



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

**INTERACCIÓN ENTRE ALFA-SINUCLEÍNA Y SINFILINA. ¿MECANISMO DE PROTECCIÓN CELULAR EN EL MAL DE PARKINSON?**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:  
LUIS EDUARDO FONSECA ORNELAS

TUTOR PRINCIPAL

Dr. ENRIQUE REYNAUD GARZA  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. LEONOR PÉREZ MARTÍEZ  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM

Dr. TAKUYA NISHIGAKI SHIMIZU  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM

Cuernavaca, 2014



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

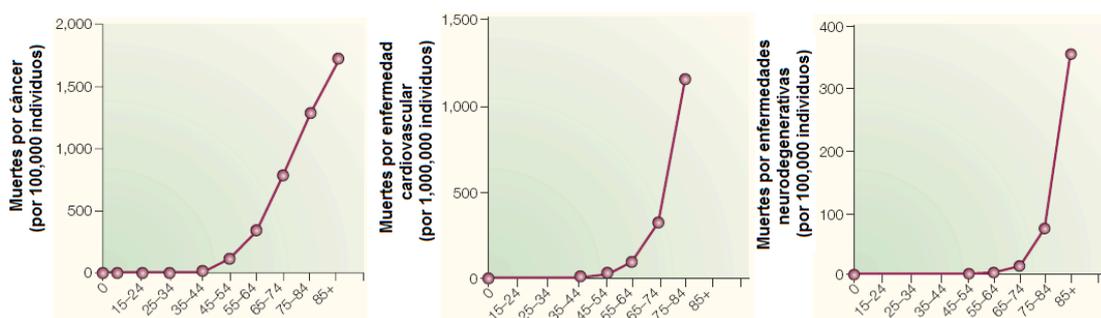
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>3</b>
Parkinson, otras enfermedades neurodegenerativas y el papel de las formaciones amiloides.....	4
<b>1. Alfa-sinucleína.....</b>	<b>9</b>
<b>2. Propiedades estructurales de la alfa-sinucleína.....</b>	<b>11</b>
<b>3. Rutas y determinantes moleculares en el plegamiento defectuoso y agregación de la alfa-sinucleína.....</b>	<b>13</b>
3.1. Estructura y polimorfismo de las fibras de alfa-sinucleína.....	13
3.2. Estructura de los oligómeros de alfa-sinucleína.....	17
3.3. Agregación de alfa-sinucleína y su relación con la muerte celular.....	18
<b>4. Alfa-sinucleína y su interacción con moléculas pequeñas y otras proteínas.....</b>	<b>20</b>
4.1. El papel de toxinas ambientales: Pesticidas.....	20
4.2. El rol de los metales en la agregación de alfa-sinucleína.....	21
4.3. Alfa-sinucleína y otras proteínas.....	23
<b>5. Sinfilina .....</b>	<b>24</b>
<b>6. Alfa-sinucleína, sinfilina, moléculas pequeñas y cómo se pueden atacar estas interacciones en el laboratorio del Doctor Enrique Reynaud .....</b>	<b>32</b>
<b>Justificación.....</b>	<b>33</b>
<b>Hipótesis .....</b>	<b>34</b>
<b>Objetivo general .....</b>	<b>34</b>
<b>Materiales y Métodos .....</b>	<b>35</b>
<b>Resultados .....</b>	<b>44</b>
<b>Discusión y Conclusiones.....</b>	<b>49</b>
<b>Referencias .....</b>	<b>52</b>

## INTRODUCCIÓN

El envejecimiento representa, sin duda, uno de los más grandes factores de riesgo para muchas enfermedades. Por ejemplo, desarrollar cáncer es 10 veces más probable cuando se está por encima de los 65 años de edad que cuando se está por debajo (Finkel 2005). Esta relación también es evidente cuando se trata de enfermedades cardiovasculares y, de particular interés para esta tesis, neurodegenerativas (Fig. 1). El incremento en la esperanza de vida en los países desarrollados genera un aumento sostenido en el tamaño de la población mayor de 65 años y, como resultado, una acumulación de personas susceptibles de adquirir y desarrollar alguna enfermedad neurodegenerativa (Skovronsky, Lee, and Trojanowski 2006; Christensen et al. 2009). Aunque este crecimiento exponencial en la incidencia de ciertas enfermedades con respecto a la edad tiene muchas causas, hay evidencias claras de que tanto el estrés oxidativo ocasionado por especies reactivas de oxígeno (en particular, radicales generados por las mitocondrias en la respiración celular) como la generación y acumulación de proteínas con plegamiento defectuoso, juegan un papel determinante en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas (Orrenius, Gogvadze, and Zhivotovsky 2007; Chiti and Dobson 2006; Yankner, Lu, and Loerch 2008).



**Figura 1.** Tasa de mortandad en función de la edad. a) Todas las formas de cáncer. b) Enfermedades cardiovasculares. c) Enfermedades neurodegenerativas. Los tres casos demuestran un rápido incremento tanto en la incidencia como en la mortalidad a medida que la edad aumenta (revisado en Finkel 2005).

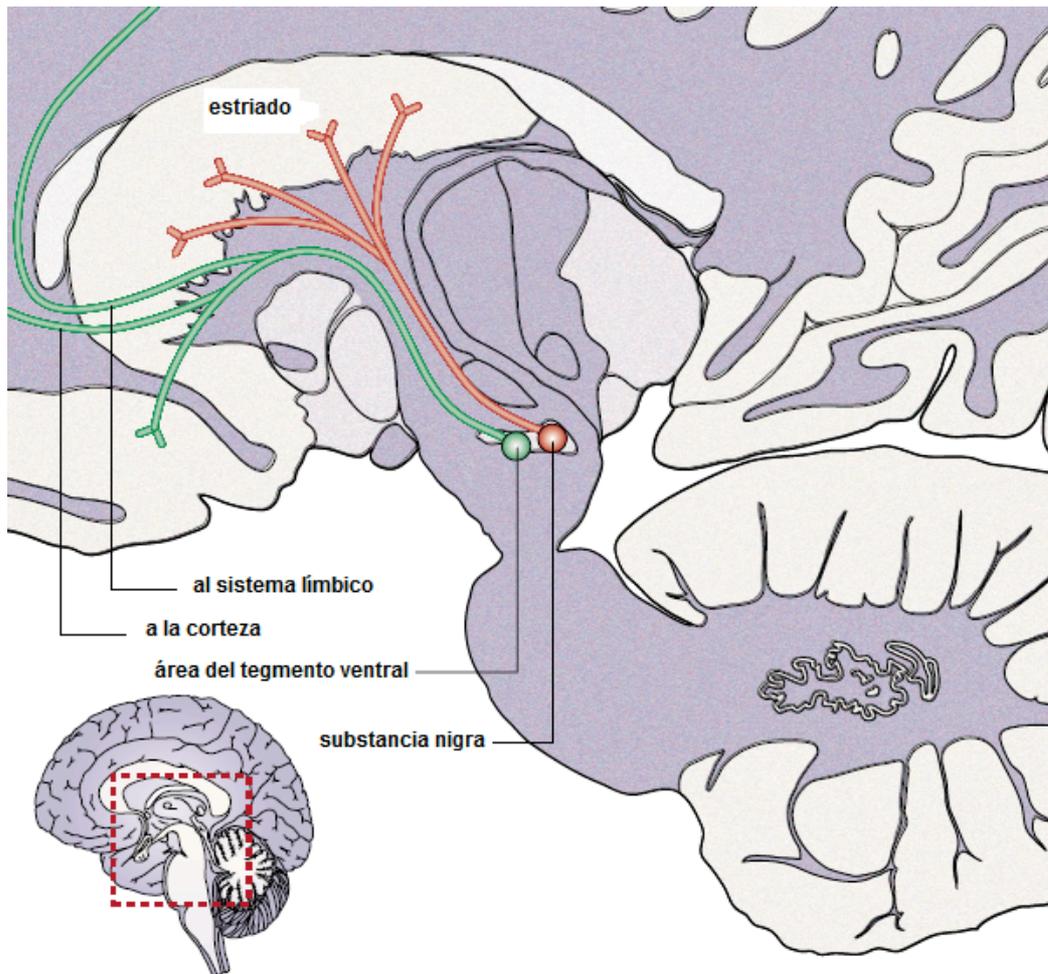
## ***Parkinson, otras enfermedades neurodegenerativas y el papel de las formaciones amiloides.***

Los síntomas de lo que hoy llamamos enfermedad de Parkinson (EP) fueron descritos por primera vez por el médico inglés James Parkinson en 1817 y el término de "enfermedad de Parkinson" fue acuñado en su honor hasta 1861 por Jean-Martin Charcot (Shulman, De Jager, and Feany 2011). Contribuciones importantes en la caracterización de esta enfermedad fueron hechas por Blocq y Marinesco (Catala and Poirier 2012) y Fritz Lewy (Goedert et al. 2012) que, en conjunto, permitieron determinar que la causa principal de la EP es la pérdida de neuronas en la *sustancia nigra* del cerebro y una de las características prevalentes en estos pacientes es la acumulación de agregados eosinofílicos anormales circundando esta área (Lees, Hardy, and Revesz 2009). También de vital importancia en la historia de la EP fue el descubrimiento hecho por Ehringer y Hornykiewicz, quienes mostraron que la dopamina es un neurotransmisor importante en la homeostasis del sistema nervioso central y no simplemente un intermediario en la síntesis de adrenalina y noradrenalina (como se creía hasta entonces), que juega un papel importante en esta enfermedad (Hornykiewicz 2010; Abbott 2010).

La EP se desarrolla principalmente en personas mayores de 65 años (Fig. 1), su incidencia aumenta de 0.6% entre los 65 y 69 años de edad a 2.6%-3.5% en personas mayores de 85 años de edad, causando la muerte en uno de cada dos pacientes alrededor de quince años después de la aparición de los primeros síntomas (Martin, Schapira, and Stocchi 2007; Lees, Hardy, and Revesz 2009; Obeso et al. 2010). Asimismo, la mayor parte de la evidencia apunta que tanto el sexo como la raza no generan diferencias significativas en la incidencia de EP, y sus causas permanecen casi tan elusivas ahora a como lo eran en 1817 (Lees, Hardy, and Revesz 2009). A nivel sintomatológico, la EP

se caracteriza por la aparición de una o más de las siguientes manifestaciones: deterioro general de las habilidades motoras (referida en manera general como hipocinesia), arrastre de los pies al caminar, fatiga, rigidez y tremor muscular. Existen también síntomas secundarios, tales como sialorrea (incapacidad de tragar), seborrea (alta producción de sebo en el cuero cabelludo), así como casos de depresión y ansiedad que pueden derivar en demencia (Martínez-Martín and Damián 2010).

A nivel tisular, la EP se caracteriza por la pérdida gradual y sostenida de neuronas dopaminérgicas de la *sustancia nigra* (Fig 2). La *sustancia nigra* es una estructura cerebral localizada en el mesencéfalo que juega un rol fundamental en el circuito de recompensa, adicciones y, de vital importancia en la EP, el movimiento. La *sustancia nigra* debe su nombre a que ciertas regiones de ésta presentan tonos más oscuros que las regiones vecinas, debido a la alta concentración de neuromelanina en las neuronas dopaminérgicas (componente principal de la *sustancia nigra*). La *sustancia nigra* es, junto con otros cuatro núcleos, parte del ganglio basal e inerva, entre otras regiones cerebrales, al estriado, una estructura encargada del control motor. Está dividida en dos partes: la *pars reticulata* (poblada principalmente por neuronas GABAérgicas) y la *pars compacta* (formada por neuronas dopaminérgicas). Sin la dopamina sintetizada y liberada por las neuronas dopaminérgicas, el estriado sufre un desbalance tal que el control de los movimientos finos es dañado, generando así los síntomas cardinales de la EP (Lang and Lozano 1998; Lees, Hardy, and Revesz 2009; Cookson 2005; Moore et al. 2005). Es importante mencionar también que dichos síntomas son aparentes únicamente hasta que aproximadamente el 85% de las neuronas dopaminérgicas de la *sustancia nigra* han muerto, lo cual dificulta tanto la detección como el tratamiento de esta enfermedad.



**Figura 2.** Vías dopaminérgicas en el cerebro humano. El esquema indica la localización de neuronas dopaminérgicas en el área del tegmento ventral (en verde) y en la sustancia nigra (en rojo). En los pacientes parkinsonianos las neuronas de la sustancia nigra se degeneran, provocando muchas de las anomalías motoras que se presentan en esta enfermedad. (Modificado de Goedert, 2001).

Además de la enfermedad de Parkinson, otras enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer y Huntington se caracterizan por la pérdida gradual y sostenida de neuronas en el sistema nervioso. Si bien es cierto que todas ellas presentan características muy particulares que las diferencian entre sí (como su incidencia, los síntomas que generan y el tipo neuronal que afectan) es también claro que una característica recurrente es la aparición de agregados proteicos amiloides insolubles (Tabla 1). Estos agregados están formados por proteínas normalmente solubles y funcionales que, por diferentes razones, adquieren una conformación tridimensional

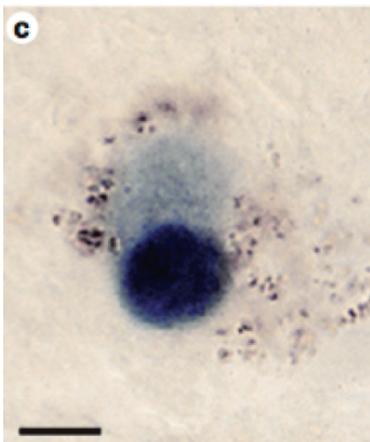
diferente a la normal. Esto promueve su mal plegamiento y eventual agregación. La proteína en cuestión (ver Tabla 1) varía con respecto al desorden neurodegenerativo, se expresa generalmente de manera sistemática y, por razones desconocidas, tiende a acumularse específicamente en el sistema nervioso central. Los agregados se depositan desde edad temprana en el individuo, pero sólo generan síntomas clínicos detectables en edades avanzadas. La mayoría de los casos son esporádicos, pero también hay formas genéticas/familiares que son causadas por mutaciones en el gen que codifica para la proteína y que la hacen más susceptible de agregarse (Skovronsky, Lee, and Trojanowski 2006).

**Tabla 1. Enfermedades neurodegenerativas caracterizadas por deposición de proteínas agregadas.**

<b>Enfermedad</b>	<b>Tipo de agregado</b>	<b>Localización</b>	<b>Proteína agregada</b>
<b>Alzheimer</b>	Placa amiloide	Intra-Extracelular	A $\beta$ , Tau.
<b>Esclerosis lateral amiotrófica</b>	Inclusiones hialinas	Intracitoplásmica	Superóxido dismutasa-1 SOD1
<b>Demencia con cuerpos de Lewy</b>	Cuerpos de Lewy	Intracitoplásmica	$\alpha$ -sinucleína
<b>Huntington</b>	Inclusiones neuronales	Intranuclear	Huntingtina
<b>Atrofia multi- sistémica</b>	Inclusiones gliales	Intracitoplásmica	$\alpha$ -sinucleína
<b>Parkinson</b>	Cuerpos de Lewy	Intracitoplásmica	$\alpha$ -sinucleína
<b>Prion</b>	Placas de prion	Extracelulares	Prion (PrP)

En la EP, estos agregados amiloides son denominados cuerpos de Lewy, formados principalmente por la proteína alfa-sinucleína. Estas inclusiones fueron descritas por

primera vez en 1912 por Fritz Jakob Heinrich Lewy, quien las estudió en más de 80 cerebros de pacientes con EP, ubicándolas en el núcleo motor dorsal del nervio vago, el núcleo basal de Meynert, el *globus pallidus*, el núcleo lateral del tálamo, y el núcleo periventricular del tálamo. Las inclusiones descritas por Lewy eran eosinofílicas, insolubles en alcohol, cloroformo y benceno, lo cual coincidía con la presencia de un alto componente proteico (Goedert et al. 2012). En 1919, Tretiakoff reportó la presencia de cuerpos y neuritas de Lewy en la sustancia *nigra* de pacientes con EP, y también demostró la degeneración de neuronas en la *substantia nigra* y postuló una conexión entre la pérdida de células nerviosas, temores y rigidez muscular. Ahora está bien establecido que las neuronas dopaminérgicas en la *substantia nigra* inervan al putamen dorsal en el estriado, y es precisamente en esta región donde se observa la mayor pérdida de dopamina en pacientes con EP.



**Figura 3.** Cuerpo de Lewy en cerebro de paciente con EP. La inmunotinción es positiva para anticuerpos anti alfa-sinucleína (Spillantini et al. 1997).

Una vez que fue aceptado que los cuerpos de Lewy son componentes fundamentales de la EP, se descubrió que estos agregados resultan positivos para inmunotinciones contra la proteína alfa-sinucleína en pacientes con EP idiopática (Fig. 3). En 1997, el grupo dirigido por Michael H. Polymeropoulos (Polymeropoulos et al. 1997) demostró también que mutaciones en el gen que codifica esta proteína predisponen a la EP. Este descubrimiento trajo a colación la influencia del factor genético en la adquisición y

desarrollo de la EP, poniendo en duda tesis epidemiológicas anteriores que postulaban como únicamente ambientales las causas de esta enfermedad.

## 1. Alfa-sinucleína

La alfa-sinucleína es una proteína de 140 aminoácidos, codificada por un solo gen formado por siete exones localizado en el cromosoma 4 (X. Chen, Silva, and Pettenati 1995). Esta proteína fue descrita por primera vez por Maroteaux y sus colaboradores (1998) como una proteína específica de neuronas, localizada en la región presináptica de terminales nerviosas y núcleos, por lo que se denominó sinucleína (Maroteaux, Campanelli, and Scheller 1988). Desde el descubrimiento de que la alfa-sinucleína forma parte fundamental de los cuerpos de Lewy y, posteriormente, de que mutaciones en el gen que la codifican predisponen al desarrollo de EP, varias observaciones han establecido firmemente la participación de la alfa-sinucleína en la patogénesis de la EP. Dentro de las evidencias más fuertes, se encuentran las siguientes:

- La EP autosomal dominante de inicio temprano es el resultado de tres mutaciones en el gen de la alfa-sinucleína, que corresponden a las sustituciones A30P, E46K, y A53T en la proteína (Polymeropoulos et al. 1997; Zarranz et al. 2004; Krüger et al. 1998), o como resultado de la sobreexpresión de la alfa-sinucleína silvestre debido a triplicación del gen que la codifica (Singleton et al. 2003).
- Anticuerpos anti-alfa-sinucleína detectan esta proteína en cuerpos y neuritas de Lewy, características distintivas de la EP (Mezey et al. 1998).
- La sobreexpresión de alfa-sinucleína silvestre en ratones y moscas transgénicas promueve déficits motores, así como inclusiones neuronales reminiscentes de EP (Feany and Bender 2000; Masliah et al. 2000).

- Nemátodos transgénicos *Caenorhabditis elegans* que sobreexpresan alfa-sinucleína silvestre o sus formas mutantes (A30P y A53T) generan una acumulación dañina de alfa-sinucleína en neuronas dopaminérgicas (Kuwahara et al. 2006).
- La sobreexpresión de alfa-sinucleína humana en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* recapitula características importantes de la EP, como toxicidad celular y formación de agregados proteicos (Franssens et al. 2009).
- Se ha demostrado que depósitos positivos para alfa-sinucleína se acumulan en varios modelos animales en donde el parkinsonismo fue inducido por diferentes sustancias neurotóxicas (Betarbet et al. 2000).

Estos resultados *in vivo* son apoyados por numerosos estudios *in vitro* en donde se estableció que la alfa-sinucleína recombinante fácilmente cambia su conformación hacia fibras amiloides y oligómeros bajo una amplia gama de condiciones. La agregación de la alfa-sinucleína es modulada también por las mutaciones encontradas en el gen que la codifica en personas con casos de EP familiar (Satake et al. 2009; Simón-Sánchez et al. 2009), así como por diferentes factores ambientales, modificaciones postraduccionales, e interacción con membranas celulares y diversas proteínas, como la sinfilina (Engelender et al. 1999). Diferencias estructurales entre las varias formas en las que se agrega la alfa-sinucleína bien pueden estar correlacionadas con su efecto *in vivo* y, por lo tanto, entender y describir semejantes diferencias podría ayudar a explicar el papel de una de las proteínas más ampliamente estudiadas en la ciencia hoy y de la que, sin embargo, sabemos tan poco.

## 2. Propiedades estructurales de la alfa-sinucleína

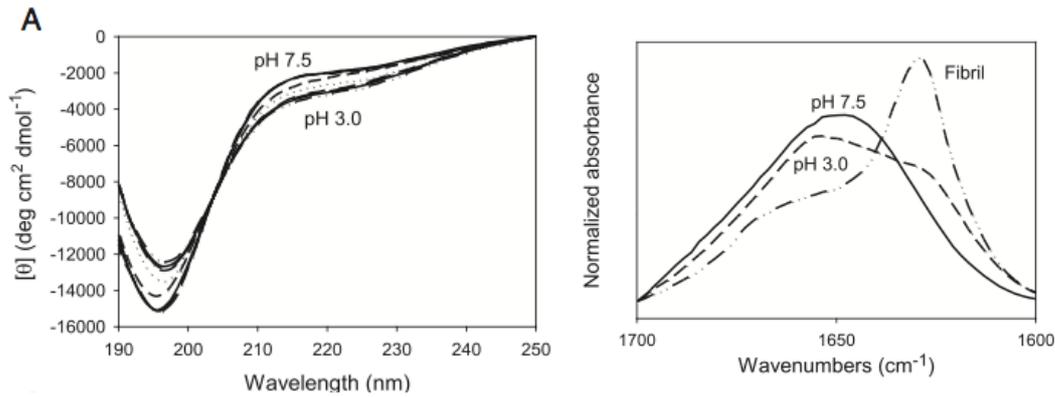
Como se mencionó anteriormente, la alfa-sinucleína es una proteína de 140 aminoácidos, carente de residuos de cisteína y triptofano que pertenece a la familia de las sinucleínas (alfa, beta y gama). La alfa-sinucleína se localiza mayoritariamente en las terminales presinápticas y se encuentra tanto de manera soluble como unida a membranas. Bajo condiciones normales, se ha estimado que la alfa-sinucleína representa cerca del 1% de toda la proteína encontrada en las fracciones citosólicas solubles del cerebro (Iwai et al. 1995). Se le han atribuido una multitud de funciones putativas, como la regulación en el tráfico y liberación de vesículas sinápticas y la regulación de la función de ciertas enzimas, de transportadores y de vesículas de neurotransmisores, así como un papel importante en la supervivencia neuronal (Dev et al. 2003). Modelos knock-out para las tres sinucleínas en ratón generan una disfunción neuronal que es tiempo-dependiente, indicando que las sinucleínas son contribuyentes importantes en la operación del sistema nervioso a largo plazo, dado que se afecta, en particular, la plasticidad sináptica (Greten-Harrison et al. 2010). Además de su interacción con la sinfilina, se ha demostrado que la alfa-sinucleína interactúa con al menos 30 proteínas, incluyendo segundos mensajeros, subrayando su importante papel en la señalización celular (Dev et al. 2003; Engelender et al. 1999; Payton et al. 2001). A nivel de la secuencia de aminoácidos, la estructura primaria de la alfa-sinucleína consta de tres dominios: del residuo 1 al 60, contiene 11 repeticiones imperfectas con motivo conservado (KTKEGV) con preferencia hacia la alfa-hélice; los residuos 61-95, contienen una región hidrofóbica y altamente amiloidogénica NAC (Non-Amyloid-Component) y tres KTKEGV repeticiones adicionales; y la región carboxilo-terminal, altamente enriquecida en aminoácidos ácidos y prolinas, de los residuos 96-140. Los dos primeros dominios comprenden la región de unión a membrana, mientras que el

dominio del carboxilo-terminal –que es mucho más móvil– puede estar encargado de regular ciertas interacciones proteína-proteína, así como proteína-compuestos pequeños y tiene carga mayoritariamente negativa en pH neutro (Fig 4).



**Figura 4.** Los tres dominios principales de la alfa-sinucleína. NAC representa el componente no amiloide- $\beta$  (Non Amyloid- $\beta$  Component), un dominio de 35 aa. altamente hidrofóbico que tiende a formar placas amiloides asociadas con la enfermedad de Alzheimer (Figura tomada y modificada de Moore et al., 2005)

En 1996, Weinreb y sus colaboradores (Weinreb et al. 1996) demostraron que la alfa-sinucleína existe en solución como una proteína sin estructura tridimensional nativa (o intrínsecamente desordenada). Ésto fue posteriormente corroborado por Fink y colaboradores (Fig 5) que mediante la utilización de dicroísmo circular (CD) y espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR), demostraron que la alfa-sinucleína es una proteína desplegada y sin estructura tridimensional definida (Uversky, Li, and Fink 2001a). Aunque esta configuración ha sido aceptada durante muchos años, Dennis Selkoe y sus colaboradores propusieron que el estado nativo de la alfa-sinucleína es un tetramero con estructura de alfa-hélice (Bartels et al., 2012). Dicha investigación, sin embargo, ha sido blanco de críticas promovidas, principalmente, por el laboratorio del Doctor Hilal Lashuel, quien argumenta que los resultados no son reproducibles y que la alfa-sinucleína es, efectivamente, un monómero sin estructura tridimensional nativa (Fauvet et al., 2012). Sin duda, más estudios al respecto vendrán en el futuro cercano.



**Figura 5.** Ensayos de dicroísmo circular (CD) y espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) que demuestra falta de estructura que presenta la alfa-sinucleína. Un mínimo de absorción a 195 nm (CD) es indicativo de estructura desordenada. Un máximo de absorción alrededor de 1650  $\text{cm}^{-1}$  (FTIR) también es característico de una estructura desordenada (Breydo, Wu, and Uversky 2011).

### 3. Rutas y determinantes moleculares en el plegamiento defectuoso y agregación de la alfa-sinucleína

#### 3.1. Estructura y polimorfismo de las fibras de alfa-sinucleína

Hasta la fecha se han propuesto dos clases de fibras amiloides: Aquellas derivadas de proteínas plegadas, y aquellas derivadas de proteínas intrínsecamente desordenadas. Las fibras amiloides se forman a partir de proteínas plegadas a través de un mecanismo de re-plegamiento o por una ganancia de interacción. En el modelo de re-plegamiento, proteínas como la insulina (usualmente plegada) se convierte en fibras tras pasar por un estado momentáneo de desplegamiento, seguido por un evento de re-plegamiento rico en estructura beta-plegada. Fibras formadas de este modo son estabilizadas por puentes de hidrógeno entre el esqueleto de los aminoácidos, en lugar de interacciones entre las cadenas laterales. De manera alternativa, proteínas nativas como la transtiretina (TTR), el prion Sup35 en levadura, la superóxido dismutasa (SOD), y la beta-microglobulina experimentan cambios conformacionales limitados a ciertas regiones de la proteína para

exponer una porción pequeña que previamente era inaccesible. Esta región puede entonces interactuar con la superficie de otras moléculas para formar fibras sin causar una perturbación mayor en la estructura nativa de la proteína. Las fibras son formadas a través de 1) apilamiento directo de regiones expuestas (TTR y SOD), 2) intercambio de dos dominios con conformación beta-plegada provenientes de dos monómeros independientes que, cuando unidos, forman una columna de beta-cruzada (Sup 35 y beta-microglobulina), o 3) intercambio de filamentos entre dos monómeros adyacentes (Serag et al. 2002; Nelson et al. 2005; Huntington et al. 1999). Todas estas proteínas son ricas en estructuras de beta-plegada incluso en su estado nativo y, como resultado, forman fibras con alteraciones mínimas con respecto a su estructura original.

La alfa-sinucleína pertenece a la clase de proteínas intrínsecamente desordenadas (IDP, por sus siglas en inglés) que forman fibras al convertir alguna o todas las regiones no estructuradas de su secuencia en estructuras secundarias muy estables, ricas en beta-plegada. Otros ejemplos de estas proteínas amiloides incluyen a tau y  $\alpha\beta$ . La estructura a nivel atómico de la columna de beta-cruzada en fibras de alfa-sinucleína fue determinada por cristalografía de rayos X y difracción de rayos X de fibras formadas a partir de alfa-sinucleína sintética, así como también a partir de fibras obtenidas de pacientes que padecieron la EP (Serpell et al. 2000). Éste y otros estudios revelaron que las fibras de alfa-sinucleína están compuestas por varios protofilamentos ricos en beta-cruzada en los que hojas beta se organizan de manera paralela, y las hojas beta están ordenadas con respecto a cadenas laterales de aminoácidos expuestas en la superficie de las hojas beta. Además, las cadenas laterales que sobresalen de las dos hojas beta de la columna de beta-cruzada se interdigitan de manera autocomplementaria, del mismo modo en el que lo hacen los dientes de un cierre común. Es por esto que las estructuras a las cuales da lugar un fenómeno como el previamente descrito se denominan "cierres

(o cremalleras) estéricos". Estos cierres estéricos corren de arriba a abajo a lo largo del eje de la fibra y evitan que el agua entre en contacto con la interfaz entre las hojas beta. Esta misma estructura de los cierres estéricos no está limitada a la sinucleína, y muchas otras fibras de proteínas amiloides, como la insulina, lisozima, y beta-microglobulina, lo presentan (Sawaya et al. 2007).

Estudios recientes que utilizan microscopía crio-electrónica de alta resolución, microscopía de fuerza atómica, y espectroscopia de resonancia magnética nuclear (NMR) han revelado que las fibras de alfa-sinucleína exhiben un polimorfismo estructural distintivo. Estas diferencias morfológicas son probablemente debidas a variaciones en el plegamiento de las hojas beta, diferencias en el empacamiento molecular entre interfaces de las hojas, o interacciones entre cadenas laterales y el ambiente. De hecho, cambios sutiles en las condiciones de la solución utilizada, como el pH, la temperatura, la concentración de sales, y variables externas, como la agitación, pueden influenciar drásticamente los procesos de plegamiento y agregación de la alfa-sinucleína. Microscopía crio-electrónica y NMR de estado sólido han revelado que la morfología de fibras tanto de origen recombinante como de aquellas presentes en cerebros de pacientes de EP puede ser clasificada como lineales o como cintas entrelazadas (Vilar et al. 2008; Heise et al. 2005). A nivel molecular, ambos tipos de fibras comparten un núcleo común formado por un sándwich de cinco capas de hojas beta. Sin embargo, estos dos tipos de fibras difieren significativamente en el arreglo de los protofilamentos que las forman. Evidencia reciente de experimentos de NMR proponen que las fibras lineales tienen protofilamentos que se alinean unidireccionalmente entre ellos para formar una fibra, mientras que en las fibras entrelazadas, dos protofilamentos (entre los residuos 20 y 30) se entrelazan entre ellos, generando un sub-protofilamento que puede entrelazarse una vez más con otro sub-

protofilamento para formar una fibra. Estos resultados muestran cómo las diferencias en la arquitectura de las fibras a nivel molecular se traducen en diferencias en su morfología.

La observación de que varias proteínas amiloides se ensamblan en agregados fibrilares ricos en hojas beta altamente ordenados independientemente de su secuencia de aminoácidos sugiere que las proteínas amiloides se agregan siguiendo una secuencia de pasos conservado por todas ellas, en donde monómeros solubles forman estructuras oligoméricas intermediarias y posteriormente se ensamblan en agregados fibrilares más ordenados. La formación de fibras de alfa-sinucleína ocurre de manera dependiente de la nucleación (formación de oligómeros), donde el paso limitante es la formación espontánea de intermediarios oligoméricos estables, también conocidos como núcleos fibrilares (Fig 6) (Bhak et al. 2009; L. Y. L. Lee and Chen 2007). Tales intermediarios son formados a partir del plegamiento parcial y agregación desorganizada de la alfa-sinucleína, y existe en constante equilibrio con su forma monomérica. Una vez que los núcleos fibrilares se han formado, las fibras crecen por un mecanismo en el que monómeros se unen a las regiones expuestas de la fibra de manera reversible. Este acoplamiento es seguido por una reorganización irreversible en la superficie de la fibra, que genera una superficie óptima para el consecuente crecimiento de la fibra (Collins et al. 2004). El principio de nucleación-dependiente también aplica a la oligomerización de alfa-sinucleína, tal que la formación de oligómeros es también un proceso altamente ordenado.

La agregación de alfa-sinucleína puede ocurrir a través de múltiples vías que pueden dar lugar a especies oligoméricas y fibrilares estructuralmente distintas. Como fue descrito anteriormente, los procesos de agregación amiloidogénica son altamente influenciados por variables ambientales y factores intrínsecos, tales como mutaciones, pH, presencia

de otras proteínas, la propensión de agregarse de la proteína en cuestión, etc. No obstante, se ha demostrado que una amplia gama de proteínas amiloidogénicas se ensamblan en conformaciones oligoméricas y fibrilares comunes. Este hecho sugiere que la formación amiloide está en gran parte mediada por interacciones entre los péptidos y la cadena principal de los aminoácidos, y no con las cadenas laterales (Chiti et al. 1999).

### ***3.2. Estructura de los oligómeros de alfa-sinucleína***

De manera similar a aquellos de otras proteínas amiloidogénicas, los oligómeros de alfa-sinucleína son altamente diversos en su estructura. Algunos de ellos son ricos en hojas beta mientras que otros son desordenados. Estudios recientes identificaron oligómeros en forma de corona con un diámetro aproximado de 18 nm (Giehm et al. 2011). Dichos oligómeros fueron capaces de perturbar membranas lipídicas y se agregaban fácilmente en fibras. También se han descrito oligómeros que pueden alterar la integridad de membranas lipídicas pero no forman fibras y algunos, en las primeras fases de agregación, presentan una estructura secundaria de alfa-hélice (Apetri et al. 2006). Anticuerpos específicos para diferentes tipos de oligómeros amiloides (prefibrilares, fibrilares y anulares) permitieron determinar que durante el proceso de agregación se desarrollan los tres tipos de oligómeros (Kayed et al. 2003). La presencia de iones, moléculas pequeñas, otras proteínas, y modificaciones químicas también afectan la estructura de los oligómeros de alfa-sinucleína. Se discutirán casos específicos más adelante.

### ***3.3. Agregación de alfa-sinucleína y su relación con la muerte celular***

Existen dos preguntas muy importantes en relación a la agregación de alfa-sinucleína en la EP: ¿cuál de las especies presentes durante el proceso de agregación podría ser responsable de la muerte neuronal? ¿Podemos atribuir la neurotoxicidad a un tipo único de agregados? La toxicidad puede ser promovida por poblaciones específicas de agregados de alfa-sinucleína de manera directa y/o a través de varias rutas en las que se encuentran implicadas otras proteínas dedicadas a diferentes procesos celulares (Engelender et al. 1999; Auluck, Caraveo, and Lindquist 2010).

Los mecanismos propuestos para describir la neurotoxicidad de alfa-sinucleína y sus agregados pueden ser agrupados dentro de tres grandes clases: perturbación mecánica de compartimientos y procesos celulares, ganancia tóxica de función, y pérdida tóxica de función. Uno de los ejemplos más ampliamente aceptados que apoyan la primera opción es cómo los agregados amiloides penetran y permean membranas celulares, formando oligómeros que a su vez, se ensamblan en estructuras parecidas a poros que permiten entrada y salida de iones en la célula, dañando el equilibrio osmótico y promoviendo muerte celular (Giehm et al. 2011; Auluck, Caraveo, y Lindquist 2010). Especies agregadas de alfa-sinucleína impiden el funcionamiento correcto de la degradación de proteínas por vía proteosomal, así como una alta generación de especies reactivas de oxígeno que propician también la muerte celular (Giehm et al. 2011). Es posible que una multiplicidad de especies agregadas de alfa-sinucleína participen de manera sinérgica en la adquisición y desarrollo de la EP. Es conveniente señalar que los factores mencionados anteriormente no son mutuamente excluyentes y que podrían, de hecho, funcionar de manera conjunta.

La capacidad de la mutación A30P para acelerar dramáticamente la oligomerización inicial de alfa-sinucleína, mientras reduce significativamente la formación de fibras

maduras (Li, Uversky, and Fink 2001), es sólo una pieza de evidencia que sugiere que las formaciones oligoméricas intermediarias, más que las fibras maduras, pueden ser las especies de la proteína asociadas con la EP y que los oligómeros, no las fibras, son las especies citotóxicas (Lashuel et al. 2002). Factores adicionales que apoyan la idea de la toxicidad oligomérica se enlistan a continuación:

- En modelos celulares, se observa toxicidad sin que haya agregación masiva de alfa-sinucleína, sugiriendo que son agregados solubles los que generan la toxicidad (Xu et al. 2002).
- Agregación detectable de alfa-sinucleína y deposición de esta proteína en fracciones insolubles ocurre después de muerte celular *in vitro* (Gosavi et al. 2002).
- Expresión transgénica de alfa-sinucleína silvestre y su mutante A53T promueven neurodegeneración por fuera de la sustancia nigra sin inclusiones fibrilares (van der Putten et al. 2000).
- Expresión de alfa-sinucleína en la sustancia nigra de ratas a través de lentivirus genera toxicidad dopaminérgica selectiva con inclusiones no fibrilares (Bianco et al. 2002).
- La mayor pérdida de neuronas dopaminérgicas se da en ratones transgénicos que expresan la mutante E35K y E57K (que promueven formación de oligómeros), mientras que la menor pérdida neuronal se da en animales transgénicos que expresan a la mutante A53T, que genera la mayor cantidad de fibras (Winner et al. 2011).

En conjunto, la información presentada permite concluir que, de manera similar a otras enfermedades neurodegenerativas, no hay una correlación directa entre acumulación de

fibras de alfa-sinucleína y neurotoxicidad, apoyando la teoría que postula a los oligómeros como la especie potencialmente tóxica.

## **4. Alfa-sinucleína y su interacción con moléculas pequeñas y otras proteínas**

### ***4.1. El papel de toxinas ambientales: Pesticidas***

Varias líneas de investigación apuntan hacia exposición ambiental como un contribuyente principal en la patogénesis de la EP. Observaciones tanto clínicas como epidemiológicas revelan pesticidas y herbicidas, especialmente paraquat y rotenona, como importantes factores de riesgo ambientales para la EP (Caroline M Tanner 2011). Dado que la rotenona inhibe la cadena de transporte de electrones en la mitocondria y el paraquat cataliza la formación de especies reactivas de oxígeno, ambos inducen estrés oxidativo. La administración de paraquat o rotenona a ratas genera sobreexpresión de alfa-sinucleína, probablemente para combatir el estrés causado por los pesticidas (Inden et al. 2011; Manning-Bog et al. 2002). Altos niveles de alfa-sinucleína generan acumulación de agregados de alfa-sinucleína dentro de las neuronas de la sustancia nigra. Además, se ha demostrado que estos pesticidas promueven agregación de alfa-sinucleína *in vitro* de manera dosis-dependiente (Inden et al. 2011). Se ha propuesto que estos efectos se deben a una estabilización específica de la conformación amiloidogénica parcialmente plegada de la alfa-sinucleína, aunque también pueden promover modificaciones oxidativas en la proteína.

## ***4.2. El rol de los metales en la agregación de alfa-sinucleína***

El papel que los metales pesados juegan en la etiología de la EP ha sido propuesto desde etapas tempranas en la investigación de la EP debido resultados generados por estudios epidemiológicos (Priyadarshi et al. 2001). Análisis *post-mortem* de cerebros de pacientes con EP, provenientes de regiones con alta concentración de industrias de papel, químicas, hierro, o cobre, muestran alta incidencia de EP (Rybicki et al. 1993). En Quebec y Detroit se mostró un incremento en el riesgo de desarrollar EP cuando hay una exposición prolongada a manganeso, hierro, plomo, cobre, y aluminio, así como diferentes combinaciones de los anteriores (Preux et al. 2000; Gorell et al. 1999). Estos estudios están apoyados por la detección de hierro, zinc, y aluminio en los cerebros de pacientes que sufrieron EP mayor a la encontrada en cerebros sanos, especialmente dentro de la *sustancia nigra* (Dexter et al. 1991).

Si bien es cierto que los metales pueden causar daño cerebral de manera directa, también es cierto que el efecto que tienen los metales puede estar relacionado con el incremento en la tasa de agregación que generan en la alfa-sinucleína. Algunos mecanismos posibles que postulan a los metales como estimuladores de agregación de alfa-sinucleína pueden ser estudiados. Una manera simple de hacerlo involucra estudiar interacciones directas entre alfa-sinucleína y metales que generan cambios estructurales en la alfa-sinucleína. Experimentos *in vitro* muestran que en presencia de  $\text{Cu}^{2+}$  y otros metales, la alfa-sinucleína se agrega más rápidamente (Uversky, Li, y Fink 2001b). Se ha propuesto que ciertos metales estabilizan conformaciones de alfa-sinucleína parcialmente plegadas a través de un mecanismo en el que disminuyen la repulsión electrostática entre las cargas negativas de esta proteína. Los cationes que más eficientemente promueven el plegamiento parcial de la alfa-sinucleína también convierten la más alta proporción de la proteína hacia fibras amiloides maduras,

probablemente gracias a que estos intermediarios plegados parcialmente son más propensos a agregarse.

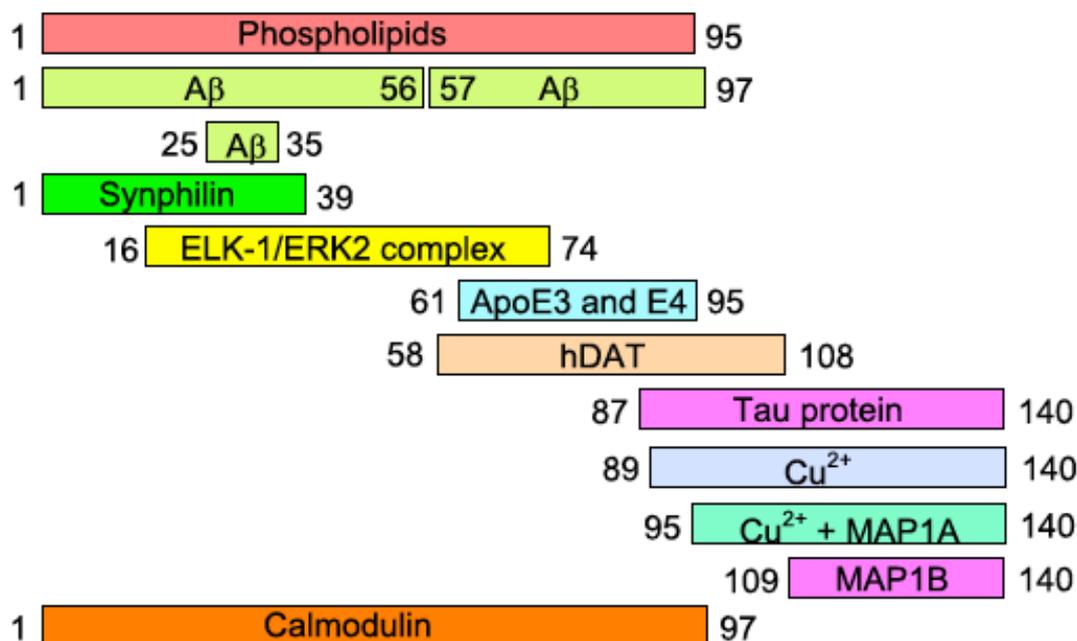
En general, existen al menos dos tipos de interacciones entre alfa-sinucleína y metales: de alta y de baja afinidad. Las uniones de baja afinidad (en el rango milimolar) son mediadas por interacciones electrostáticas entre los iones metálicos y cadenas laterales de los aminoácidos cargados negativamente, ubicadas principalmente en el dominio carboxilo-terminal de la proteína. Muchos metales pueden interactuar con la alfa-sinucleína de manera inespecífica, eliminando la repulsión de cargas entre los residuos de la proteína y estimulando el plegamiento parcial de la proteína. Esta conformación de la alfa-sinucleína es más propensa a agregarse (Uversky, Li, and Fink 2001b). Existe una correlación significativa entre la capacidad de ciertos iones metálicos a promover plegamientos parciales de la alfa-sinucleína y su habilidad para generar la formación de agregados amiloides y fibras. Dentro de los inductores de plegamiento parcial más efectivos y subsecuente agregación se encuentran el  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Fe}^{2+}$ , que interactúan directamente con la alfa-sinucleína de, y también  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Co}^{3+}$ , y  $\text{Mn}^{2+}$ , que muestran interacciones no específicas con la alfa-sinucleína (Uversky, Li, and Fink 2001b). Dado que existen diferentes maneras en las que metales interactúan con la alfa-sinucleína, no es sorprendente que la unión de metales induzca un amplio espectro de cambios conformacionales en esta proteína sin plegamiento nativo. Estos cambios van desde ganancias menores de estructura hasta conformaciones con características de proteínas globulares (Uversky, Li, and Fink 2001b). Ejemplos ilustrativos de semejante variabilidad incluyen formaciones oligoméricas esféricas que miden entre 0.8 y 4 nm generadas por  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ , y  $\text{Ni}^{2+}$ ; oligómeros anulares de entre 5 y 8 nm generados por  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$ , y oligómeros anulares de 70-90 nm estabilizados por  $\text{Ca}^{2+}$  (Lowe et al. 2004). Esta variabilidad generada por metales en la estructura de la alfa-sinucleína,

así como su relación con procesos de oligomerización, agregación y formación de fibras debe ser tomado en cuenta en el análisis de los mecanismos moleculares de neurodegeneración. Una caracterización estructural detallada de la alfa-sinucleína en presencia de metales proveerá información importante acerca de los mecanismos moleculares de las sinucleopatías. Una mejor integración entre datos obtenidos *in vitro* e *in vivo* permitirá llegar a conclusiones más sólidas que sin duda mejorarán el panorama en el estudio no solamente de la EP, sino de las enfermedades neurodegenerativas y su relación con la agregación de proteínas.

### ***4.3. Alfa-sinucleína y otras proteínas***

Se sabe que varias docenas de proteínas interactúan con la alfa-sinucleína (Lindersson and Jensen 2004), algunas se ejemplifican en la figura 6 donde se describe la localización de los sitios de interacción. Es importante notar que todas estas interacciones son moduladas en alguna medida por ciertas modificaciones postraduccionales, así como por las mutaciones puntuales de la alfa-sinucleína relacionadas con la EP familiar. Un análisis proteómico reciente identificó a 587 proteínas involucradas en la formación de complejos con alfa-sinucleína en células dopaminérgicas en cultivo, con 141 de ellas mostrando cambios significativos en su abundancia relativa (aumento o reducción) después de que las células fueron tratadas con rotenona (Jin et al. 2007). La lista de proteínas identificadas a través de ensayos de interacción individuales incluye, pero no está limitada, a PLD2, UCH-L1, parkina, prolil-isomerasa, Pin1, Rab5A, cristalina, diferentes isozimas de PKC, BAD, ERK, el complejo ELK-1/ERK-2, p38MAPK, A $\beta$ , MAP1B, tubulina heterodimérica, fosfolipasa

D, DAT, DJ-1, tirosina-hidroxilasa, histonas, calmodulina, tau, y, de especial interés en esta tesis, sinfilina (revisado en Breydo, Wu, and Uversky 2011).



**Figura 6.** Representación esquemática de los dominios putativos de interacción de la alfa-sinucleína (Tomado de Breydo et al., 2011).

## 5. Sinfilina

La sinfilina (o  $\alpha$ -sinuclein interacting protein, SNCAIP) fue descubierta como resultado de la búsqueda de proteínas que interactuaran físicamente con la  $\alpha$ -sinucleína utilizando como metodología el doble híbrido de levadura (Engelender et al. 1999). La sinfilina es una proteína de 919 aminoácidos con un peso molecular que puede oscilar entre 115 y 140 kD. Aunque su función específica es todavía desconocida, se han logrado identificar en su secuencia varios dominios, tales como el de repeticiones similares a anquirina, hélice-hélice, un dominio putativo de unión a ATP/GTP y regiones secuencias blanco para las cinasas de caseína I y II (Lee, 2004; Chung, 2001; Kruger, 2004) (Fig. 7).



**Figura 7.** Representación esquemática del marco de lectura abierto de la sinfilina. Las repeticiones similares a anquirina se muestran en verde, mientras que los dominios hélice-hélice (C-C) y de unión a ATP/GTP se muestran en rojo y magenta, respectivamente. En la parte superior se indican las regiones que interactúan con otras proteínas relacionadas con la patogénesis del Parkinson (Figura tomada de Krüger, 2004).

Los dominios de anquirina son una de las firmas más comunes que denotan interacciones proteína-proteína. En general los dominios de anquirina son módulos repetidos en tándem de aproximadamente 33 aminoácidos y pueden encontrarse en proteínas de muy diversas funciones que abarcan desde iniciadores transcripcionales y reguladores del ciclo celular hasta transportadores iónicos, proteínas del citoesqueleto y transductores de señales, pero de manera general se consideran como firmas que denotan interacciones proteína-proteína. Aunque la sinfilina cuenta con homólogos en todos los vertebrados, se considera que tienen funciones similares sólo aquellos que se encuentran en los mamíferos, con los que la sinfilina humana comparte hasta 86% de identidad en la secuencia de aminoácidos (como el caso del chimpancé *Pan troglodytes* y el ratón *Mus musculus*). Sin embargo, la homología con la sinfilina del ratón asciende hasta el 96.5% en la región central de la proteína en la que se encuentran los dominios similares a anquirina y la repetición hélice-hélice. Esto apoya la idea de que esta región altamente conservada entre diferentes organismos tiene una función fisiológica similar que depende en muy buena medida de la integridad de estas secuencias (Kruger, 2004). Esto ha permitido localizar dominios indispensables en la secuencia de la sinfilina que le permiten interactuar, además de la  $\alpha$ -sinucleína, con otras E3 ligasas involucradas en

la degradación de proteínas por la vía del proteosoma: parkina, dorfina, SIAH1 y SIAH3. Al igual que la  $\alpha$ -sinucleína, la sinfilina muestra un patrón de expresión significativamente neural, y se localiza predominantemente en la región presináptica de las neuronas. Aunque su función específica se conoce pobremente, las especulaciones más recientes apuntan hacia una función en las vesículas sinápticas, probablemente regulando en algún nivel la liberación de varios neurotransmisores y, en particular, el tráfico de dopamina en neuronas dopaminérgicas. En tejido neural de humanos, la sinfilina se expresa predominantemente en neuronas como las células de Purkinje, y neuronas de la sustancia nigra y piramidales de la corteza (Kruger, 2004; Engelender, 2000). En extractos neuronales se ha encontrado que el peso molecular de la sinfilina puede variar en extremos que van desde los 50 y 56 kD hasta los 120 kD, apoyando la idea de que el *splicing* alternativo o procesamiento postranscripcional son básicos en la expresión de la sinfilina y es gracias a estos procesos que existe una gran variedad de formas de sinfilina. Éstas podrían dedicarse a una amplia gama de funciones, todas ellas encaminadas probablemente a la regulación del tráfico de diferentes tipos de vesículas sinápticas y, en particular, a la regulación directa de la unión de la  $\alpha$ -sinucleína a la membrana de las vesículas sinápticas.

El estudio de Engelender y colaboradores no sólo determinó que, en efecto, estas dos proteínas interactúan *in vitro*, sino que la sinfilina lo hace de manera mucho más potente con la  $\alpha$ -sinucleína mutante A30P, lo cual tendría implicaciones directas en la patogénesis del Parkinson. Esto sugiere que las mutaciones en el gen que codifica para la  $\alpha$ -sinucleína promueven en mayor o menor medida la interacción con otras proteínas (como la sinfilina) y éstas a su vez alteran la tasa de formación de inclusiones similares a los cuerpos de Lewy, elementos centrales en la patogénesis de esta enfermedad. Otro estudio determinó que esta interacción depende en buena medida de la fosforilación que

sufre la sinfilina por la caseína cinasa II (CKII) (Lee, 2004), sin el cual la a-sinucleína y la sinfilina no logran interactuar de manera adecuada y por lo tanto la formación de agregados se afecta. Este fenómeno también fue propuesto como eslabón en la cadena de eventos que en última instancia generan Parkinson, dado que la capacidad de formar inclusiones es, para muchos, una señal que más bien ejemplifica una estrategia celular encaminada a la protección y no un resultado patológico de daño o señal inequívoca de la antesala de la muerte celular. La sinfilina llamó la atención de los investigadores cuando se encontró que la relación no sólo era un artefacto del estudio *in vitro*, sino que formaba en efecto una parte esencial en la generación de cuerpos de Lewy no únicamente en pacientes parkinsonianos, sino en general en muchas de las sinucleiopatías que implican la formación de agregados de a-sinucleína, como la demencia con cuerpos de Lewy. Todas estas nociones cobraron mayor importancia por el hallazgo de que la sinfilina es parte fundamental del núcleo denso de los cuerpos de Lewy, mientras que la a-sinucleína forma parte de la región periférica hialina de estos. Esto fortaleció la idea de que para que la a-sinucleína logre formar agregados similares a los cuerpos de Lewy tendría que interactuar con la sinfilina (Wakabayashi, 2002), y consolidó la noción de que la sinfilina es un componente que funciona como conector fundamental en la formación de agregados proteicos. Si bien ya se ha determinado que la sinfilina interactúa de manera importante con la alfa-sinucleína, y estudios independientes han concluido también que la sinfilina funciona como sustrato para la E3 ligasa *Parkina*, investigaciones en donde se analice la interacción particular de estas tres proteínas no han logrado establecer avances importantes que permitan entender los mecanismos moleculares que modulan la patogénesis del Parkinson.

Son varias las regiones de la sinfilina que se han encontrado interactuando de manera específica con la alfa-sinucleína, tanto la región central como la amino-terminal. Ya que

la interacción es tan clara, resulta razonable asumir que la sinfilina participe de manera activa en la patogénesis del Parkinson. De hecho, se ha encontrado que la expresión conjunta de estas dos proteínas en cultivos de líneas celulares *in vitro* promueve la formación de muchas más inclusiones similares a cuerpos de Lewy con respecto a las que se forman cuando la  $\alpha$ -sinucleína y la sinfilina se expresan de manera separada e independiente. Esto ha sido apoyado por estudios que señalan que, en ausencia de sinfilina, la parkina no logra interactuar con la  $\alpha$ -sinucleína no glicosilada (la especie más abundante en el cerebro humano). Sorprendentemente, la parkina interactúa con la sinfilina de manera muy específica, de modo que en este trinomio de proteínas, cada una parece ser tan importante como la otra (Chung, 2001; Kruger, 2004).

Una vez que se asoció a la sinfilina con la formación de cuerpos de Lewy en el cerebro de pacientes parkinsonianos, se diseñaron estrategias para encontrar polimorfismos y mutaciones en el gen que codifica para la sinfilina con el interés de encontrar mutaciones en la sinfilina que produjeran efectos similares a los que se encontraron en otros genes asociados al Parkinson familiar (Engelender, 2000). Solamente se encontraron unas pocas mutaciones en la sinfilina, entre las cuales hay una sustitución de cisteína por arginina en la posición 621 (R621C) de la secuencia de aminoácidos del quinto dominio de anquirina. Sin embargo, en cultivos celulares en los que se co-expresó a la sinfilina mutante con  $\alpha$ -sinucleína se formaron menos inclusiones en comparación a los generados con  $\alpha$ -sinucleína y sinfilina silvestre. A pesar de esto, se generó la hipótesis de que mutaciones en la sinfilina también podrían estar directamente relacionadas con la adquisición y desarrollo de la enfermedad (Marx, 2003). Posteriormente se determinó en estudios más detallados que mutaciones y/o variaciones en la secuencia de aminoácidos de la sinfilina no generan diferencias significativas en la adquisición y desarrollo ni de Parkinson ni de enfermedades relacionadas con agregados

anormales de  $\alpha$ -sinucleína y de otras proteínas que se relacionan con ella (Myhre, 2008); por lo tanto no se ha encontrado evidencia de que mutaciones en la sinfilina sean agentes causales directos del mal de Parkinson, a diferencia de mutaciones en la  $\alpha$ -sinucleína y/o en la parkina. Además de la interacción que guarda con la  $\alpha$ -sinucleína, la sinfilina también se asocia con otras proteínas involucradas directamente con la patogénesis del Parkinson. Una de las más estudiadas ha sido la que tiene con la caseína cinasa II (CKII). En experimentos en líneas celulares se ha observado que la CKII fosforila a la sinfilina, y que en ausencia de esta fosforilación la sinfilina es incapaz de interactuar con la  $\alpha$ -sinucleína, lo que disminuye de manera significativa la formación de inclusiones citoplasmáticas. Lo realmente interesante de esto es que las células que no logran formar estos agregados son en general más susceptibles a daño y mueren en una proporción mucho más alta con respecto a las que presentan la fosforilación de la sinfilina por medio de la CKII (Lee, 2004). Otra interacción que ha sido descrita es la que se lleva a cabo entre la sinfilina y la glicógeno sintasa cinasa-3b (GSK3b). La GSK3b también fosforila a la proteína tau, que está involucrada de manera íntima con la patogénesis del Alzheimer. Se ha especulado de manera muy general que el papel que tiene GSK3b con respecto a la sinfilina es, o bien el de marcarla como blanco de degradación (fallas en este sentido provocarían un desequilibrio capaz de afectar de manera significativa la manera en la que la sinucleína es a su vez señalada para degradación), o bien, modificarla de manera postraducciona para que sea funcional (Tanji, 2003) Cualquiera que sea el caso, es claro que todavía se necesitan más estudios en este sentido. Sin embargo, el hallazgo de que la sinfilina interactúa de manera importante con la parkina (una E3 ligasa de ubiquitina) estableció el primer eslabón en la cadena de investigaciones que toman como premisa el hecho de que cuando existen fallas en la señalización para la degradación de la sinfilina es cuando se genera un

desequilibrio en la conformación y concentración de la  $\alpha$ -sinucleína que puede llegar a ser nocivo para la célula (Chung, 2001). Todo esto ha sido apoyado por estudios que muestran que la sinfilina puede ser poliubiquitinada y de manera subsecuente degradada por la vía del proteosoma. Entre estos estudios destacan aquellos en los que se ha descrito cómo tres diferentes E3 ligasas ubiquitinan específicamente a la sinfilina y la señalan para su degradación. Esas ligasas son: Dornifina, SIAH1 y SIAH2 (Revisado en Kruger, 2004); todas ellas, junto con la parkina, han sido encontradas en los cuerpos de Lewy de pacientes que padecieron la enfermedad de Parkinson. La cinasa con repeticiones de anquirina ricas en leucina 2 (LRRK2 por sus siglas en inglés), proteína también implicada directamente en la patogénesis del Parkinson esporádico (Liu, 2008), podría también interactuar de manera importante tanto con la  $\alpha$ -sinucleína como con la sinfilina, aunque no se ha demostrado su interacción *in vitro*; se requiere profundizar en estos estudios para determinar esta interacción. Se ha demostrado, por ejemplo, que mutaciones en este gen impiden que su producto sea reconocido por la parkina, de manera que no se logra señalar para su degradación correcta, y en cultivos celulares donde se co-expresan la parkina y el LRRK2, se promueve la formación de agregados proteicos donde éste es el componente principal, mientras que si se expresa alguna de sus formas mutantes, las células mueren por apoptosis (Smith, 2005). Esto permite proponer una vez más que la sinfilina puede actuar como puente conector entre la parkina y sus diferentes blancos, funcionando probablemente como un substrato para ella. Comprender la relación entre la sinfilina y la  $\alpha$ -sinucleína será crítico para entender cómo se desarrolla no solamente la enfermedad de Parkinson, sino muchos otros síndromes en donde los agregados proteicos en el sistema nervioso son una característica fundamental, tales como la demencia con cuerpos de Lewy, en donde también la sinfilina es parte del núcleo denso de los agregados (Wakabayashi, 2000).

Estudios relativamente recientes especulan que la formación de agregados proteicos en donde esté involucrada la sinfilina son en general citoprotectores. Estos agregados proteicos son una manera en la que la célula responde a la acumulación de proteínas indeseables en el citoplasma. Esto se ha demostrado por el hecho de que una vez que se inhibe la formación de estos agregados, la acumulación de las proteínas que debían ser degradadas resulta altamente tóxica para la célula. La presencia de la sinfilina es fundamental para que estos agregados multiméricos se formen y las proteínas tóxicas no hagan daños irreparables a las células. Esto resulta válido también para sistemas en donde la sinfilina ha sido mutada o no se encuentra presente, pues la formación de agregados multiméricos se reduce. En conclusión, resulta central generar modelos que permitan estudiar si la sinfilina interactúa de manera activa con otras muchas proteínas relacionadas directamente con la adquisición y desarrollo de la enfermedad de Parkinson, y si es que esta interacción juega o no papeles relevantes en eventos que predispongan a padecer esta enfermedad.

Se ha demostrado que algunas de estas proteínas promueven la agregación de alfa-sinucleína *in vitro*. Muchas de estas proteínas también forman parte de los cuerpos de Lewy y, dado que, al igual que la alfa-sinucleína, también son susceptibles a agregarse en condiciones fisiológicas, es probable que especies amiloidogénicas (ya sean oligómeros o fibras) de estas proteínas sean capaces de catalizar la fibrilización de la alfa-sinucleína eliminando la fase de nucleación en el proceso de agregación.

## **6. Alfa-sinucleína, sinfilina, moléculas pequeñas y cómo se pueden atacar estas interacciones**

El modelo de estudio más ampliamente utilizado en nuestro laboratorio es la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*. Previamente, logramos comprobar que la mosca ofrece un gran modelo para estudiar a la EP, partiendo de la demostración de que cuando la sinfilina y la alfa-sinucleína son expresadas en moscas transgénicas de manera individual, ambas son tóxicas, evidenciado tanto por la generación de detrimentos en la arquitectura de la retina de la mosca, deterioro en las habilidades motrices, así como la pérdida gradual de neuronas dopaminérgicas y descenso en la supervivencia de los individuos. Sin embargo, cuando se co-expresan, la alfa-sinucleína y la sinfilina suprimen su toxicidad de manera recíproca (Hernández-Vargas et al. 2011). De manera importante, también se demostró que los síntomas inducidos en la mosca pueden ser tratados y parcialmente revertidos utilizando tratamientos farmacológicos estándares para la EP (L-DOPA), sugiriendo que los efectos adversos causados por la expresión de alfa-sinucleína y sinfilina tienen lugar en neuronas productoras de dopamina. Esto se logró haciendo uso de la expresión de alfa-sinucleína unida a proteína verde fluorescente (GFP) de manera específica en las neuronas dopaminérgicas de la mosca. Esto permitió hacer un seguimiento de la integridad de dichas neuronas a través de la vida de las moscas.

Esta conclusión, junto con las herramientas disponibles en este laboratorio, nos permite profundizar el estudio de la interacción entre la alfa-sinucleína y la sinfilina.

## Justificación

En nuestro laboratorio, se generó un modelo de estudio basado en la expresión transgénica de los genes humanos que codifican a la  $\alpha$ -sinucleína y a la proteína que interactúa principalmente con ella, la sinfilina, de manera específica en las neuronas dopaminérgicas de *Drosophila melanogaster* para estudiar sus funciones. Los fenotipos resultantes serán debidos a la presencia de estas dos proteínas, dado que ni la  $\alpha$ -sinucleína ni la sinfilina tienen homólogos funcionales en *Drosophila*. Entender el componente genético que sienta las bases que predisponen a los individuos a desarrollar esta enfermedad debe ser un esfuerzo conjunto en la investigación científica tanto básica como aplicada, dado que si entendemos cómo es que relaciones normales entre distintas proteínas son modificadas en el mal de Parkinson, podremos atacar de manera mucho más fina las bases que tanto se le han escapado a las técnicas epidemiológicas que, si bien han permitido relacionar componentes ambientales con la adquisición y desarrollo del Parkinson, también han minimizado el papel que juegan los factores genéticos. Si entendemos cómo funcionan los genes relacionados con la enfermedad de Parkinson, seremos capaces de anticipar un diagnóstico en pacientes predispuestos pero asintomáticos, y así mejorar enormemente la calidad de vida de las personas que alcanzan edades avanzadas. Resulta interesante recalcar que, aunque se sabe de la presencia de la sinfilina en los cuerpos de Lewy y cómo ésta tiende a interactuar fuertemente con la  $\alpha$ -sinucleína, los estudios acerca de dicha interacción son muy escasos y los resultados que se obtengan seguramente serán valiosos en varios niveles. Así como las actividades cognitivas complejas se basan en la jerarquización de circuitos neuronales, las bases moleculares de las enfermedades también se pueden reducirse en muchos casos a interacciones proteína-proteína que van adquiriendo complejidad a medida que se agregan elementos a la ecuación. Si somos capaces de entender cómo es

que funciona uno de los módulos funcionales (en este caso, la interacción de la  $\alpha$ -sinucleína y sus mutantes con la sinfilina), estaremos, sin duda, un paso más cerca de entender los mecanismos del Parkinson. Es posible generar herramientas moleculares que permitan el estudio de interacciones proteína-proteína por medio de FRET.

### **Hipótesis**

Si la alfa-sinucleína y la sinfilina interactúan en las neuronas dopaminérgicas en cultivo celular y el modelo de *Drosophila* utilizado en el laboratorio, entonces seremos capaces de detectar esta interacción por medio de técnicas de FRET. Si además esta interacción está modulada por componentes celulares (como la parkina o la UCHL-1), la eficiencia del FRET será modificada al reducir la expresión de estos componentes por medio de RNA de interferencia.

### **Objetivo general**

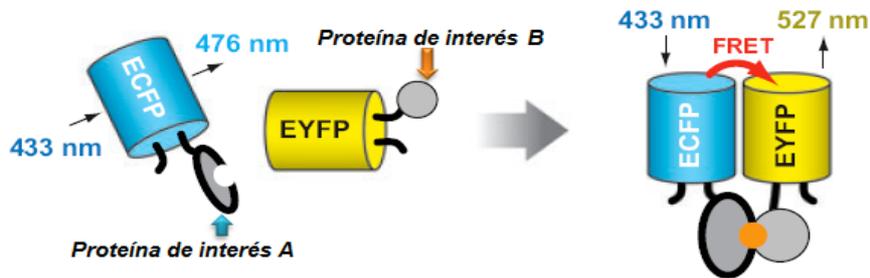
Generar las herramientas necesarias para estudiar la interacción de la alfa-sinucleína con la sinfilina a través de su la eficiencia de FRET tanto en un ambiente células en cultivo como en el sistema nervioso de *Drosophila*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

*RT-PCR.* Se extrajo RNA total de 50 moscas, del genotipo indicado, con TRIzol (Invitrogen) siguiendo el protocolo propuesto por el fabricante. Una vez obtenido el RNA total, se verificó su integridad en un gel de agarosa al 0.8% en MOPS 1X, y se cuantificó su concentración. Posteriormente se trató con DNasa en una reacción total de 50  $\mu$ l, de los que se tomó 1  $\mu$ g para generar cDNA en una reacción de 20  $\mu$ l totales con 1  $\mu$ l de transcriptasa-reversa de virus de leucemia murina (M-MuLV Reverse transcriptase Roche) y 200 pm de oligo poli dT (que se aparea con todas las secuencias de polyA de los RNAs mensajeros que las lleven). Del resultado de la reacción anterior se tomaron 100 ng del cDNA que fueron utilizados como templado en una reacción de PCR típica (50 nM oligos, 1.5 unidades Taq Polimerasa, 200  $\mu$ M dNTPs y Standard Taq Reaction Buffer, todo adquirido de New England Biolabs). Los oligos diseñados previamente en el laboratorio generan productos de PCR de 300 pb para la alfa-sinucleína y 368 pb para la sinfilina. Los productos obtenidos fueron analizados en un gel de agarosa al 0.8% en TAE 1X.

*FRET.* La fluorescencia por transferencia de energía de resonancia (FRET por sus siglas en inglés) es un fenómeno electrodinámico que puede ser explicado utilizando física clásica. El FRET ocurre entre una molécula donadora (D) y una aceptora (A). Cuando las moléculas donadoras emiten en longitudes de onda más cortas que además sobrelapan con el espectro de absorción del aceptor, entonces puede ocurrir transferencia de energía sin la aparición de un fotón. Esta fluorescencia es el resultado de interacciones dipolo-dipolo entre el donador y el aceptor. La tasa de transferencia de energía depende de la magnitud del traslape del espectro de emisión del donador con el espectro de absorción del aceptor, así como de la orientación relativa de los dipolos de

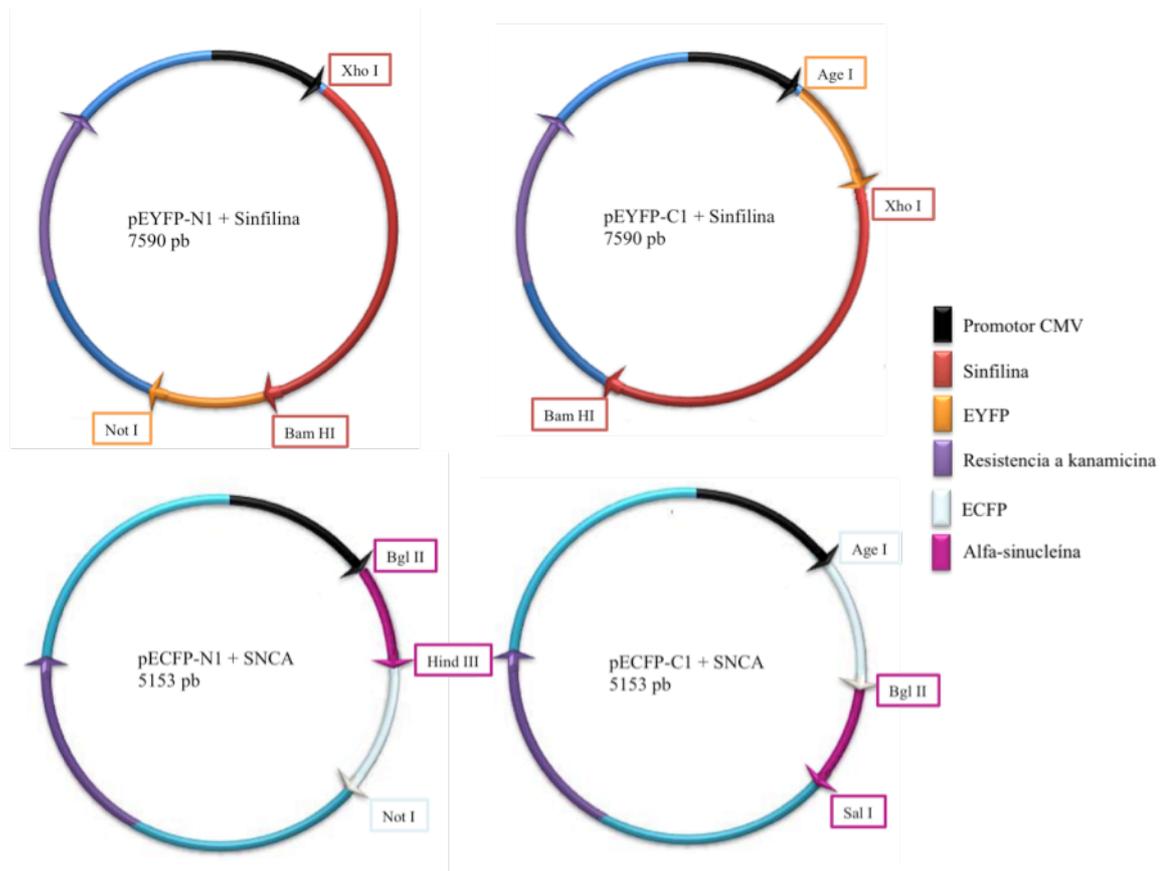
transición del aceptor y donador, y la distancia entre las moléculas del aceptor y el donador (Fig 8).



**Figura 8.** La proteína de interés *A* es fusionada con la proteína fluorescente donadora (ECFP), mientras que la proteína de interés *B* es fusionada el fluoróforo aceptor (EYFP). Si las proteína de interés se encuentran cerca (<10 nm) y en una orientación adecuada, entonces la excitación de la CFP emitirá energía en el espectro de excitación de la YFP, generando el fenómeno de FRET (Imagen tomada y modificada de Wang et al., 2008)

Actualmente, la proteína cian fluorescente optimizada (ECFP) y la proteína amarilla fluorescente optimizada (EYFP) son uno de los pares de fluoróforos más utilizado en ensayos de FRET (Miyawaki et al., 1997), aunque existen otras parejas de proteínas fluorescentes que pueden ser empleadas.

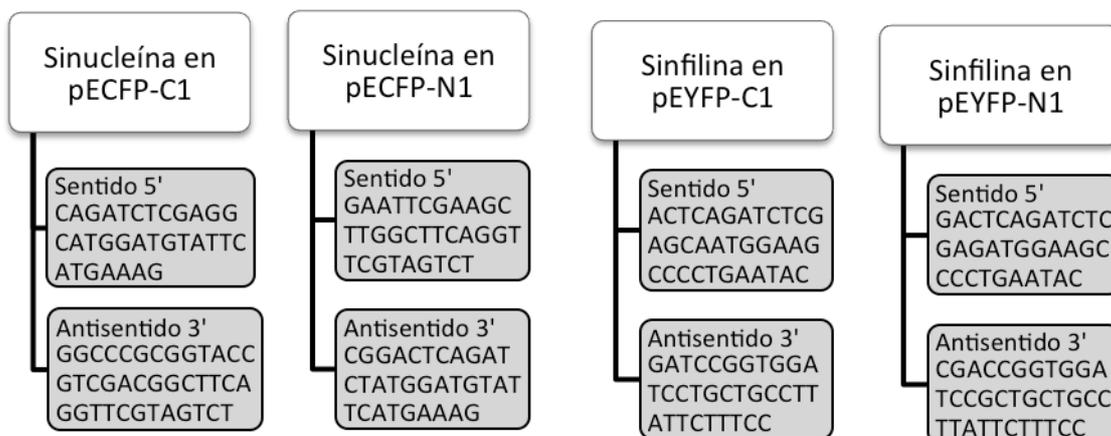
*Generación de construcciones que lleven a la sinucleína con la ECFP y a la sinfilina con la EYFP.* Para determinar cuál es la configuración más adecuada para promover la eficiencia de FRET se construyeron fusiones de la sinfilina y alfa-sinucleína con las proteínas fluorescentes tanto en la región carboxilo-terminal como en la amino-terminal, utilizando los plásmidos pECFP-C1, pECFP-N1, pEYFP-C1 y pEYFP-N1 (Clontech) como fuente de las proteínas fluorescentes (Fig. 9).



**Figura 9.** Se muestran los mapas de los vectores que fusionan a las proteínas fluorescentes tanto en la posición amino como carboxilo-terminal de la alfa-sinucleína (clonada con la ECFP) y la sinfilina (clonada con la EYFP). Así mismo, se muestran los sitios de restricción que fueron utilizados para realizar cada clonación con los colores correspondientes. En los cuadros amarillo y cian se representan las enzimas utilizadas para obtener el casete completo de sinfilina-EYFP y alfa-sinucleína-ECFP, respectivamente, para la poder subclonarlos en el vector pUAST.

Para poder clonar tanto a la alfa-sinucleína como a la sinfilina en los vectores mencionados se extrajo DNA total de moscas transgénicas por el protocolo de proteinasa K. Brevemente, una mosca del genotipo indicado se homogeniza en 49 ul de Squishing Buffer (SB), y se añade 1 ul de proteinasa K (1.8 ug/ul), se incuba durante 40 minutos a 37°C y posteriormente se inactiva la enzima a 95°C por 5 minutos. 5 ul de esta reacción son utilizados como templado para la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para amplificar las secuencias codificantes de la alfa-sinucleína y la sinfilina y permitir su posterior clonación en los vectores antes

mencionados, se diseñaron los siguientes oligonucleótidos verificando que los insertos quedaran en la misma fase de transcripción con las proteínas fluorescentes;



y las siguientes condiciones fueron utilizadas en el termociclador:

para la alfa-sinucleína				para la sinfilina			
Desnaturalización inicial	98°C	30 segundos	1 ciclo	Desnaturalización inicial	98°C	30 segundos	1 ciclo
Desnaturalización	98°C	15 segundos		Desnaturalización	98°C	15 segundos	
Alineación	61°C	30 segundos	35 ciclos	Alineación	61°C	30 segundos	35 ciclos
Extensión	72°C	45 segundos		Extensión	72°C	95 segundos	
Extensión final	72°C	10 minutos	1 ciclo	Extensión final	72°C	10 minutos	1 ciclo
	4°C	∞			4°C	∞	

Las condiciones estándar para las reacciones de PCR fueron:

ddH <sub>2</sub> O	a 50 ul
DNA	5 ul
PCR buffer	5 ul
Oligo sen	200 pM
Oligo antisen	200 pM
dNTP's	200 uM
Enzima	0.5 ul

Para realizar la fusión ECFP-alfa-sinucleína, tanto el producto de PCR de la alfa-sinucleína como el plásmido pECFP-C1 fueron digeridos en una reacción de 30  $\mu$ l totales con las enzimas Bgl II y Hind III (New England Biolabs) durante 1 hora a 37°C. Las bandas correspondientes al peso indicado se purificaron en gel de agarosa de bajo punto de fusión en TAE 1X siguiendo el protocolo de extracción por fenol-cloroformo. Se siguió el mismo protocolo para las construcciones restantes. Una vez purificado, tanto el producto de PCR como los plásmidos se ligaron en una reacción de 20  $\mu$ l totales con T4 DNA ligasa (New England Biolabs) en una relación vector inserto 1:6 por 16 horas a 4°C. Transcurrido el tiempo de incubación, el DNA de la ligación se precipitó por columna de afinidad (Qiagen), y se utilizó 1  $\mu$ l para transformar 40  $\mu$ l de bacterias electrocompetentes DH5- $\alpha$ . Brevemente, tanto el DNA como las bacterias electrocompetentes se mantuvieron en frío por cinco minutos, tiempo tras el cual se vertieron en un tubo eppendorf de 1.5 ml en el que se encontraba 1  $\mu$ l del DNA. Se pipeteó suavemente para homogenizar la mezcla. Una vez mezclados, se transfirieron los 40  $\mu$ l a una cubeta de electroporación y se siguieron las indicaciones del fabricante (Biorad). Inmediatamente después haber sido electroporadas, las bacterias se recuperaron en 1 ml de medio de rescate SOC durante 1 hora a 37°C con agitación constante. Transcurrida la etapa de recuperación, se plaquearon en cajas de petri con medio LB en presencia de kanamicina a 30 mg/ml y se dejaron crecer durante 12 horas, tiempo tras el cual se escogieron al azar al menos 5 colonias de cada construcción para inocular un cultivo de 3 ml durante 12 horas en medio LB líquido con 30 mg/ml de kanamicina a 37°C y con agitación constante. Se extrajo el DNA plasmídico de estas bacterias por minipreparación (Qiagen) y se realizó un análisis de restricción para determinar las colonias transformantes. El DNA plasmídico de las clonas positivas se secuenció en la unidad de secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

*Generación de líneas transgénicas de moscas que expresen a la alfa-sinucleína y sinfilina fusionadas a la CFP y YFP respectivamente.* Para poder generar moscas transgénicas, éstas necesitan ser transformadas con el plásmido pUAST (Perrimon y Norbert, 1993). Para realizar la subclonación en este vector, se liberaron los casetes completos de la alfa-sinucleína y sinfilina fusionados con las proteínas fluorescentes. En el caso de las construcciones que llevan a la ECFP y EYFP en la región amino-terminal, las fusiones fueron liberadas con las enzimas de restricción Age I y Xba I (New England Biolabs), mientras que en las que las proteínas fluorescentes se encuentran en la región carboxilo-terminal los casets completos fueron liberados con las enzimas de restricción Bgl II y Not I (New England Biolabs). Los 4 casets fueron tratados con el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I (New England Biolabs) para generar extremos rasurados en una reacción de 20 ul, siguiendo las indicaciones del fabricante. El vector pUAST fue linearizado con EcoRV, que también genera extremos rasurados, y se ligó con el casete completo utilizando el mismo protocolo antes descrito. Del mismo modo, también se transformaron bacterias electrocompetentes DH5- $\alpha$  y se realizó el análisis de restricción que permite determinar clonas transformantes, mismas que fueron secuenciadas en la unidad de secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

*Expresión en células HEK.* Las construcciones hechas en los vectores ECFP-N1, ECFP-C1, EYFP-N1 y EYFP-C1 (Clontech) fueron transfectadas en células endoteliales de riñón humano (HEK-293T) para comprobar su expresión y la dinámica de interacción, como se describe más abajo.

### **Cultivo celular.**

Para descongelar las células se incubó el criovial entre uno y dos minutos en un baño de agua a 37°C y posteriormente se agregó 1 ml de medio suplementado DMEM fresco. El volumen total fue transferido a un tubo de 15 ml y se aforó a 5 ml con medio DMEM suplementado a 37°C. Se agitó suavemente por pipeteo y se centrifugó a 220 x g por 4 minutos. Se descartó el sobrenadante y el pellet de células fue resuspendido en 10 ml de medio DMEM suplementado, mismos que fueron sembrados en un plato de cultivo de 6 cm. Se cambió a medio fresco al día siguiente.

Para realizar el cultivo de las células HEK293T se aspiró el medio y se lavó con 3 ml de PBS. Se aspiró el PBS, se añadió 1 ml de tripsina 0.25% y se incubó a 37°C durante 3 minutos. Posteriormente se agregaron 4 ml de medio de crecimiento para inactivar la tripsina. Las células fueron transferidas a un tubo estéril de 15 ml y se centrifugaron a 220 x g por 4 minutos. Se retiró el sobrenadante y el pellet fue resuspendido en 10 ml de medio. Se cuantificó la densidad y viabilidad celular en una cámara de Neubauer a razón de 1 ul por campo, y se sembraron a una densidad de  $3.5 \times 10^5$  células en 2 ml de medio en una caja de 6 pozos (Costar #3506) 24 horas antes de realizar la transfección (Jinghua et. al, 2007).

### **Transfección por CaCl<sub>2</sub>**

Una vez que transcurrieron las 24 horas de que se puso el cultivo, se redujo el volumen a la mitad. En un tubo eppendorf de 1.5 ml se mezcló para cada muestra lo siguiente:

#### **Plato de 35 mm - 1 plásmido:**

<b>Agua grado cultivo</b>	<b>ADN (1 µg/µl)</b>
<b>38.75 µl</b>	<b>5 µg</b>

1. Mezclar perfectamente, resuspendiendo con la pipeta.
2. Añadir:

<b>CaCl<sub>2</sub> 2M</b>
----------------------------

**6.25  $\mu$ l**

3. Resuspender muy suavemente, un par de veces.
4. Incubar por 10 minutos a temperatura ambiente.
5. Agregar, resuspendiendo muy suavemente una sola vez:

**HBS 2X**

**50  $\mu$ l**

**Volumen total:**

**100  $\mu$ l**

6. Incubar inmediatamente por 2 minutos a 37 °C, en un baño de agua.
7. Agregar la mezcla al cultivo, por goteo, y agitar delicadamente el cultivo para dispersar la mezcla.
8. Incubar a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>, en humedad.
9. Cambiar la solución de transfección por medio fresco dentro de las 12 a 15 horas posteriores a la transfección.

Transcurrido un día de la transfección, se tomaron imágenes de las células por microscopía de fluorescencia (Zeiss LSM510 Meta)

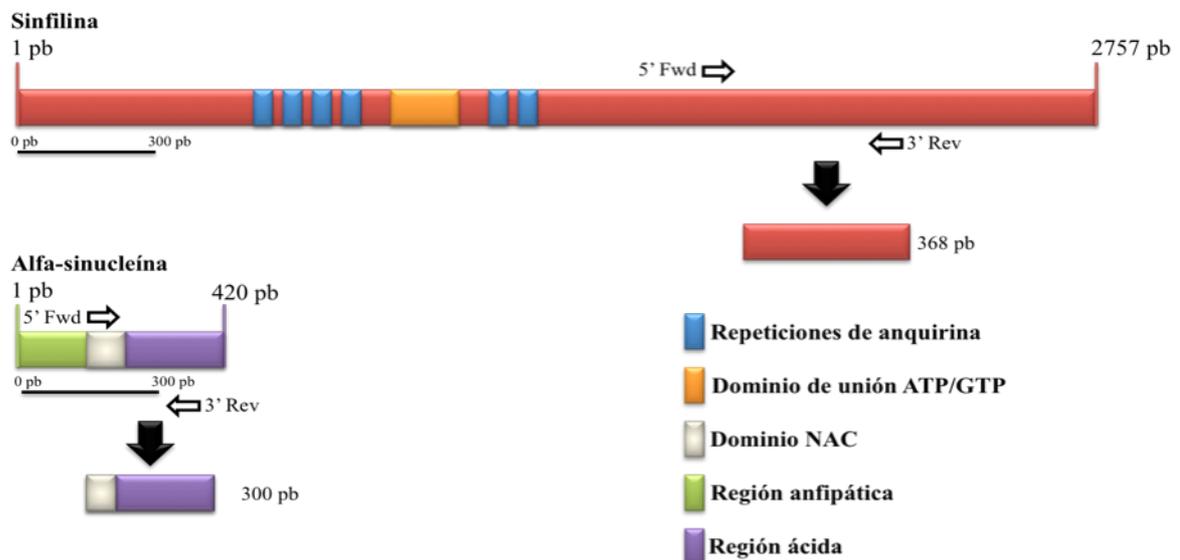
### **Detección de construcciones por western blot**

Para determinar que las proteínas de fusión se traducen de manera adecuada en las células HEK, se realizaron ensayos de western blot. Las células fueron resuspendidas en medio fresco, centrifugadas a 200 x g durante cinco minutos y lavadas con dos pasos subsecuentes de 2 ml de PBS frío. Una vez que se retiró el medio, las células se lisaron en EPEC buffer y las proteínas fueron separadas en un gel SDS-PAGE al 15% y posteriormente transferidas a una membrana de nitrocelulosa. El gel y los papeles filtro fueron sumergidos en la solución de transferencia para cámara semi-seca durante 5 minutos. El *sándwich* quedó de forma tal que el gel y la membrana se intercalaron entre 6 papeles filtro y la transferencia se realizó durante 1 hora a 60 V. Para la

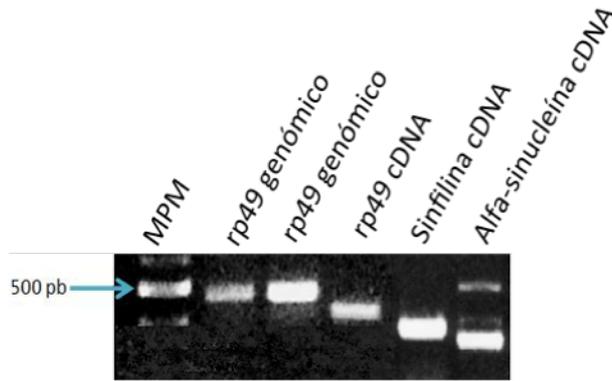
inmunodetección de las construcciones se utilizó un anticuerpo anti-GFP que es capaz de reconocer indistintamente fragmentos tanto de la ECFP como de la EYFP, por lo que permitiría detectar tanto las construcciones de sinfilina con EYFP como las de alfa-sinucleína con ECFP.

## RESULTADOS

Los RNAs mensajeros de la alfa-sinucleína y de la sinfilina se encuentran presentes en las moscas transgénicas utilizadas en el laboratorio. Para determinar que los fenotipos generados por la expresión individual de alfa-sinucleína y la coexpresión de la alfa-sinucleína y la sinfilina son resultado de la introducción de estas proteínas en las moscas, se estableció la presencia de sus mensajeros por medio de un ensayo de RT-PCR. Oligos previamente diseñados en el laboratorio (Tabla 3) amplifican un fragmento del cDNA de la sinfilina de 368 pares de bases, mientras que los diseñados para la alfa-sinucleína amplifican un fragmento de 300 pb (Fig. 11). Para verificar que la reacción de RT-PCR no estuviera contaminada con DNA genómico se realizó un control amplificando rp49, un gen ribosomal que pierde un exón al momento de transcribirse. De este modo, el fragmento amplificado de rp49 genómico tiene una mayor longitud que el de rp49 amplificado a partir de cDNA (Fig. 12).

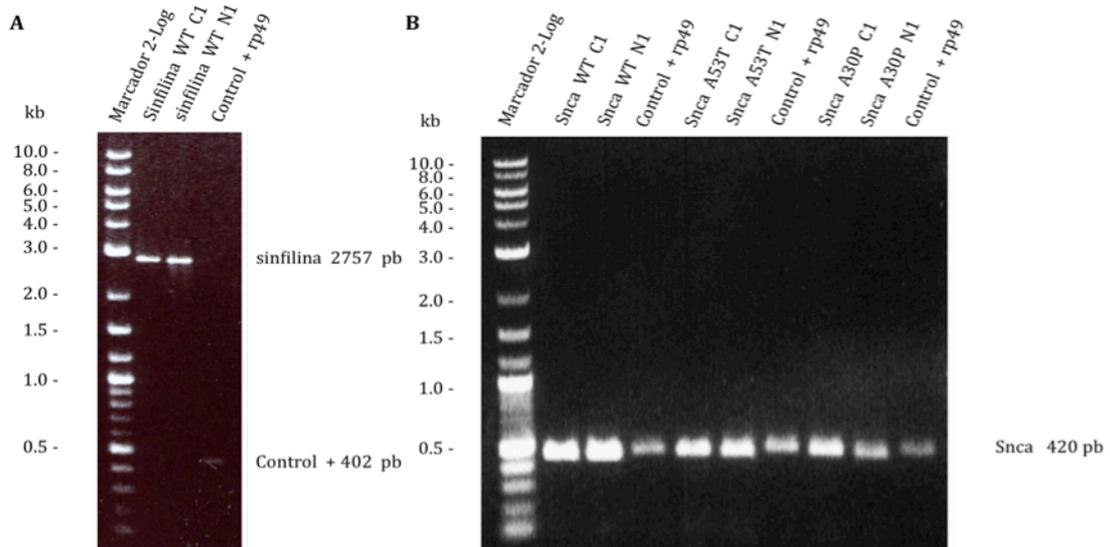


**Figura 11.** Representación del marco abierto de lectura de la sinfilina y alfa-sinucleína y los dominios que los conforman. También se muestran los oligonucleótidos utilizados para amplificar los fragmentos de los genes, la región que reconocen y el tamaño del producto esperado.



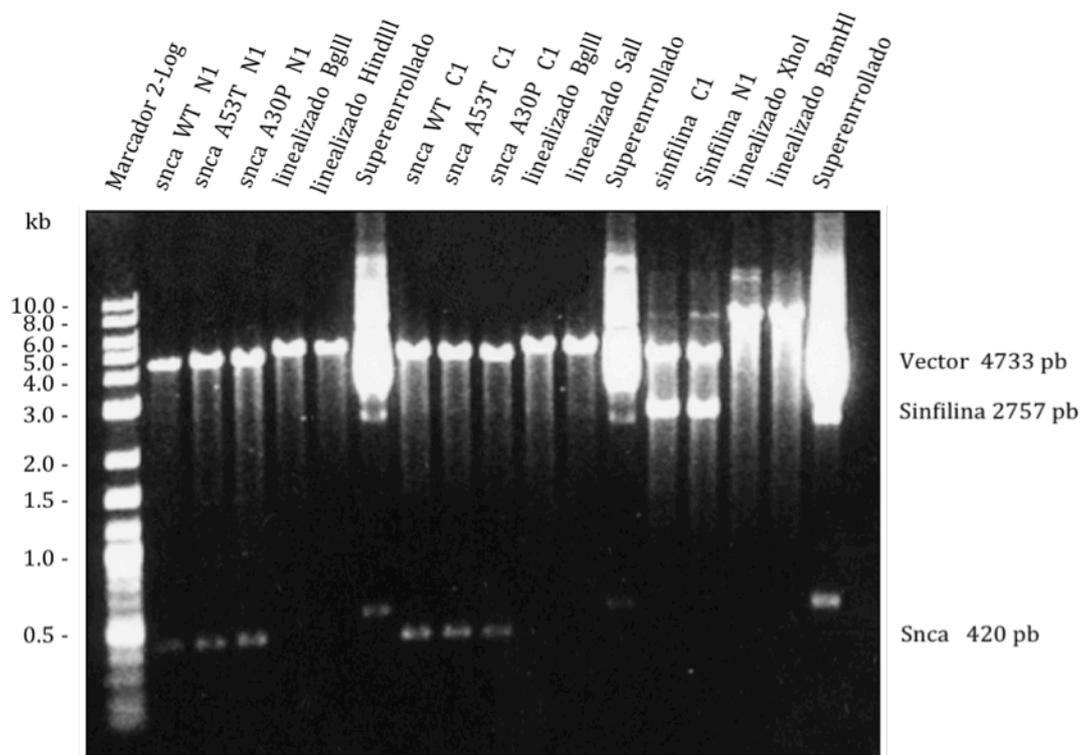
**Figura 12.** Gel de agarosa donde se muestran los productos de amplificación por PCR de rp49 de dos diferentes muestras de DNA genómico (carriles 2 y 3), así como del cDNA obtenido de las moscas transgénicas que llevan tanto a la alfa-sinucleína como a la sinfilina (carril 3). En los carriles 4 y 5 se muestran los productos de amplificación del cDNA de la sinfilina y alfa-sinucleína, respectivamente. MPM: Marcador de Peso Molecular.

**Obtención de las fusiones ECFP-SNCA y EYFP-sinfilina.** Para realizar la clonación direccional de los genes de la alfa-sinucleína y sus mutantes A30P y A53T y la sinfilina dentro de los vectores que llevan a las proteínas fluorescentes, se les añadieron sitios de restricción específicos que los flanquearan y se amplificaron por PCR (Fig. 13).



**Figura 13.** Amplificación del marco abierto de lectura completo de la sinfilina y alfa-sinucleína y sus mutantes con diferentes pares de oligonucleótidos que añaden los sitios de restricción necesarios para la clonación en los vectores que llevan a las proteínas fluorescentes.

Una vez que los productos de PCR fueron purificados y digeridos con las enzimas de restricción adecuadas, se ligaron con los vectores linearizados con el mismo par de enzimas. El resultado de la ligación fue utilizado para transformar bacterias electrocompetentes, de las que fueron utilizadas al menos cinco de cada construcción para realizar un análisis de restricción que permitiera encontrar a las colonias transformantes (Fig. 14). El DNA plasmídico de las colonias positivas fue secuenciado para comprobar la integridad del inserto que codifican tanto para las proteínas fluorescentes como para la sinfilina y la alfa-sinucleína, y fueron reservadas para su posterior utilización en la transformación de células eucariontes en donde se pueda establecer si hay o no fenómeno de FRET cuando son coexpresadas.

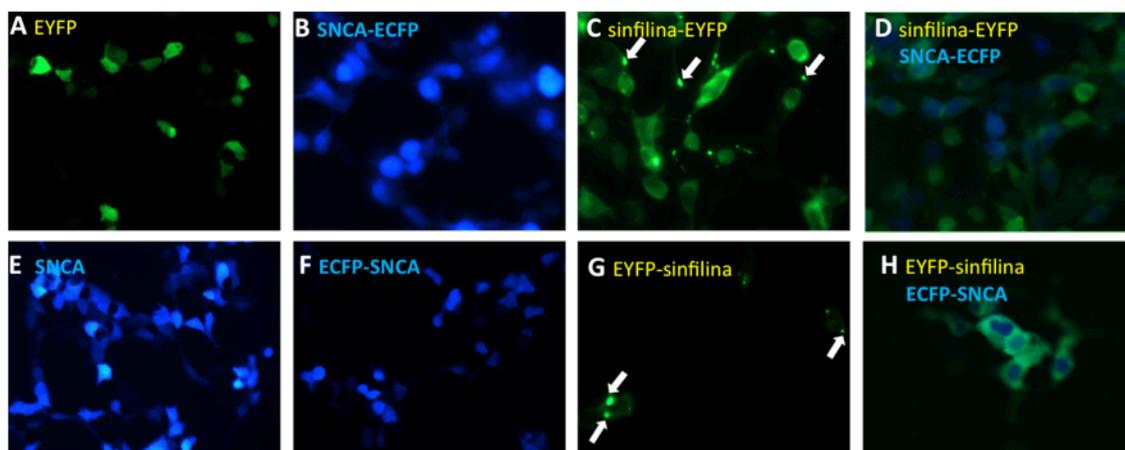


**Figura 14.** Análisis de restricción de colonias transformantes para los insertos de SNCA, sus mutantes y sinfilina. El fragmento liberado en los primeros tres carriles corresponde al peso molecular de la alfa-sinucleína (420 pb) utilizando tanto Sal como Bgl II. Cuando se digieren estos vectores solamente con Sal o Bgl II, obtenemos una banda del peso esperado del vector pECFP más SNCA (~5153 pb), respectivamente. En el carril 6, 12 y 17 se muestra el vector sin digerir para descartar que los elementos liberados sean especies superenrolladas del mismo vector. Los carriles 7 al 11 muestran los mismos insertos de los carriles 1 al 5, pero clonados en la posición carboxilo de la ECFP. El carril 13 es el análisis de restricción de la construcción EYFP-Sinfilina,

liberada con las enzimas Xho I y Bam HI, mientras que en el carril 14 se utilizan las mismas enzimas para liberar la sinfilina de la construcción Sinfilina-EYFP. En los carriles 15 y 16 se utiliza solamente una de las enzimas para linearizar el vector con la construcción, demostrando que tiene el peso esperado del plásmido pEYFP más Sinfilina (~7590 pb).

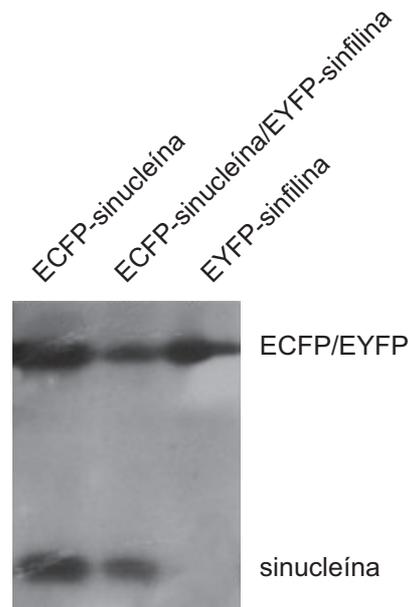
**La sinfilina se acumula cuando se expresa de manera independiente de la alfa-sinucleína.**

Cuando se transfectaron solamente los vectores que llevan a las proteínas EYFP y ECFP, la fluorescencia aparece distribuida de manera uniforme en las células (Fig. 15, A y E). Del mismo modo, la alfa-sinucleína fusionada con la ECFP tanto en la posición amino como carboxilo se expresa predominantemente en la región citoplásmica (Fig. 15, B y F). Por el contrario, cuando las células son transfectadas con las fusiones de EYFP-sinfilina y sinfilina-EYFP, se forman inclusiones perinucleares en el citoplasma (Fig. 15, C y G flechas). Resulta interesante destacar que cuando tanto la sinfilina como la alfa-sinucleína son cotransfectadas, no se generan inclusiones (Fig. 15, D y H). Otro aspecto observado es que la fluorescencia tiene una distribución diferencial cuando se expresan las proteínas que llevan a la EYFP y la ECFP en la región amino terminal, con respecto a las que las llevan en la región del carboxilo terminal. Nótese cómo en las de la región amino no hay una colocación clara (Fig. 15, D), mientras que aquellas que llevan las proteínas fluorescentes en el carboxilo, ambas proteínas se encuentran en la misma región (Fig 15, H).



**Figura 15 (Página 47).** La sinfilina expresada de manera individual genera inclusiones perinucleares. (A y E) Células HEK293T fueron transfectadas únicamente con el vector que lleva a la EYFP y la ECFP como control y la expresión fue uniforme en el citoplasma. (B y F) Expresión de la fusión alfa-sinucleína-ECFP y ECFP-alfa-sinucleína en donde la distribución también es uniforme. (C y G) Expresión de la fusión sinfilina-EYFP y EYFP-sinfilina. Nótese la formación de inclusiones perinucleares en ambas construcciones (flechas). (D y H) Cotransfección de las fusiones sinfilina-EYFP/alfa-sinucleína-ECFP y EYFP-sinfilina/ECFP-alfa-sinucleína en donde no se observa la formación de inclusiones. Nótese también cómo la cotransfección EYFP-sinfilina/ECFP-alfa-sinucleína (H) parece favorecer la colocalización de las proteínas.

Para determinar la presencia y la integridad de la alfa-sinucleína en las células transfectadas con las construcciones generadas, se utilizó el ensayo de detección de proteínas por western blot (Fig 16).



**Figura 16.** Western-blot de células que expresan alfa-sinucleína, sinfilina y sus proteínas fluorescentes acompañantes. La falta de un anticuerpo anti-sinfilina adecuado no permite su detección por western blot. Nótese cómo una proporción de la sinucleína fue separada de la construcción y migró a la región habitual al rededor de los 15 kDa.

## DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Aunque la ineficacia de los anticuerpos comerciales diseñados para detectar a la sinfilina no nos permite determinar que su expresión sea idéntica en las moscas transgénicas sencillas (que sólo expresan sinfilina) y dobles (que expresan tanto sinfilina como alfa-sinucleína), la cuantificación de RNA mensajero por RT-PCR sugiere que los niveles de expresión en ambas condiciones son similares, y que la diferencia entre los fenotipos de expresión sencilla y doble son resultado de un mecanismo que no depende de los niveles de proteína en los individuos (Fig. 12).

Si bien es cierto que las conclusiones más importantes de este trabajo se lograrán hasta que se tengan las moscas transgénicas que expresen estas construcciones en distintos tejidos, la transfección de células HEK sí nos permite proponer que cuando la sinfilina se expresa de manera independiente, ésta tiende a agregarse en inclusiones perinucleares. Sin embargo, cuando tanto la sinfilina como la alfa-sinucleína son cotransfectadas, las inclusiones no pueden ser detectadas. Esto puede ser posible debido a algún mecanismo de interacción entre la alfa-sinucleína y la sinfilina que no permita la agregación de sinfilina en el citoplasma de las células o posibles diferencias en modificaciones postraduccionales que ocurren en las células HEK. Otra posibilidad es el hecho de que, habiéndolas transfectado al mismo tiempo, se pudo haber causado una sobrecarga en la maquinaria de síntesis de proteína de las células, impidiendo la expresión mínima requerida para observar esta interacción. Sin duda, más trabajo se debe hacer para determinar la naturaleza exacta de esta interacción. Otra conclusión importante es que las construcciones que *a priori* parecen favorecer más la colocalización de la alfa-sinucleína y la sinfilina son aquellas que llevan a las proteínas

fluorescentes en la región amino terminal de los insertos. Si esto se logra comprobar por medio de los ensayos de FRET correspondientes, entonces serán estas construcciones con las que se generen las moscas transgénicas.

Una vez que logremos expresar estas construcciones en la mosca bajo el control de la secuencia UAS presente en el vector de transformación de *Drosophila* pUAST, podremos cruzarlas con moscas que lleven *drivers* de expresión hacia distintos tejidos específicos. Por ejemplo, uno de los más interesantes sería comparar la dinámica de interacción por FRET entre alfa-sinucleína y sinfilina expresadas específicamente en neuronas dopaminérgicas con respecto a la dinámica en neuronas serotoninérgicas. Este ensayo nos permitirá discernir (midiendo la eficiencia de FRET) si la dopamina juega un papel importante en la interacción de estas proteínas, o si promueve o inhibe en algún punto la oligomerización y toxicidad de la alfa-sinucleína. Se sabe, por ejemplo, que la alfa-sinucleína tiene un sitio de unión a cobre y que, cuando está presente, éste promueve la formación de agregados de alfa-sinucleína. Un ensayo que podría realizarse de manera relativamente fácil en el laboratorio consiste en añadir pequeñas concentraciones de cobre en la comida de las moscas y, por medio de ensayos de FRET, determinar si altera en algún sentido la interacción de la alfa-sinucleína y la sinfilina. Además, podríamos determinar si estos cambios en la interacción entre alfa-sinucleína y sinfilina se reflejan en variables que ya hemos medido previamente en el laboratorio, como viabilidad, supervivencia de neuronas dopaminérgicas, movilidad y esperanza de vida. Además, dado que contamos con las construcciones mutantes de alfa-sinucleína A30P y A53T, seremos capaces de analizar los posibles efectos que tienen estas modificaciones en la dinámica de interacción entre la alfa-sinucleína y la sinfilina.

Si logramos entender este módulo básico mediante el cual la alfa-sinucleína adquiere toxicidad en la enfermedad de Parkinson, seremos capaces de diseñar químicos específicos que inhiban la formación de las variedades tóxicas de los procesos de agregación/oligomerización, y así mejorar la calidad de vida de los pacientes diagnosticados o, incluso, detectar la enfermedad en las etapas primarias y tratarla más efectivamente.

## REFERENCIAS

- Abbott, Alison. 2010. "Levodopa: the Story So Far.." *Nature* 466 (7310) (August 26): S6–7. doi:10.1038/466S6a.
- Ahmad, Basir, and Lisa J Lapidus. 2012. "Curcumin Prevents Aggregation in  $\alpha$ -Synuclein by Increasing Reconfiguration Rate.." *Journal of Biological Chemistry* 287 (12) (March 16): 9193–9199. doi:10.1074/jbc.M111.325548.
- Apetri, Mihaela M, Nakul C Maiti, Michael G Zagorski, Paul R Carey, and Vernon E Anderson. 2006. "Secondary Structure of Alpha-Synuclein Oligomers: Characterization by Raman and Atomic Force Microscopy.." *Journal of Molecular Biology* 355 (1) (January 6): 63–71. doi:10.1016/j.jmb.2005.10.071.
- Auluck, Pavan K, Gabriela Caraveo, and Susan Lindquist. 2010. " $\alpha$ -Synuclein: Membrane Interactions and Toxicity in Parkinson's Disease." *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 26 (1) (November 10): 211–233. doi:10.1146/annurev.cellbio.042308.113313.
- Betarbet, R, T B Sherer, G MacKenzie, M Garcia-Osuna, A V Panov, and J T Greenamyre. 2000. "Chronic Systemic Pesticide Exposure Reproduces Features of Parkinson's Disease.." *Nature Neuroscience* 3 (12) (December): 1301–1306. doi:10.1038/81834.
- Bhak, Ghibom, Jung-Ho Lee, Ji-Sook Hahn, and Seung R Paik. 2009. "Granular Assembly of Alpha-Synuclein Leading to the Accelerated Amyloid Fibril Formation with Shear Stress.." *PLoS ONE* 4 (1): e4177. doi:10.1371/journal.pone.0004177.
- Bianco, Lo, C, J-L Ridet, B L Schneider, N Deglon, and P Aebischer. 2002. "Alpha - Synucleinopathy and Selective Dopaminergic Neuron Loss in a Rat Lentiviral-

- Based Model of Parkinson's Disease.." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99 (16) (August 6): 10813–10818. doi:10.1073/pnas.152339799.
- Breydo, Leonid, Jessica W Wu, and Vladimir N Uversky. 2011. "α-Synuclein Misfolding and Parkinson's Disease." *BBA - Molecular Basis of Disease* (October 21): 1–25. doi:10.1016/j.bbadis.2011.10.002.
- Caroline M Tanner, Freya Kamel G Webster Ross Jane A Hoppin Samuel M Goldman Monica Korell Connie Marras Grace S Bhudhikanok Meike Kasten Anabel R Chade Kathleen Comyns Marie Barber Richards Cheryl Meng Benjamin Priestley Hubert H Fernandez Franca Cambi David M Umbach Aaron Blair Dale P Sandler J William Langston. 2011. "Rotenone, Paraquat, and Parkinson's Disease." *Environmental Health Perspectives* 119 (6) (June 1): 866. doi:10.1289/ehp.1002839.
- Catala, M, and J Poirier. 2012. "Georges Marinesco (1863–1938): Neurologist, Neurohistologist and Neuropathologist." *Romanian Journal of Morphology and Embryology*= ....
- Chen, X, H A R Silva, and M J Pettenati. 1995. "The Human NACP/{Alpha}-Synuclein Gene: Chromosome Assignment to 4q21. 3-Q22 and TaqI RFLP Analysis." *Genomics* 26 (2).
- Chiti, F, P Webster, N Taddei, A Clark, M Stefani, G Ramponi, and Christopher M Dobson. 1999. "Designing Conditions for in Vitro Formation of Amyloid Protofilaments and Fibrils.." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96 (7) (March 30): 3590–3594.
- Chiti, Fabrizio, and Christopher M Dobson. 2006. "Protein Misfolding, Functional Amyloid, and Human Disease.." *Annual Review of Biochemistry* 75: 333–366. doi:10.1146/annurev.biochem.75.101304.123901.

- Christensen, Kaare, Gabriele Doblhammer, Roland Rau, and James W Vaupel. 2009. "Ageing Populations: the Challenges Ahead." *The Lancet* 374 (9696) (October 3): 1196–1208. doi:10.1016/S0140-6736(09)61460-4.
- Collins, Sean R, Adam Douglass, Ronald D Vale, and Jonathan S Weissman. 2004. "Mechanism of Prion Propagation: Amyloid Growth Occurs by Monomer Addition.." *PLoS Biology* 2 (10) (October): e321. doi:10.1371/journal.pbio.0020321.
- Cookson, Mark R. 2005. "The Biochemistry of Parkinson's Disease.." *Annual Review of Biochemistry* 74: 29–52. doi:10.1146/annurev.biochem.74.082803.133400.
- Dev, Kumlesh K, Katja Hofele, Samuel Barbieri, Vladimir L Buchman, and Herman van der Putten. 2003. "Part II: Alpha-Synuclein and Its Molecular Pathophysiological Role in Neurodegenerative Disease.." *Neuropharmacology* 45 (1) (July): 14–44.
- Dexter, D T DT, P P Jenner, A H AH Schapira, and C D CD Marsden. 1991. "Alterations in Levels of Iron, Ferritin, and Other Trace Metals in Neurodegenerative Diseases Affecting the Basal Ganglia. the Royal Kings and Queens Parkinson's Disease Research Group.." *Annals of Neurology* 32 Suppl (December 31): S94–100. doi:10.1002/ana.410320716.
- Dow, J A T, and M F Romero. 2010. "Drosophila Provides Rapid Modeling of Renal Development, Function, and Disease." *AJP: Renal Physiology* 299 (6) (December 7): F1237–F1244. doi:10.1152/ajprenal.00521.2010.
- Engelender, Simone, Z Kaminsky, X Guo, and A H Sharp. 1999. "Synphilin-1 Associates with Alpha-Synuclein and Promotes the Formation of Cytosolic Inclusions." *Nat Genet.*
- Feany, M B, and W W Bender. 2000. "A Drosophila Model of Parkinson's Disease.."

- Nature* 404 (6776) (March 23): 394–398. doi:10.1038/35006074.
- Finkel, Toren. 2005. “Radical Medicine: Treating Ageing to Cure Disease.” *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 6 (12) (October 14): 971–976. doi:10.1038/nrm1763.
- Franssens, V, E Boelen, J Anandhakumar, T Vanhelmont, S Büttner, and J Winderickx. 2009. “Yeast Unfolds the Road Map Toward  $\alpha$ -Synuclein-Induced Cell Death.” *Cell Death and Differentiation* 17 (5) (December 18): 746–753. doi:10.1038/cdd.2009.203.
- Gell, David A, Richard P Grant, and Joel P Mackay. 2012. “The Detection and Quantitation of Protein Oligomerization..” *Advances in Experimental Medicine and Biology* 747: 19–41. doi:10.1007/978-1-4614-3229-6\_2.
- Giehm, Lise, Dmitri I Svergun, Daniel E Otzen, and Bente Vestergaard. 2011. “Low-Resolution Structure of a Vesicle Disrupting  $\alpha$ -Synuclein Oligomer That Accumulates During Fibrillation” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108 (8) (February 22): 3246–3251. doi:10.1073/pnas.1013225108.
- Goedert, Michel, Maria Grazia Spillantini, Kelly Del Tredici, and Heiko Braak. 2012. “100 Years of Lewy Pathology..” *Nature Reviews. Neurology* 9 (1) (December 11): 13–24. doi:10.1038/nrneurol.2012.242.
- Gorell, Jay M, Benjamin A Rybicki, Christine Cole Johnson, and Edward L Peterson. 1999. “Occupational Metal Exposures and the Risk of Parkinson’s Disease.” *Neuroepidemiology* 18 (6): 303–308. doi:10.1159/000026225.
- Gosavi, Nirmal, He-Jin Lee, Jun Sung Lee, Smita Patel, and Seung-Jae Lee. 2002. “Golgi Fragmentation Occurs in the Cells with Prefibrillar  $\alpha$ -Synuclein Aggregates and Precedes the Formation of Fibrillar Inclusion..” *Journal of Biological Chemistry* 277 (50) (December 13): 48984–48992.

doi:10.1074/jbc.M208194200.

Greten-Harrison, Becket, Manuela Polydoro, Megumi Morimoto-Tomita, Ling Diao, Andrew M Williams, Esther H Nie, Sachin Makani, et al. 2010. “ $\alpha\beta\gamma$ -Synuclein Triple Knockout Mice Reveal Age-Dependent Neuronal Dysfunction.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (45) (November 9): 19573–19578. doi:10.1073/pnas.1005005107.

Heise, Henrike, Wolfgang Hoyer, Stefan Becker, Ovidiu C Andronesi, Dietmar Riedel, and Marc Baldus. 2005. “Molecular-Level Secondary Structure, Polymorphism, and Dynamics of Full-Length Alpha-Synuclein Fibrils Studied by Solid-State NMR.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102 (44) (November 1): 15871–15876. doi:10.1073/pnas.0506109102.

Hernández-Vargas, René, Luis Fonseca-Ornelas, Ignacio López-González, Juan Riesgo-Escovar, Mario Zurita, and Enrique Reynaud. 2011. “Synphilin Suppresses  $\alpha$ -Synuclein Neurotoxicity in a Parkinson's Disease *Drosophila* Model.” *Genesis (New York, N.Y. : 2000)* 49 (5) (May): 392–402. doi:10.1002/dvg.20740.

Hornykiewicz, Oleh. 2010. “A Brief History of Levodopa.” *Journal of Neurology* 257 (Suppl 2) (November): S249–52. doi:10.1007/s00415-010-5741-y.

Huntington, J A, N S Pannu, B Hazes, R J Read, D A Lomas, and R W Carrell. 1999. “A 2.6 Å Structure of a Serpin Polymer and Implications for Conformational Disease.” *Journal of Molecular Biology* 293 (3) (October 29): 449–455. doi:10.1006/jmbi.1999.3184.

Inden, Masatoshi, Yoshihisa Kitamura, Mari Abe, Aya Tamaki, Kazuyuki Takata, and Takashi Taniguchi. 2011. “Parkinsonian Rotenone Mouse Model: Reevaluation of Long-Term Administration of Rotenone in C57BL/6 Mice.” *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 34 (1): 92–96.

- Iwai, A, Eliezer Masliah, Makoto Yoshimoto, N Ge, L Flanagan, H A de Silva, A Kittel, and T Saitoh. 1995. "The Precursor Protein of Non-a Beta Component of Alzheimer's Disease Amyloid Is a Presynaptic Protein of the Central Nervous System.." *Neuron* 14 (2) (February): 467–475.
- Jin, Jinghua, G Jane Li, Jeanne Davis, David Zhu, Yan Wang, Catherine Pan, and Jing Zhang. 2007. "Identification of Novel Proteins Associated with Both Alpha-Synuclein and DJ-1." *Molecular & Cellular Proteomics : MCP* 6 (5) (May): 845–859. doi:10.1074/mcp.M600182-MCP200.
- Kayed, Rakez, Elizabeth Head, Jennifer L Thompson, Theresa M McIntire, Saskia C Milton, Carl W Cotman, and Charles G Glabe. 2003. "Common Structure of Soluble Amyloid Oligomers Implies Common Mechanism of Pathogenesis.." *Science* 300 (5618) (April 18): 486–489. doi:10.1126/science.1079469.
- Krüger, R, W Kuhn, T Müller, D Voitalla, M Graeber, S Kösel, H Przuntek, J T Eppelen, L Schöls, and O Riess. 1998. "Ala30Pro Mutation in the Gene Encoding Alpha-Synuclein in Parkinson's Disease.." *Nat Genet* 18 (2) (February): 106–108. doi:10.1038/ng0298-106.
- Kuwahara, Tomoki, Akihiko Koyama, Keiko Gengyo-Ando, Mayumi Masuda, Hisatomo Kowa, Makoto Tsunoda, Shohei Mitani, and Takeshi Iwatsubo. 2006. "Familial Parkinson Mutant Alpha-Synuclein Causes Dopamine Neuron Dysfunction in Transgenic Caenorhabditis Elegans.." *Journal of Biological Chemistry* 281 (1) (January 6): 334–340. doi:10.1074/jbc.M504860200.
- Lang, A E, and A M Lozano. 1998. "Parkinson's Disease." *New England Journal of Medicine* 339 (15): 1044–1053.
- Lashuel, Hilal A, Dean Hartley, Benjamin M Petre, Thomas Walz, and Peter T Lansbury. 2002. "Neurodegenerative Disease: Amyloid Pores From Pathogenic

- Mutations..” *Nature* 418 (6895) (July 18): 291. doi:10.1038/418291a.
- Lee, Lily Y L, and Rita P Y Chen. 2007. “Quantifying the Sequence-Dependent Species Barrier Between Hamster and Mouse Prions.” *Journal of the American Chemical Society* 129 (6) (February): 1644–1652. doi:10.1021/ja0667413.
- Lees, Andrew J, John Hardy, and Tamas Revesz. 2009. “Parkinson's Disease..” *Lancet* 373 (9680) (June 13): 2055–2066. doi:10.1016/S0140-6736(09)60492-X.
- Li, J, Vladimir N Uversky, and Anthony L Fink. 2001. “Effect of Familial Parkinson's Disease Point Mutations A30P and A53T on the Structural Properties, Aggregation, and Fibrillation of Human Alpha-Synuclein..” *Biochemistry* 40 (38) (September 25): 11604–11613.
- Lindersson, E, and P H Jensen. 2004. “Landes Bioscience Madame Curie Database.” *Molecular ....*
- Lowe, Rachel, Dean L Pountney, Poul Henning Jensen, Wei Ping Gai, and Nicolas H Voelcker. 2004. “Calcium(II) Selectively Induces Alpha-Synuclein Annular Oligomers via Interaction with the C-Terminal Domain..” *Protein Science : a Publication of the Protein Society* 13 (12) (December): 3245–3252. doi:10.1110/ps.04879704.
- Manning-Bog, Amy B, Alison L McCormack, Jie Li, Vladimir N Uversky, Anthony L Fink, and Donato A Di Monte. 2002. “The Herbicide Paraquat Causes Up-Regulation and Aggregation of Alpha-Synuclein in Mice: Paraquat and Alpha-Synuclein..” *Journal of Biological Chemistry* 277 (3) (January 18): 1641–1644. doi:10.1074/jbc.C100560200.
- Maroteaux, L, J T Campanelli, and R H Scheller. 1988. “Synuclein: a Neuron-Specific Protein Localized to the Nucleus and Presynaptic Nerve Terminal.” *The Journal of*
- Martin, P Martinez, AHV Schapira, and F Stocchi. 2007. “Prevalence of Nonmotor

- Symptoms in Parkinson's Disease in an International Setting; Study Using Nonmotor Symptoms Questionnaire in 545 Patients - Martinez-Martin - 2007 - Movement Disorders - Wiley Online Library.” *Movement* ....
- Martínez-Martín, Pablo, and Javier Damián. 2010. “Parkinson Disease: Depression and Anxiety in Parkinson Disease.” *Nature Reviews. Neurology* 6 (5) (May 1): 243–245. doi:10.1038/nrneurol.2010.49.
- Masliah, Eliezer, E Rockenstein, I Veinbergs, M Mallory, M Hashimoto, A Takeda, Y Sagara, A Sisk, and L Mucke. 2000. “Dopaminergic Loss and Inclusion Body Formation in  $\alpha$ -Synuclein Mice: Implications for Neurodegenerative Disorders.” *Science* 287 (5456): 1265–1269.
- Mezey, E, A M Dehejia, G Harta, N Tresser, S F Suchy, R L Nussbaum, M J Brownstein, and M H Polymeropoulos. 1998. “Alpha Synuclein Is Present in Lewy Bodies in Sporadic Parkinson's Disease..” *Molecular Psychiatry* 3 (6): 493.
- Moore, D J, A B West, Valina L Dawson, and Ted M Dawson. 2005. “Molecular Pathophysiology of Parkinson's Disease.” *Annu. Rev. Neurosci.* 28: 57–87.
- Nelson, Rebecca, Michael R Sawaya, Melinda Balbirnie, Anders Ø Madsen, Christian Riek, Robert Grothe, and David Eisenberg. 2005. “Structure of the Cross-Beta Spine of Amyloid-Like Fibrils..” *Nature* 435 (7043) (June 9): 773–778. doi:10.1038/nature03680.
- Obeso, Jose A, Maria C Rodriguez-Oroz, Christopher G Goetz, Concepcion Marin, Jeffrey H Kordower, Manuel Rodriguez, Etienne C Hirsch, Matthew Farrer, Anthony H V Schapira, and Glenda Halliday. 2010. “Missing Pieces in the Parkinson's Disease Puzzle.” *Nature Medicine* 16 (6) (May 23): 653–661. doi:10.1038/nm.2165.
- Orrenius, Sten, Vladimir Gogvadze, and Boris Zhivotovsky. 2007. “Mitochondrial

- Oxidative Stress: Implications for Cell Death.” *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 47 (1) (February): 143–183. doi:10.1146/annurev.pharmtox.47.120505.105122.
- Payton, J E, R J Perrin, D F Clayton, and J M George. 2001. “Protein-Protein Interactions of Alpha-Synuclein in Brain Homogenates and Transfected Cells..” *Brain Research. Molecular Brain Research* 95 (1-2) (November 1): 138–145.
- Polymeropoulos, Mihael H, Christian Lavedan, Elisabeth Leroy, Susan E Ide, Anindya Dehejia, Amalia Dutra, Brian Pike, Holly Root, Jeffrey Rubenstein, and Rebecca Boyer. 1997. “Mutation in the  $\alpha$ -Synuclein Gene Identified in Families with Parkinson's Disease.” *Science* 276 (5321): 2045–2047. doi:10.1126/science.276.5321.2045.
- Preux, P M PM, A A Condet, C C Anglade, M M Druet-Cabanac, C C Debrock, W W Macharia, P P Couratier, F F Boutros-Toni, and M M Dumas. 2000. “Parkinson's Disease and Environmental Factors. Matched Case-Control Study in the Limousin Region, France..” *Neuroepidemiology* 19 (6) (October 31): 333–337.
- Priyadarshi, A, S A Khuder, E A Schaub, and S S Priyadarshi. 2001. “Environmental Risk Factors and Parkinson's Disease: a Metaanalysis..” *Environmental Research* 86 (2) (June): 122–127. doi:10.1006/enrs.2001.4264.
- Rybicki, B A, C C Johnson, J Uman, and J M Gorell. 1993. “Parkinson's Disease Mortality and the Industrial Use of Heavy Metals in Michigan..” *Movement Disorders* 8 (1): 87–92. doi:10.1002/mds.870080116.
- Sapsford, Kim E, Lorenzo Berti, and Igor L Medintz. 2006. “Materials for Fluorescence Resonance Energy Transfer Analysis: Beyond Traditional Donor-Acceptor Combinations..” *Angewandte Chemie (International Ed. in English)* 45 (28) (July 10): 4562–4589. doi:10.1002/anie.200503873.

- Satake, Wataru, Yuko Nakabayashi, Ikuko Mizuta, Yushi Hirota, Chiyomi Ito, Michiaki Kubo, Takahisa Kawaguchi, et al. 2009. "Genome-Wide Association Study Identifies Common Variants at Four Loci as Genetic Risk Factors for Parkinson's Disease." *Nature Genetics* 41 (12) (November 15): 1303–1307. doi:10.1038/ng.485.
- Sawaya, Michael R, Shilpa Sambashivan, Rebecca Nelson, Magdalena I Ivanova, Stuart A Sievers, Marcin I Apostol, Michael J Thompson, et al. 2007. "Atomic Structures of Amyloid Cross-Beta Spines Reveal Varied Steric Zippers.." *Nature* 447 (7143) (May 24): 453–457. doi:10.1038/nature05695.
- Serag, Ahmed A, Christian Altenbach, Mari Gingery, Wayne L Hubbell, and Todd O Yeates. 2002. "Arrangement of Subunits and Ordering of Beta-Strands in an Amyloid Sheet.." *Nature Structural Biology* 9 (10) (October): 734–739. doi:10.1038/nsb838.
- Serpell, L C, J Berriman, R Jakes, M Goedert, and R A Crowther. 2000. "Fiber Diffraction of Synthetic Alpha-Synuclein Filaments Shows Amyloid-Like Cross-Beta Conformation.." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97 (9) (April 25): 4897–4902.
- Shulman, Joshua M, Philip L De Jager, and Mel B Feany. 2011. "Parkinson's Disease: Genetics and Pathogenesis." *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* 6 (1) (February 28): 193–222. doi:10.1146/annurev-pathol-011110-130242.
- Simón-Sánchez, Javier, Claudia Schulte, Jose M Bras, Manu Sharma, J Raphael Gibbs, Daniela Berg, Coro Paisan-Ruiz, et al. 2009. "Genome-Wide Association Study Reveals Genetic Risk Underlying Parkinson's Disease." *Nature Genetics* 41 (12) (November 15): 1308–1312. doi:10.1038/ng.487.
- Singleton, A B, M Farrer, J Johnson, A Singleton, S Hague, J Kachergus, M Hulihan, et al. 2003. "Alpha-Synuclein Locus Triplication Causes Parkinson's Disease.."

- Science* 302 (5646) (October 31): 841. doi:10.1126/science.1090278.
- Skovronsky, Daniel M, Virginia M Y Lee, and John Q Trojanowski. 2006. "Neurodegenerative Diseases: New Concepts of Pathogenesis and Their Therapeutic Implications.." *Annual Review of Pathology* 1: 151–170. doi:10.1146/annurev.pathol.1.110304.100113.
- Spillantini, M G, M L Schmidt, V M Lee, John Q Trojanowski, R Jakes, and M Goedert. 1997. "Alpha-Synuclein in Lewy Bodies.." *Nature* 388 (6645) (August 28): 839–840. doi:10.1038/42166.
- Sporn, M B, and N Suh. 2002. "Chemoprevention: an Essential Approach to Controlling Cancer." *Nature Reviews Cancer*.
- Suckow, Brianne K, and Mark A Suckow. 2006. "Lifespan Extension by the Antioxidant Curcumin in *Drosophila Melanogaster*." *International Journal* 2.
- Uversky, Vladimir N, J Li, and Anthony L Fink. 2001a. "Evidence for a Partially Folded Intermediate in Alpha-Synuclein Fibril Formation.." *Journal of Biological Chemistry* 276 (14) (April 6): 10737–10744. doi:10.1074/jbc.M010907200.
- Uversky, Vladimir N, J Li, and Anthony L Fink. 2001b. "Metal-Triggered Structural Transformations, Aggregation, and Fibrillation of Human Alpha-Synuclein. a Possible Molecular Link Between Parkinson's Disease and Heavy Metal Exposure.." *Journal of Biological Chemistry* 276 (47) (November 23): 44284–44296. doi:10.1074/jbc.M105343200.
- van der Putten, H, K H Wiederhold, A Probst, S Barbieri, C Mistl, S Danner, S Kauffmann, et al. 2000. "Neuropathology in Mice Expressing Human Alpha-Synuclein.." *The Journal of Neuroscience : the Official Journal of the Society for Neuroscience* 20 (16) (August 15): 6021–6029.
- Vilar, Marçal, Hui-Ting Chou, Thorsten Lührs, Samir K Maji, Dominique Riek-Loher,

- Rene Verel, Gerard Manning, Henning Stahlberg, and Roland Riek. 2008. "The Fold of Alpha-Synuclein Fibrils.." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105 (25) (June 23): 8637–8642. doi:10.1073/pnas.0712179105.
- Weinreb, P H, W Zhen, A W Poon, K A Conway, and P T Lansbury. 1996. "NACP, a Protein Implicated in Alzheimer's Disease and Learning, Is Natively Unfolded.." *Biochemistry* 35 (43) (October 29): 13709–13715. doi:10.1021/bi961799n.
- Winner, Beate, Roberto Jappelli, Samir K Maji, Paula A Desplats, Leah Boyer, Stefan Aigner, Claudia Hetzer, et al. 2011. "In Vivo Demonstration That Alpha-Synuclein Oligomers Are Toxic.." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108 (10) (March 8): 4194–4199. doi:10.1073/pnas.1100976108.
- Xu, Jin, Shyan-Yuan Kao, Frank J S Lee, Weihong Song, Lee-Way Jin, and Bruce A Yankner. 2002. "Dopamine-Dependent Neurotoxicity of Alpha-Synuclein: a Mechanism for Selective Neurodegeneration in Parkinson Disease.." *Nature Medicine* 8 (6) (June): 600–606. doi:10.1038/nm0602-600.
- Yankner, Bruce A, Tao Lu, and Patrick Loerch. 2008. "The Aging Brain." *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* 3 (1) (February): 41–66. doi:10.1146/annurev.pathmechdis.2.010506.092044.
- Zarranz, Juan J, Javier Alegre, Juan C Gómez-Esteban, Elena Lezcano, Raquel Ros, Israel Ampuero, Lídice Vidal, et al. 2004. "The New Mutation, E46K, of Alpha-Synuclein Causes Parkinson and Lewy Body Dementia.." *Annals of Neurology* 55 (2) (February): 164–173. doi:10.1002/ana.10795.