las Lys son modificadas de forma específica para obtener CEL o CML. Este método permite obtener una muestra homogéneamente glicada, donde todos los residuos presentan el mismo AGE.

Tal y como se ha mostrado, la modificación de las cadenas laterales de los residuos de Lys por CEL o CML, incrementa la afinidad de unión al Cu(II), lo que le confiere una mayor capacidad para inhibir la degradación de AA. En base a ello, se espera una menor formación de radicales libres. Tanto la α Syn-CEL como la α Syn-CML, fueron capaces de inhibir la formación de radical \cdot OH (**Fig. 26A**) de forma similar a la α Syn nativa. Por otra parte, éstas α Syn modificadas mostraron una disminución significativa en su capacidad para secuestrar dichos radicales (**Fig. 26D**), y ligera disminución en su capacidad para secuestrar radicales \cdot O₂⁻ (**Fig. 26B**). De hecho, los espectros MALDI-TOF/TOF de estas α Syn modificadas, mostraron un menor incremento en sus pesos moleculares que el observado para la α Syn nativa, una vez finalizada la oxidación del AA catalizada por Cu(II) (**Fig. 26E-F**). A su vez, se observó que tanto la α Syn-CEL como la α Syn-CML son capaces de retardar mucho más la formación de H₂O₂ que la α Syn nativa. Sin embargo, su concentración a tiempos elevados es también mayor a la observada en su ausencia y, ambas son capaces de promover la formación de H₂O₂ en ausencia de Cu(II) (**Fig. 26C**). La formación de CML afecta más la capacidad de α Syn para inhibir la formación de radicales libres que la formación de CEL, posiblemente debido a que la α Syn-CML se une al Cu(II) con mayor eficiencia que la α Syn-CEL.

Estas observaciones indican que, la formación de otros AGEs, suprimen la capacidad de la α Syn para secuestrar radicales \cdot OH en mayor proporción que la formación de CEL o CML. Sin embargo, la capacidad de secuestro de \cdot O₂⁻ en la α Syn-CEL y la α Syn-CML disminuye, lo cual sugiere que la α Syn-MGO posee modificaciones estructurales que incrementan su capacidad antioxidante frente al radical \cdot O₂⁻.

La disminución en la capacidad de secuestrar radicales \cdot OH, tanto en la α Syn-MGO como en la α Syn-CEL o la α Syn-CML, sugiere que las cadenas laterales de las Lys participan en el secuestro de dicho radical, hecho que ha sido demostrado en un trabajo previo (Guan, 2005). Además, estudios de ²H NMR demostraron que el radical \cdot OH puede unirse a los

residuos de Lys sustituyendo uno de los hidrógenos de los grupos $-\text{CH}_2$ en la posición γ ó ϵ (Nukuna, 2001). Los residuos de Lys en la αSyn representan un 10% del total de sus aminoácidos, por lo que la inaccesibilidad de estos residuos para el secuestro de radicales $\cdot\text{OH}$ podría modificar considerablemente su capacidad antioxidante.

Ni la *N*-(metil)-glicina ni la *N*-(metil)-DL-alanina fueron capaces de inhibir la formación del radical $\cdot\text{OH}$. A su vez, la *N*-(metil)-glicina no fue capaz de secuestrar dichos radicales, mientras que la *N*-(metil)-DL-alanina sólo lo hizo de forma marginal. Sin embargo, ambas moléculas pueden secuestrar pequeñas cantidades de radicales $\cdot\text{O}_2^-$. Este hecho sugiere que los residuos de Lys podrían también participar en el secuestro de los radicales $\cdot\text{O}_2^-$, y que la formación de CEL y CML disminuye esta capacidad.

En base a ello, se propone el siguiente mecanismo para explicar su acción. Tanto la αSyn -CEL como la αSyn -CML promueven la formación de ROS. A su vez, la presencia de estas αSyn modificadas disminuye la concentración de Cu(II) libre, debido a que poseen una mayor capacidad para unirse a este catión y, en consecuencia, la velocidad de formación de radicales libres es mucho menor en comparación con la αSyn nativa. Sin embargo, la formación de CEL y CML disminuye la capacidad antioxidante de la αSyn , y los complejos de αSyn -CEL-Cu(II) y αSyn -CML-Cu(II) promueven la producción de ROS y radicales libres mediante reacciones de Fenton, lo cual finalmente contribuye al incremento en los niveles de estrés oxidativo.

4.6.3 Nitración con tetranitrometano

La nitración de la αSyn ocurre como consecuencia del estrés oxidativo, un factor inductor de la muerte celular (Burai, 2015). Cuando las cuatro Tyr en la αSyn se encuentran modificadas, su capacidad de unión al Cu(II) disminuye y, en consecuencia, la degradación de AA catalizada ocurre más rápido que en la αSyn nativa. Por lo tanto, la nitración de la αSyn debería inducir una mayor formación de radicales.

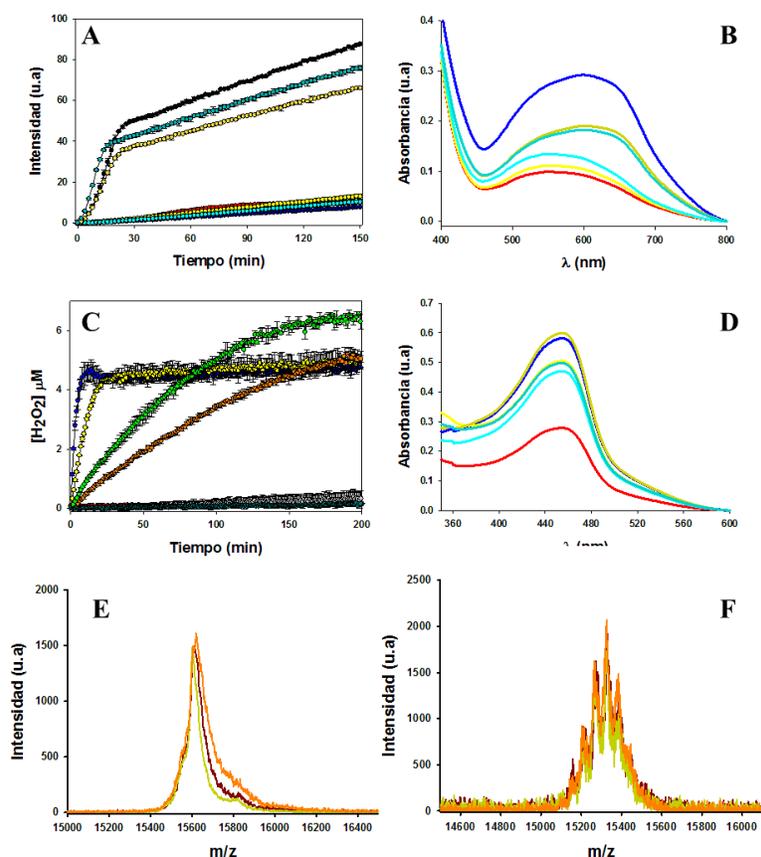


Figura 26. Efecto de la modificación química de los residuos de Lys en la α Syn nativa por alquilación reductiva sobre la capacidad de inhibir la formación de radicales libres.

A) Inhibición de la formación de radical \cdot OH. Medición de la intensidad de emisión a 450 nm ($\lambda_{exc}=395$ nm) de 7-OH-3-CCA en presencia de (●) AA 70 μ M solo, (●) Cu(II) 2.5 μ M + AA 70 μ M + α Syn 10 μ M, (●) Cu(II) 2.5 μ M + AA 70 μ M + α Syn-CML 10 μ M, (●) Cu(II) 2.5 μ M + AA 70 μ M + α Syn-CEL 10 μ M, (●) Cu(II) 2.5 μ M + AA 70 μ M + *N*-(metil)-glicina 160 μ M, (●) Cu(II) 2.5 μ M + AA 70 μ M + *N*-(metil)-DL-alanina 160 μ M y (●) Cu(II) 2.5 μ M + AA 70 μ M. B) Secuestro de radical \cdot O₂⁻. Espectro de absorción de la reacción por el método NBT en (—) ausencia de α Syn, (—) presencia de α Syn nativa 10 μ M, (—) presencia de α Syn-CML 10 μ M, (—) presencia de α Syn-CEL 10 μ M, (—) presencia de *N*-(metil)-glicina 160 μ M y (—) presencia de *N*-(metil)-DL-alanina 160 μ M. C) Formación de H₂O₂. Concentración en μ M de H₂O₂, obtenida a partir de la medición de la intensidad de emisión a 590 nm ($\lambda_{exc}=540$ nm) de resorufina, en (●) α Syn 10 μ M + AA 70 μ M, (●) α Syn-CML 10 μ M + AA 70 μ M, (●) α Syn-CEL 10 μ M + AA 70 μ M (●) α Syn 10 μ M + Cu(II) 2.5 μ M + AA 70 μ M, (●) α Syn-CML 10 μ M + Cu(II) 2.5 μ M + AA 70 μ M, (●) α Syn-CEL 10 μ M + Cu(II) 2.5 μ M + AA 70 μ M y (●) Cu(II) 2.5 μ M + AA 70 μ M. D) Secuestro de radical \cdot OH. Espectro de absorción de la reacción por el método CUPRAC en (—) ausencia de α Syn, (—) presencia de α Syn nativa 10 μ M, (—) presencia de α Syn-CML 10 μ M, (—) presencia de α Syn-CEL 10 μ M, (—) presencia de *N*-(metil)-glicina 160 μ M y (—) presencia de *N*-(metil)-DL-alanina 160 μ M. E) Efecto de los radicales libres sobre la masa molecular de α Syn nativa. Espectros MALDI-TOF/TOF de (—) α Syn-CEL 10 μ M, (—) α Syn-CEL 10 μ M + Cu(II) 2.5 μ M, (—) α Syn-CEL 10 μ M + Cu(II) 2.5 μ M + AA 70 μ M a los 150 min de reacción. F) Efecto de los radicales libres sobre la masa molecular de α Syn nativa. Espectros MALDI-TOF/TOF de (—) α Syn-CML 10 μ M, (—) α Syn-CML 10 μ M + Cu(II) 2.5 μ M, (—) α Syn-CML 10 μ M + Cu(II) 2.5 μ M + AA 70 μ M a los 150 min de reacción. La formación de CEL y CML en la α Syn disminuye su capacidad antioxidante. La α Syn-CEL y α Syn-CML son capaces de inhibir de la formación de radicales \cdot OH debido a que poseen una mayor capacidad para unirse al Cu(II). Sin embargo, estas α Syn modificadas también contribuyen al incremento oxidativo ya que promueven la formación de ROS y la acumulación de radicales libres.

Los resultados obtenidos demuestran que esta MPT no disminuye la capacidad de α Syn para inhibir la formación de radical $\cdot\text{OH}$ (**Fig. 27A**) ni el secuestro de los mismos (**Fig. 27D**). De hecho, los estudios en MALDI-TOF/TOF mostraron que la α Syn-NO₂ se oxida de forma similar a α Syn nativa durante la reacción de degradación de AA catalizada por Cu(II) (**Fig. 27E**). Puesto que la nitración es selectiva sobre los residuos de Tyr (Sokolovsky, 1966), las cadenas laterales de Lys en α Syn-NO₂ permanecen intactas, lo cual apoya la idea sobre el rol de estos residuos en la capacidad antioxidante de la α Syn nativa.

Aunque los resultados obtenidos a partir de α Syn-NO₂ parecen indicar que se trata de una especie “menos tóxica”, en realidad no lo es. La nitración de la α Syn disminuye su capacidad para inhibir la formación de H₂O₂ durante la degradación de AA catalizada por Cu(II). Esto podría ser debido a que la capacidad de α Syn-NO₂ para unirse a dicho catión también disminuye. Sin embargo, esta α Syn modificada es capaz de promover la formación de H₂O₂ por sí misma y en ausencia de Cu(II) (**Fig. 27C**), y lo hace en mayor proporción que la α Syn-MGO. La α Syn-NO₂ también incrementa su capacidad para secuestrar radicales $\cdot\text{O}_2^-$ (**Fig. 27B**), lo que sugiere la participación del grupo 3-NT en el secuestro de estos radicales.

La α Syn-NO₂ también promueve la formación de ROS y, en presencia de Cu (II), este proceso es acelerado y favorece el incremento en la producción de radicales $\cdot\text{OH}$ a través de la reacción de Fenton. A su vez, los complejos α Syn-NO₂-Cu(II) también generan ROS y radicales libres mediante esta reacción. El estrés oxidativo resultante de estos procesos es amortiguado por la capacidad de secuestro de radicales de la α Syn-NO₂. Sin embargo, la oxidación consecuente de dicha actividad, disminuyen su capacidad para unirse al Cu(II) y su capacidad antioxidante. De esta manera, la nitración de Tyr en la α Syn también contribuye al incremento del estrés oxidativo.

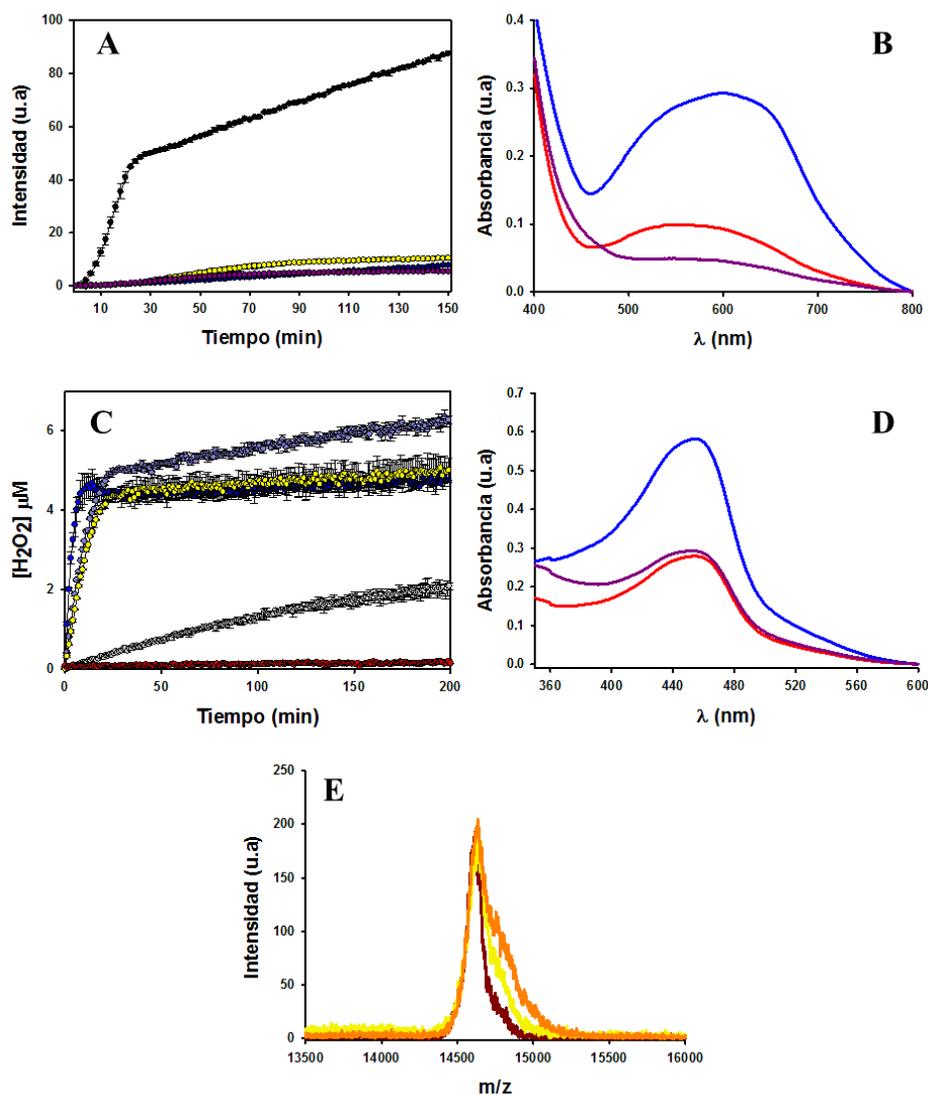


Figura 27. Efecto de la nitración de la α Syn nativa sobre la capacidad de inhibir la formación de radicales libres.

A) Inhibición de la formación de radical \cdot OH. Medición de la intensidad de emisión a 450 nm ($\lambda_{exc}=395$ nm) de 7-OH-3-CCA en presencia de (●) AA 70 μ M solo, (●) Cu(II) 2.5 μ M + AA 70 μ M + α Syn 10 μ M, (●) Cu(II) 2.5 μ M + AA 70 μ M + α Syn-NO₂ 10 μ M y (●) Cu(II) 2.5 μ M + AA 70 μ M. B) Secuestro de radical \cdot O₂. Espectro de absorción de la reacción por el método NBT en (—) ausencia de α Syn, (—) presencia de α Syn nativa 10 μ M y (—) presencia de α Syn-NO₂ 10 μ M. C) Formación de H₂O₂. Concentración en μ M de H₂O₂, obtenida a partir de la medición de la intensidad de emisión a 590 nm ($\lambda_{exc}=540$ nm) de resorufina, en (●) α Syn 10 μ M + AA 70 μ M, (●) α Syn-NO₂ 10 μ M + AA 70 μ M (●) α Syn 10 μ M + Cu(II) 2.5 μ M + AA 70 μ M, (●) α Syn-NO₂ 10 μ M + Cu(II) 2.5 μ M + AA 70 μ M y (●) Cu(II) 2.5 μ M + AA 70 μ M. D) Secuestro de radical \cdot OH. Espectro de absorción de la reacción por el método CUPRAC en (—) ausencia de α Syn, (—) presencia de α Syn nativa 10 μ M y (—) presencia de α Syn-MGO 10 μ M. E) Efecto de los radicales libres sobre la masa molecular de α Syn nativa. Espectros MALDI-TOF/TOF de (—) α Syn-NO₂ 10 μ M, (—) α Syn-NO₂ 10 μ M + Cu(II) 2.5 μ M, (—) α Syn-NO₂ 10 μ M + Cu(II) 2.5 μ M + AA 70 μ M a los 150 min de reacción. La α Syn-NO₂ conserva su capacidad de secuestro e inhibición de la formación de radicales \cdot OH, e incrementa su capacidad para secuestrar radicales \cdot O₂. Sin embargo, esta α Syn modificada es capaz de promover la formación de ROS presencia y ausencia de Cu(II).

5. CONCLUSIONES

Con el fin de describir de forma detallada el papel de diferentes MPTs observadas *in vivo* sobre las propiedades de la α Syn, el presente trabajo de fin de máster estudia el efecto de la glicación y la nitración, sobre la capacidad de la α Syn para unirse al Cu(II) y sobre su capacidad antioxidante. Dichas MPTs se han introducido mediante modificaciones químicas sobre la α Syn. Las especies resultantes fueron caracterizadas y, posteriormente se evaluaron las capacidades anteriormente mencionadas utilizando diferentes técnicas experimentales. Los resultados obtenidos en los estudios han permitido concluir:

- a) El método de producción de la α Syn nativa permite obtener sus monómeros puros. La glicación de la α Syn nativa con MGO resulta en la formación heterogénea de monómeros con distinto peso molecular, mientras que su alquilación reductiva genera monómeros modificados con un mismo tipo de AGE, ya sea CEL o bien CML. La nitración con TNM permitió la obtención de monómeros que presentaban las 4 Tyr de la secuencia de la α Syn modificadas mediante la formación de 3-NT.
- b) La glicación con MGO y la nitración de la α Syn nativa disminuyen su capacidad para unirse al Cu(II), mientras que la formación de CEL o CML sobre sus Lys incrementa su afinidad hacia este catión.
- c) La modificación de las Lys de la α Syn mediante su glicación con MGO o su alquilación reductiva, disminuye su capacidad antioxidante frente a radicales \cdot OH, mientras que la nitración de las Tyr no afecta dicha capacidad.
- d) La glicación y la nitración de la α Syn disminuyen su capacidad para inhibir la formación de H_2O_2 durante la degradación oxidativa de AA catalizada por Cu(II). Además, las α Syn modificadas son capaces de promover la formación de H_2O_2 en ausencia de Cu(II).
- e) La glicación con MGO y la nitración incrementan la capacidad de la α Syn para secuestrar radicales $\cdot O_2^-$, mientras que la modificación química de todas las cadenas laterales de Lys con CEL o CML disminuye dicha capacidad.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abeliovich, A., Schmitz, Y., Fariñas, I., Choi-Lundberg, D., Ho, W.H., Castillo, P.E., Shinsky, N., Verdugo, J.M., Armanini, M., Ryan, A., Hynes, M., Phillips H., Sulzer, D., & Rosenthal, A., *Neuron.*, 2000, 25, 239–252
- Ahmed, M.U., Brinkmann Frye, E., Degenhardt, T.P., Thorpe, S.R., & Baynes, J.W., *Biochem. J.*, 1997, 324, 565–570
- Ahmed, N., Thornalley, P.J., *Biochem. Soc. Trans.*, 2003, 31, 1417–1422
- Ali, F.E., Separovic, F., Barrow, C.J., Cherny, R.A., Fraser, F., Bush, A.I., Masters, C.L., & Barnham, K.J., *J. Peptide Sci.*, 2005, 11, 353–360
- Balasubramanian, D., & Kanwar, R., *Mol. Cell. Biochem.*, 2017, 234–235, 27–38
- Barathi, K.S. J., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 2007, 359, 115–120
- Bartels, T., Choi J.G., & Selkoe D.J., *Nature*, 2011, 477, 107–110
- Baynes, J.W., & Thorpe, S.R., *Diabetes*, 1999, 48, 1–9
- Baxter, E.W., & Reitz, A.B., *Org. React.*, 2001, 59
- Beckman, J.S., Chen, J., Ischiropoulos, H. & Crow, J.P., *Methods Enzymol.*, 1994, 233, 229–240
- Beckman, J.S., & Koppenol, W.H., *Am. J. Physiol.* 1996, 271, C1424–1437
- Bendor, J.T., Logan, T.P., & Edwards R.H., *Neuron*, 2013, 79, 1044–1066
- Bertoncini, C.W., Jung, Y.-S., Fernandez, C.O., Hoyer, W., Griesinger, C., Jovin, T.M., & Zweckstetter, M., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2005, 102, 1430–1435
- Betz, W.J., & Bewick, G.S., *Science*, 1992, 255, 200–203.
- Beyer, K., & Aurelio, A. *Mol. Neurobiol.*, 2013, 47, 509–524
- Binolfi, A., Rasia, R., Bertoncini, C.W., Ceolin, M., Zweckstetter, M., Griesinger, C., Jovin, T., Fernández, C.O., *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, 128, 9893–9901
- Binolfi, A., Lamberto, G.R., Durán, R., Quintanar, L., Bertoncini, C.W., Souza, J.M., Cervenansky, C., Zweckstetter, M., Griesinger, C., Fernández, C.O., *Inorg. Chem.*, 2008, 49, 10668–10679
- Binolfi, A., Rodríguez, E.E., Valensin, D., D’Amelio, N., Ippoliti, E., Obal, G., Duran, R., Magistrato, A., Prittsch, O., Zweckstetter, M., Valensin, G., Carloni, P., Quintanar, L., Griesinger, C., & Fernandez, C.O. *Inorg. Chem.*, 2010, 49, 10668–10679
- Boyd, A.E., Lebovitz, H.E., & Feldman, J.M., *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1971, 33, 829–837
- Breydo, L., Wu, J.W., & Uversky, V.N., *Biochim. Biophys. Acta.*, 2012, 1822, 261–285
- Burai, R., Ait-Bouziad, N., Chiki, A., & Lashuel, H.A., *J. Am. Chem. Soc.*, 2015, 137, 5041–5052
- Burré, J., Sharma, M., Tsetsenis, T., Buchman, V., Etherton, M.R., & Südhof, T.C., *Science* 2010, 329, 1663–1667
- Burré, J., Sharma, M., & Südhof, T.C., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 2014, 111, E4274–E4283
- Burré, J., Vivona, S., Diao, J., Sharma, M., Brunger, A.T., & Südhof, T.C., *Nature*, 2013, 498, E4–6
- Cacabelos, R., *Int. J. Mol. Sci.*, 2017, 18, E551
- Cali, T., Ottolini, D., Negro, A., & Brini, M., *J. Biol. Chem.*, 2012, 287, 17914–17929
- Chen, S.W., Drakulic, S., Deas, E., Ouberai, M., Aprile, F.A., Arranz, R., Ness, S., Roodveldt, C., Williams, T., De-Genst, E.J., Klenerman, E., Wood, N.W., Knowles, T.P., Alfonso, C., Rivas, G., Abramov, A.Y., Valpuesta, J.M., Dobson, C.M., & Cremades, M., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 2015, 112, E1994–E2003
- Chen, X., De Silva, H.A., Pettenati, M.J., Rao, P.N., St George-Hyslop, P., Roses, A.D., Xia, Y., Horsburgh, K., Uéda, K., & Saitoh, T., *Genomics*, 1995, 26, 425–427
- Conway, K.A., Rochet, J.C., Bieganski, R.M., & Lansbury, P.T. *Science*, 2001, 294, 1346–1349
- Covarrubias-Pinto, A., Acuña, A.I., Beltrán, F.A., Torres-Díaz, L., & Castro, M. A., *Int. J. Mol. Sci.*, 2015, 16, 28194–28217
- Dalfó, E., Portero-Otín, M., Ayala, V., Martínez, A., Pamplona, R., & Ferrer, I., *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 2005, 64, 816–830
- Davidson, W.S., Jonas, A., Clayton, D.F., & George, J.M., *J. Biol. Chem.*, 1998, 273, 9443–9449

- De Filippis, V., Frasson, R., & Fontana, A., *Prot. Sci.*, 2006, 15, 976-986
- De Ricco, R., Valensin, D., Dell'Acqua, S., Casella, L., Dorlet, P., Faller, P., & Hureau, C., *Inorg. Chem.*, 2015, 54, 4744–4751
- Deleersnijder, A., Gerard, M., Debyser, Z., & Baekelandt, V., *Trends Mol. Med.*, 2013, 19, 368–377
- Drew, S.C., *Chemistry*, 2015, 21, 7111–7118
- Drew, S.C., Leong, S.L., Pham, C.L., Tew, D.J., Masters, C.L., Miles, L.A., Cappai, R., & Barnham, K.J., *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, 130, 7766–7773
- Duan, G., & Walther, D., *PLoS Comput. Biol.*, 2015, 11, e1004049
- Duda, J.E., Giasson, B.I., Chen, Q., Gur, T.L., Hurtig, H.I., Stern, M.B., Gollomp, S.M., Ischiropoulos, H., Lee, V.M., & Trojanowski, J.Q., *Am. J. Pathol.*, 2000, 157, 1439–1445
- Dudzik, C.G., Walter, E.D., & Millhauser, G.L., *Biochemistry*, 2011, 50, 1771–1777
- Esposito, G., Ana Clara, F., & Verstreken, P., *Dev. Neurobiol.*, 2012, 72, 134–144
- Fauvet, B., Fares, M.-B., Samuel, F., Dikiy, I., Tandon, A., Eliezer, D., & Lashuel, H.A., *J. Biol. Chem.*, 2012a, 287, 28243–28262
- Fauvet, B., Mbefo, M.K., Fares, M.-B., Desobry, C., Michael, S., Ardah, M.T., Tsika, E., Coune, P., Prudent, M., Lion, N., Eliezer, D., Moore, D.J., Schneider, B., Aebischer, P., El-Agnaf, O.M., Masliah, E., & Lashuel, H.A., *J. Biol. Chem.*, 2012b, 287, 15345–15364
- Fernández, C.O., Hoyer, W., Zweckstetter, M., Jares-Erijman, E.A., Subramaniam, V., Griesinger, C., & Jovin, T.M., *EMBO J.*, 2004, 23, 2039–2046
- Ferreira, A., & Paganoni, S., *Mol. Neurobiol.*, 2002, 26, 69–80
- Fortin, D.L., Troyer, M.D., Nakamura, K., Kubo, S., Anthony, M.D., & Edwards, R.H., *J. Neurosci.*, 2004, 24, 6715–6723
- Frye, E.B., Degenhardt, T.P., Thorpe, S.R., & Baynes, J.W., *J. Biol. Chem.*, 1998, 273, 18714–18719
- García-Ramos, R., Valdés, E.L., Ballesteros, L., Jesús, S., & Mir, P., *Neurología*, 2016, 31, 401–413
- Giasson, B.I., Duda, J.E., Murray, I.V., Chen, Q., Souza, J.M., Hurtig, H.I., Ischiropoulos, H., Trojanowski, J.Q., & Lee, V.M., *Science*, 2000, 290, 985–989
- Giasson, B.I., Murray, I.V., Trojanowski, J.Q., & Lee, V.M., *J. Biol. Chem.*, 2001, 276, 2380–2386
- Giráldez-Pérez, R., Antolín-Vallespín, M., Muñoz, M., & Sánchez-Capelo, A., *Acta Neuropathol. Commun.*, 2014, 2, 176
- Gorell, J.M., Johnson, C.C., Rybicki, B.A., Peterson, E.L., Kortsha, G.X., Brown, G.G., & Richardson, R.J., *Neurology*, 1997, 48, 650–658
- Graham, D.G., *Mol. Pharmacol.*, 1978, 14, 633–643
- Guan, J., & Chance, M. R., *TRENDS Bichem. Sci.*, 2005, 30, 583-592
- Guardia-Laguarta, C., Area-Gomez, E., Schon, E.A., & Przedborski, S., *Front. Neuroanat.*, 2015, 9, 17
- Guerrero, E., Vasudevaraju, P., Hegde, M.L., Britton, G.B., & Rao, K.S., *Mol. Neurobiol.* 2013, 47, 525–536
- Guilloreau, L., Combalbert, S., Sournia-Saquet, A., Mazarguil, H., & Faller, P., *Chembiochem*, 2007, 8, 1317–1325
- Hachiya, M., & Akashi, M., *Radiat. Res.*, 2005, 163, 271–282
- Halliwel, B., *J. Neurochem.*, 1992, 59, 1609–1623
- Halliwel, B., *Lancet*, 1994, 344, 721-724
- Halliwel, B., & Gutteridge, J.M., *Methods Enzymol.* 1990, 186, 1–85
- Hamani, C., & Lozano, A.M., *Ann. N Y Acad. Sci.*, 2003, 991, 15–21
- Hashimoto, M., Hsu, L.J., Sisk, A., Xia, Y., Takeda, A., Sundsmo, M., & Masliah, E., *Brain Res.* 1998, 799, 301–306
- Hodara, R., Norris, E.H., Giasson, B.I., Mishizen-Eberz, A.J., Lynch, D.R., Lee, V.M., Ischiropoulos, H., *J. Biol. Chem.*, 2004, 279, 47746-47753
- Hodge, J.E., *Adv. Carbohydr. Chem.*, 1955, 10, 169–205
- Horton, A.A., Fairhurst, S., & Bus, J.S., *Crit. Rev. Toxicol.*, 1987, 18, 27–79
- Huang, X., Atwood, C.S., Hartshorn, M.A., Multhaup, G., Goldstein, L.E., Scarpa, R.C., Cuajungco,

- M.P., Gray, D.N., Lim, J., Moir, R.D., Tanzi, R.E., & Bush, A.I., *Biochemistry*, 1999, 38, 7609-7616
- Joachim, C.L., & Selkoe, D.J., *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.*, 1992, 6, 7–34
- Kim, K.S., Choi, S.Y., Kwon, H.Y., Won, M.H., Kang, T.C., & Kang, J.H., *Free Radic. Biol. Med.* 2002, 32, 544–550
- Kowalik-Jankowska, T., Rajewska, A., Jankowska, A., & Grzonka, Z., *Dalton trans.*, 2006, 42, 5068-5076
- Krüger, R., Kuhn, W., Müller, T., Voitalla, D., Graeber, M., Kösel, S., Przuntek, H., Epplen, J.T., Schols, L., & Riess, O., *Nature Genetics*, 1998, 18, 106–108
- Lapolla, A., Traldi, P., & Fedele, D., *Clin. Biochem.* 2005, 38, 103–115
- Lipman, I.J., Boykin, M.E., & Flora, R.E., *J. Chronic Dis.*, 1974, 27, 573–579
- Lotharius, J., & Brundin P., *Nature Rev. Neurosci.*, 2002, 3, 932–942
- Maillard, L.C., *C. r. Acad. Sci.*, 1912, 154, 1554–1556
- Maroteaux, L., Campanelli, J.T., & Scheller, R.H., *J. Neurosci.*, 1988, 8, 2804–2815
- Maroteaux, L., & Scheller, R.H., *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 1991, 11, 335–343
- Miller, D.M., Buettner, G.R., & Aust, S.D., *Free Radic. Biol. Med.* 1990, 8, 95–108
- Miller, D.W., Hague, S.M., Clarimon, J., Baptista, M., Gwinn-Hardy, K., Cookson, M.R., & Singleton, A.B., *Neurology*, 2004, 62, 1835–1838
- Moriarty, G.M., Minetti, C.A., Remeta, D.P., & Baum, J., *Biochemistry*, 2014, 53, 2815–2817
- Morris, J. K., Bomhoff, G.L., Stanford, J.A., & Geiger, P.C., *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 2010, 299, R1082–R1090
- Münch, G., Lüth, H.J., Wong, A., Arendt, T., Hirsch, E., Ravid, R., & Riederer, P., *J. Chem. Neuroanat.*, 2000, 20, 253–257
- Murphy, D.D., Rueter, S.M., Trojanowski, J.Q., & Lee, V.M., *J. Neurosci.*, 2000, 20, 3214–3220
- Nizami, S., Lee, V. W., Davies, J., Long, P., Jovanovic, J. N., & Sihra, T. S., *Biochem. Soc. Trans.*, 2010, 38, 529-535
- Nukuna, B. N., Goshe, M. B., & Anderson, V. E., *J. Am. Chem. Soc.*, 2001, 123, 1208-1214
- Ono, K., Ikeda, T., Takasaki, J., & Yamada, M., *Neurobiol. Dis.*, 2011, 43, 715–724
- Paik, S.R., Shin, H.J., Lee, J.H., Chang, C.S., & Kim, J., *Biochem. J.*, 1999, Pt 3, 821–828
- Paik, S.R., Shin, H.J., & Lee, J.H., *Arch. Biochem. Biophys.*, 2000, 378, 269–277
- Pashikanti, S., Boissonneault, G.A., & Cervantes-Laurean, D., *Free Radic. Biol. Med.*, 2011, 50, 1410–1416
- Pedersen, J.T., Chen, S.W., Borg, C.B., Ness, S., Bahl, J.M., Heegaard, N.H., Dobson, C.M., Hemmingsen, L., Cremades, N., & Teilum, K., *J. Am. Chem. Soc.*, 2016, 138, 3966–3969
- Phillips, S.A., & Thornalley, P.J., *Eur. J. Biochem.*, 1993, 212, 101–105
- Pileblad, E., Slivka, A., Bratvold, D., & Cohen, G., *Arch. Biochem. Biophys.* 1988, 263, 447–452
- Radi, R., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2004, 101, 4003–4008
- Ranjan, P., *Biochim. Biophys. Acta.*, 2017, 1861, 365-374
- Rasia, R.M., Bertoncini, C.W., Marsh, D., Hoyer, W., Cherny, D., Zweckstetter, M., Griesinger, C., Jovin, T.M., & Fernández, C.O., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2005, 102, 4294–4299
- Riordan, J. F., Sokolovsky, M., & Vallee, B. L., *J. Am. Chem. Soc.*, 1966, 88, 4104
- Reynolds, A.D., Glanzer, J.G., Kadiu, I., Ricardo-Dukelow, M., Chaudhuri, A., Ciborowski, P., Cerny, R., Gelman, B., Thomas, M.P., Mosley, R.L., Gendelman, H.E., *J. Neurochem.*, 2008, 104, 1504–1525
- Rizo, J., & Rosenmund, C., *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2008, 15, 665–674
- Rotermund, C., Truckenmüller, F.M., Schell, H., & Kahle, P.J., *J. Neurochem.*, 2014, 131, 848–858
- Ruiz-Roca, B., Navarro, M. P., & Seiquer, I., *J. Agric. Food Chem.*, 2008, 56, 9056-9063
- Ryan, T.A., Reuter, H., Wendland, B., Schweizer, F.E., Tsien, R.W., & Smith, S.J., *Neuron*, 1993, 11, 713–724
- Sandyk, R., *Int. J. Neurosci.*, 1993, 69, 125–130
- Saxena, P., Saxena, A.K., Cui, X.L., Obrenovich, M., Gudipaty, K., & Monnier, V.M., *Invest.*

- Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2000, 41, 1473-1481
- Schmidt, A.M., Yan, S.D., Yan, S.F., & Stern, D.M., *Biochim. Biophys. Acta.*, 2000, 1498, 99–111
- Seifert, T.S., Krause, R., Gloe, K., & Henle, T., *J. Agric. Food Chem.*, 2004, 52, 2347-2350
- Serpell, L.C., Berriman, J., Jakes, R., Goedert, M., & Crowther, R.A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000, 97, 4897–4902
- Sevcsik, E., Trexler, A.J., Dunn, J.M., & Rhoades, E., *J. Am. Chem. Soc.*, 2011, 133, 7152-7158
- Shaikh, S., & Nicholson, L. F., *J. Neurosci. Res.*, 2008, 86, 2071-2082
- Singh, V.P., Bali, A., Singh, N., & Jaggi, A.S., *Korean J. Physiol. Pharmacol.*, 2014, 18, 1–14
- Spillantini, M.G., Schmidt, M.L., Lee, V.M., Trojanowski, J.Q., Jakes, R., & Goedert, M., *Nature*, 1997, 388, 839–840
- Südhof, T.C., *Nature*, 1995, 375, 645–653
- Südhof, T.C., & Rothman, J.E., *Science*, 2009, 323, 474–477
- Takahashi, N., Miner, L.L., Sora, I., Ujike, H., Revay, R.S., Kostic, V., Jackson-Lewis, V., Przedborski, S., & Uhl, G.R., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, 94, 9938
- Thornalley, P.J., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2005, 1043, 111–117
- Trétiakoff, C., 1919, Paris, Jouve
- Uversky, V.N., Li, J., & Fink, A.L., *J. Biol. Chem.*, 2001a, 276, 44284–44296
- Uversky, V.N., Li, J., & Fink, A.L., *J. Biol. Chem.*, 2001b, 276, 10737–10744
- Valencia, J. V., Weldon, S. C., Quinn, D., Kiers, G. J., DeGroot, J., TeKoppele, J. M., & Hughes, T. E., *Anal. Biochem.*, 2004, 324, 68-78
- Verstreken, P., Koh, T.W., Schulze, K.L., Zhai, R.G., Hiesinger, P.R., Zhou, Y., Mehta, S.Q., Cao, Y., Roos, J., & Bellen, H.J., *Neuron*, 2003, 40, 733–748
- Vicente Miranda, H., El-Agnaf, O.M., & Outeiro, T.F., *Mov. Disord.*, 2016, 31, 782–790
- Wang, C., Liu, L., Zhang, L., Peng, Y., & Zhou, F., *Biochemistry*, 2010, 49, 8134-814
- Wang, C., Zhao, C., Li, D., Tian, Z., Lai, Y., Diao, J., & Liu, C., *Front. Mol. Neurosci.*, 2016, 9, 48
- Weinreb, P.H., Zhen, W., Poon, A.W., Conway, K.A., & Lansbury, P.T., *Biochemistry*, 1996, 35, 13709–13715
- Wirdefeldt, K., Adami, H.O., Cole, P., Trichopoulos, D., & Mandel, J., *Europ. J. Epidemiol.*, 2011, 26, 1–58
- Withers, G.S., George, J.M., Banker, G.A., & Clayton, D.F., *Brain Res. Develop. Brain Res.*, 1997, 99, 87–94
- Wood, S.J., Wypych, J., Steavenson, S., Louis, J.C., Citron, M., & Biere, A.L., *J. Biol. Chem.*, 1999, 274, 19509–19512
- Wu, D.-C., Teismann, P., Tieu, K., Vila, M., Jackson-Lewis, V., Ischiropoulos, H., & Przedborski, S., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2003, 100, 6145–6150
- Yu, Z., Xu, X., Xiang, Z., Zhou, J., Zhang, Z., Hu, C., & He, C., *PLoS ONE*, 2010, 5, e9956
- Zarranz, J.J., Alegre, J., Gómez-Esteban, J.C., Lezcano, E., Ros, R., Ampuero, I., Vidal, L., Hoenicka, J., Rodriguez, O., Atarés, B., Llorens, V., Gomez Tortosa, E., Del Ser, T., Muñoz, D.G., De Yébenes, J.G., *Ann. Neurol.*, 2004, 55, 164–173