UNIVERSIDAD ANDRÉS BELLO
Facultad de Medicina
Escuela de Tecnología Médica

COMPARACIÓN DEL PROCESO DE AGREGACIÓN ENTRE MONÓMEROS Y OLIGÓMEROS DE ALFA SINUCLEÍNA Y SU REMODELAMIENTO MEDIANTE MOLÉCULAS DE ORIGEN NATURAL *IN VITRO.*

Tesis de pregrado para optar al título de Tecnólogo médico con mención en Bioanálisis Clínico, Inmunohematología y Banco de Sangre.

Autores:
Valentina Fernanda Caro Urzúa, Camila Rocío Guzmán Espina.
Profesor guía: Alberto Jesús Cornejo Mora.

Santiago de Chile, 2018

Agradecimientos

A nuestras familias y amigos, por haber sido un apoyo incondicional durante todo el desarrollo de este proyecto.

A nuestros compañeros de laboratorio, con quienes trabajamos durante esta Unidad de Investigación y con quienes nos apoyamos mutuamente.

Al personal del CIMIS, quienes nos recibían todas las mañanas con una sonrisa amable.

Finalmente, a nuestro tutor, Alberto Cornejo, por permitirnos ser parte y contribuir a esta investigación, además de las enseñanzas que nos entregó día a día durante el desarrollo de este proyecto

Todo este trabajo fue posible gracias a ellos.

Tabla de contenidos

Resumen 6

Capítulo 1: Marco teórico 7

1.1 Enfermedad de Parkinson 7

1.2 Alfa sinucleína 8

1.2.1 Estructura y función 8

1.2.2 Genética de alfa sinucleína 9

1.3 Oligómeros de alfa sinucleína 10

1.4 Toxicidad celular 13

1.5 Estrategias terapéuticas 14

Capítulo 2: Hipótesis y objetivos 16

2.1 Hipótesis 16

2.2 Objetivos 16

2.2.1 Objetivos generales 16

2.2.2 Objetivos específicos 16

Capítulo 3: Materiales y equipamiento 17

3.1 Material biológico y reactivos utilizados 17

3.1.1 Material biológico 17

3.1.2 Medios de cultivo 17

3.1.3 Soluciones 17

3.1.3.1 Soluciones para purificación de proteínas en HPLC 17

3.1.3.2 Soluciones para purificación con columna Pro-Imac 18

3.1.3.3 Soluciones para dot blot 18

3.2 Equipos 18

3.3 Anticuerpos para dot blot 19

3.4 Otros 20

Capítulo 4: Metodología 21

4.1 Tipo de estudio y lugar de realización 21

4.2 Metodología 21

4.2.1 Obtención de proteína recombinante 22

4.2.2 Cultivo bacteriano 22

4.2.3 Purificación 24

4.2.4 Concentración proteica 25

4.2.5 Electroforesis SDS-PAGE 26

4.2.6 Corrida electroforética 27

4.2.7 Ensayos de agregación 28

4.2.8 Ensayos de inhibición con moléculas naturales 29

4.2.9 Dot blot 29

4.3 Análisis estadístico 30

4.4 Eliminación de residuos 31

Capítulo 5: Resultados 32

5.1 Alfa sinucleína recombinante 32

5.2 Purificación de alfa sinucleína 35

5.3 Cinética de agregación de alfa sinucleína 41

5.4 Inhibición de moléculas naturales 42

5.5 Dot blot 46

Capítulo 6: Discusión 48

6.1 Producción de alfa sinucleína recombinante 48

6.2 Purificación de alfa sinucleína 50

6.3 Fluorescencia intrínseca como método de medición de concentración 53

6.4 Agregación y remodelamiento de alfa sinucleína 55

Capítulo 7: Conclusión 61

Capítulo 8: Organigrama 62

Capítulo 9: Bibliografía 63

Resumen

Alfa sinucleína es una proteína de 14,5 kDa presente en los terminales presinápticos neuronales. Es el principal componente de los cuerpos de Lewy, agregados anatomopatológicos de la enfermedad de Parkinson (EP), un desorden neurodegenerativo caracterizado por la pérdida de neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra en el cerebro. Alfa sinucleína puede plegarse anormalmente y auto-agregarse formando oligómeros, los cuales presentan una alta cantidad de hoja β. Estas estructuras causan degeneración neuronal, por lo que es necesario buscar moléculas capaces de evitar la agregación proteica y que logren la remodelación del oligómero para evitar el avance de la enfermedad.

En esta investigación se realizó una curva de agregación de alfa sinucleína recombinante monitoreada por Tioflavina T, la cual mostró aumento de hoja β entre las 24 y 48 horas. Además, se realizaron ensayos de agregación *in vitro* utilizando proteína como control de agregación y con moléculas naturales como control de inhibición, evidenciando que la molécula natural A2 es capaz de inhibir el proceso de agregación. Posteriormente, se realizó un dot blot con el anticuerpo monoclonal ASyO5, capaz de reconocer oligómeros de alfa sinucleína utilizando muestras con droga y muestra control de tiempo 0 y 48 horas de incubación. El resultado mostró una disminución en el reconocimiento de oligómeros tratados por una familia de moléculas naturales en comparación con la muestra control. Así, se demuestra que la molécula natural A2 es capaz remodelar las estructuras oligoméricas formadas por la agregación patológica de la proteína, proporcionando potenciales nuevas vías terapéuticas contra la EP.

Capítulo 1: Marco teórico

1.1 Enfermedad de Parkinson

La enfermedad de Parkinson (EP) es un desorden neurodegenerativo descrito por James Parkinson en 1817, que afecta a personas mayores de 65 años, aunque se puede presentar en personas de menor edad. Se caracteriza por una disminución de las neuronas dopaminérgicas de la pars compacta, en la sustancia nigra del cerebro [(1)]. La patología se evidencia mediante temblor en el reposo, hipertonía o rigidez muscular y problemas del equilibrio, con una evolución lenta y progresiva, causando una pérdida paulatina de la capacidad física y mental, hasta llegar a la discapacidad total, alterando la vida cotidiana de los pacientes, y afectando a su círculo más cercano, implicando una serie de problemas emocionales, sociales y económicos [(2, 3)]. En Chile, la EP es una patología Auge, y según los datos del Instituto Nacional de Estadísticas (INE) en el año 2010, el número de casos están cercanos a dos pacientes por cada mil habitantes dentro del grupo de mayores de 60 años, los cuales alcanzaron un 11,4% del total de la población[(2)].

El origen de la muerte de las células dopaminérgicas aún es desconocido, sin embargo, se presume que es multicausal, principalmente por factores etiológicos de naturaleza ambiental y genética[(2)]. Diversos estudios han evidenciado la presencia de inclusiones intracelulares denominadas cuerpos de Lewy[(4)], los cuales contienen agregados de alfa sinucleína, indicando a esta proteína como la principal responsable del daño neuronal.

1.2 Alfa sinucleína

1.2.1 Estructura y función

Alfa sinucleína es una proteína de la familia de las sinucleínas, junto a gamma y beta, todas presentes en el cerebro humano, aunque solo alfa está asociada a trastornos neurodegenerativos[5,6,7]. Está compuesta de 140 aminoácidos y tiene un peso molecular de 14.680 Da[8]. Se ha descrito su presencia a nivel citoplasmático y en la membrana de neuronas terminales presinápticas, y además es el principal componente de los cuerpos de Lewy, marcador anatomopatológico de la EP[9].

Su estructura se divide en tres regiones[8, 10]

(i) Región amino (N) terminal: caracterizada por ser anfipática y rica en lisina, se asume es crucial para modular interacciones con membrana celular, debido a la presencia de repeticiones de la secuencia KTKEVGV, asociada a la interacción con lípidos de membrana[11,12,13].

(ii) Región NAC o no amiloidea: caracterizada por ser altamente hidrofóbica y se asume indispensable para la agregación de la proteína.

(iii) Región carboxilo (C) terminal: implicada en interacciones con metales, moléculas pequeñas y otras proteínas. Presenta alta cantidad de prolina y residuos aminoacídicos.

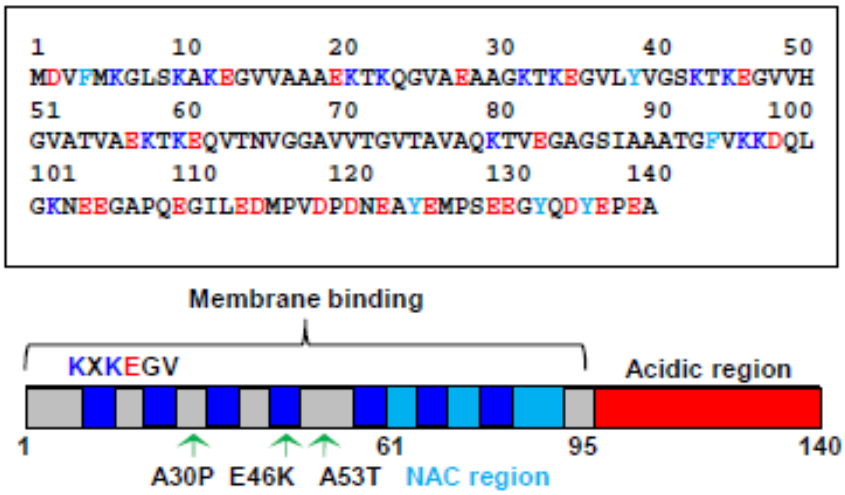


FIGURA 1.1*: Estructura de alfa sinucleína*[11]*.*

A través de los años se ha estudiado la función fisiológica de alfa sinucleína, y a pesar de que aún no se conoce su rol fisiológico específico, se sugiere una participación en el reciclaje de vesículas sinápticas, incluyendo el tráfico, acoplamiento, fusión y reciclaje después de la exocitosis. Además, se ha descrito un rol en la regulación de la transmisión sináptica[5, 7].

1.2.2 Genética de alfa sinucleína

Alfa sinucleína está codificada en el cromosoma 4 q21 (gen SNCA) [5, 14], y se han descrito múltiples anomalías en este gen, como duplicaciones[15], triplicaciones[16] y mutaciones puntuales[17, 18, 19, 20, 21 ,22, 23], siendo tres de ellas las

más relevantes encontradas en el dominio N-terminal: (i) A53T, (ii) A30P y (iii) E46K.

La mutación A53T (i) involucra una sustitución de alanina por treonina en esta posición, y se ha descrito como una mutación hereditaria en familias con EP. Se asocia a la formación de lámina β, causante de la auto-agregación de la proteína y la posterior formación de oligómeros[17], potencialmente tóxicos para la célula. La mutación A30P (ii) indica un cambio de alanina por prolina en el aminoácido 30, localizada en la segunda repetición KTKEGV, y participa en interacciones con la superficie de la membrana citoplasmática[12, 20]. Finalmente, en la mutación E46K (iii) se sustituye glutamato por lisina en otra repetición KTKEGV, provocando un cambio de polaridad en la proteína y afectando la funcionalidad de la misma[18].

Estas tres mutaciones, están asociadas a la formación de agregados proteicos de alfa sinucleína potencialmente tóxicos para la membrana celular, alterando su permeabilidad e integridad[24].

1.3 Oligómeros de alfa sinucleína

Los oligómeros se describen como ensamblados proteicos de bajo peso molecular, conformados por un número definido y limitado de monómeros capaces de propagarse y disociarse, causando daño celular debido a un aumento del contenido de hoja β[24].

La formación de oligómeros ha sido descrita mediante procesos amorfos (i), en el que el aumento de la concentración de la proteína deriva en diferentes interacciones entre las diversas porciones de su misma estructura, formando agregados amiloideos, y procesos dependientes de nucleación (ii), donde la agregación depende de un plegamiento anormal de un monómero proteico que aumentará la polimerización[25]. Este último es posible caracterizarlo en una fase de retardo (i) y en una fase exponencial (ii).

La fase de retardo (i) corresponde a monómeros uniéndose para ir conformando agregados que presentarán en su estructura lámina β, y la fase exponencial (ii) corresponde a la acumulación de manera exponencial de estos agregados ricos en lámina β, son insolubles y dañinos para las células[10, 26].

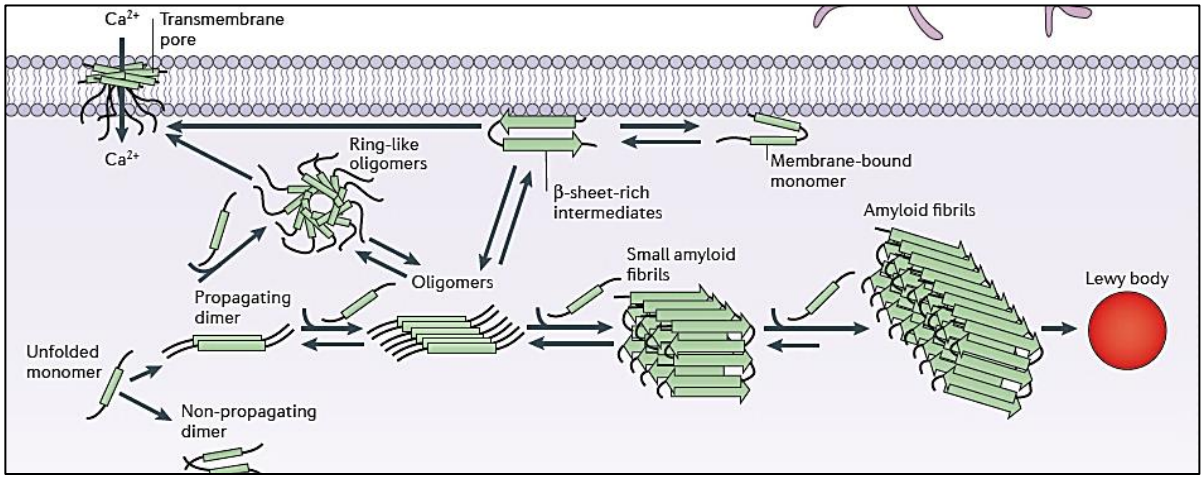


FIGURA 1.2*: Proceso de formación de oligómeros de alfa sinucleína dependiente de nucleación, a partir del monómero hacia la formación de cuerpos de Lewy[10].*

Investigaciones han descrito la formación de bolsillos estéricos en la estructura molecular de oligómeros y fibrillas amiloideas de proteínas con capacidad auto-agregante, como el caso de alfa sinucleína, en las que se enmascara una porción de la proteína. Esto permitiría su posterior identificación[27].

Alfa sinucleína es una proteína capaz de auto-plegarse de manera anormal formando inclusiones citoplasmáticas de agregados proteicos denominados cuerpos de Lewy, anatomopatológicos de la EP, y que causan pérdida y degeneración neuronal[28].

Para formar estos agregados, se han caracterizado distintas fases, en los que va incrementando la cantidad de lámina β en su estructura, pasando de monómeros, a oligómeros, protofibrillas y finalmente fibras o filamentos amieloides[29]. Otra forma de lograr la agregación sería mediante "seeds" o semillas de alfa sinucleína, los cuales serían pequeños oligómeros que favorecerían la agregación en forma dosis y tiempo dependiente[30].

Los agregados de alfa sinucleína serían los responsables del daño neuronal responsable de la sintomatología de la EP, por lo que se hace relevante el estudio de su formación.

1.4Toxicidad celular

Estudios indican que la agregación de alfa sinucleína participa en el proceso de toxicidad de las células neuronales, aunque aún no está totalmente descrito cómo se desarrolla este fenómeno. Se cree este proceso se potencia mediante fosforilación[31], nitración u oxidación de los residuos de tirosina presentes en la proteína[32].

Recientemente se ha visto que los agregados de alfa sinucleína son capaces de interaccionar con lípidos de la membrana celular, desequilibrando su permeabilidad e integridad mediante la formación de poros, viéndose reflejado en un aumento del flujo de Ca^{2+} que despolariza la membrana y lleva a la muerte celular[25, 33]. Además, los oligómeros de alfa sinucleína son capaces de producir especies reactivas de oxígeno, como superóxidos, causando daño oxidativo en las neuronas y llevándolas a apoptosis, propiciando la expresión de los síntomas característicos[34].

Otros mecanismos refieren a que la toxicidad de los oligómeros tiene relación con el complejo SNARE, en la sinapsis, causando un efecto tóxico, la falla en las vías de degradación de proteínas defectuosas, como el sistema proteosoma-ubiquitina o el sistema de autofagia lisosomal, daño mitocondrial, producido por la acumulación de agregados de alfa sinucleína, irrumpiendo en la cadena respiratoria celular, disfunción del retículo endoplásmico (RE) por acumulación de protofibrillas de alfa sinucleína, causando estrés en el RE y aportando a la neurodegeneración. Además, los oligómeros pueden potenciar la respuesta inflamatoria, ya que la eliminación de las células muertas dependen de

la fagocitosis por microglía y / o astrocitos, y finalmente, puede aumentar la liberación de citocinas, causando disfunción neuronal y muerte celular[35].

1.5 Estrategias terapéuticas

Hoy en día los tratamientos descritos y utilizados para la EP no son capaces de curar la enfermedad, pero sí pueden disminuir la sintomatología y controlar su avance.

Estudios previos sugieren que alfa sinucleína extracelular, a pesar de encontrarse en menor cantidad que alfa sinucleína intraneuronal, podría tener un rol en los cambios neuropatológicos como: agregación de proteínas y su propagación, neuroinflamación, neurodegeneración progresiva, lo que la hace un buen candidato como objetivo terapéutico[36].

Algunas de las estrategias terapéuticas sugieren aumentar la eliminación de la alfa sinucleína extracelular, a través de anticuerpos contra alfa sinucleína[37], bloquear la transmisión celular modulando los receptores[38] o bloquear la exocitosis[36], entre otras. Actualmente, en Chile se utiliza la levodopa carbidopa, el cual es considerado un tratamiento de elección para disminuir la sintomatología de la EP, sin embargo, tiene efectos secundarios adversos como náuseas, vómitos y disquinesia, lo que se refiere a trastornos del movimiento por una excesiva o inapropiada actividad muscular. Estos síntomas secundarios van aumentando a medida que se va perdiendo gradualmente la eficacia del tratamiento y se debe aumentar la dosis[3, 39, 40].

Estudios recientes indican como otra estrategia la inhibición de la agregación mediante moléculas de origen natural, o derivados de estas

moléculas, como polifenoles, flavonoides, los cuales serían capaces de evitar la formación de oligómeros tóxicos, o lograr su remodelación[39, 41,42,43]. En esta investigación, se utilizaron extractos de moléculas naturales entregadas por el profesor guía Alberto Cornejo, y la identidad de las muestras aun esta en investigación por lo tanto se mantuvo la confidencialidad de estas durante el completo desarrollo de este trabajo.

Capítulo 2: Hipótesis y objetivos

2.1 Hipótesis

- “Moléculas de origen natural remodelan la estructura oligomérica de alfa sinucleína y su contenido de hoja β”.

2.2 Objetivos

2.2.1 Objetivos generales

Comparar el proceso de agregación entre monómeros y oligómeros de alfa sinucleína y su remodelamiento mediante moléculas de origen natural *in vitro.*

2.2.2 Objetivos específicos

- Producir monómeros de alfa sinucleína por medio de tecnología de proteína recombinante.
- Obtener oligómeros de alfa sinucleína mediante ensayos de agregación proteica.
- Comparar el contenido de hoja β de monómeros y oligómeros de alfa sinucleína.
- Evaluar la remodelación de estructuras oligoméricas en presencia de moléculas naturales seleccionadas.

Capítulo 3: Materiales y equipamiento

3.1 Material biológico y reactivos utilizados

3.1.1 Material biológico

- Modelo bacteriano *Escherichia coli* BL21 (DE3)

3.1.2 Medios de cultivo

- Medio de cultivo Luria Bertani (LB) para cultivo en matraz
- Medio de cultivo LB + agar nutritivo para cultivo en placas

3.1.3 Soluciones

- Buffer Na_2HPO_4 25 mM
- Solución de mantención de pHmetro KCl 3M

3.1.3.1 Soluciones para purificación de proteínas en HPLC

- Buffer A: 10 mM imidazol, 20 mM Na_2HPO_4, 500 mM NaCl

- Buffer B: 150 mM imidazol, 20 mM Na_2HPO_4, 500 mM NaCl

3.1.3.2 Soluciones para purificación de proteína recombinante con columna manual Pro-Imac

- Solución de unión : 10 mM imidazol, 20 mM Na_2HPO_4, 500 mM NaCl
- Solución de lavado: 15 mM imidazol, 20 mM Na_2HPO_4, 500 mM NaCl
- Solución de elución: 20 mM imidazol, 20 mM Na_2HPO_4, 500 mM NaCl

  40 mM imidazol, 20 mM Na_2HPO_4, 500 mM NaCl

  80 mM imidazol, 20 mM Na_2HPO_4, 500 mM NaCl

  120 mM imidazol, 20 mM Na_2HPO_4, 500 mM NaCl

3.1.3.3 Soluciones para dot blot

- Buffer Tris-salino (TBS) 1x : 20 mM Tris- HCl a pH 7,5, 136 mM NaCl
- TBS-Tween 20 1x (TTBS): 20 mM Tris- HCl a pH 7,5, 136 mM NaCl, 0,05% Tween 20
- Solución de bloqueo : 5% leche descremada–TTBS

3.2 Equipos

- Centrífuga Hettich ® Universal 320R
- Centrífuga minispin Hitachi ® CT15E
- Sonicador: Ultrasonic Cleaner SB-100DT

- Fluorímetro Sinergy H1 BioTek ®
- HPLC YL9100 System con columna ProPac Imac 10
- Columna Pro-Imac
- Resina de afinidad de metales Talon ®
- Recolector: Fraction Collector Gilson FC203B
- pHmetro digital Farmalatina ® Starter 2100
- Minifold I Whatman ™ GE Healthcare
- Hypercassette ™ Amersham Biosciences
- Membrana nitrocelulosa 0,2 µm BioRad
- Refrigerador/congelador: Daewoo ® RF-42151
- Freezer: Panasonic ® MDF-U33U-PB
- Baño termorregulado Termo Shaker TS-100C Boeco ®
- Baño termorregulado Farmalatina ® DSB-500D
- Thermo shaker para microplacas MB100-4A
- Agitador SKR 1807-E

3.3 Anticuerpos para dot blot

- Anticuerpo monoclonal IgG ASyO5, producto AS132718, Agrisera AB®
- Anticuerpo secundario anti-ratón IgG H&L (HRP), producto ab97046, Abcam®

3.4 Otros

- Jeringa Microliter™ #710 de 100 µL Hamilton
- Filtro MiniSart ® PP Syringe de 28 mm y poros de 0,2 µm
- Filtro concentrador Millipore ® Amicon ® Ultra-4 de 15 mL
- Microplaca de 96 pocillos negra Thermo Fisher ®
- Tioflavina T

Capítulo 4: Metodología

4.1 Tipo de estudio y lugar de realización

La investigación realizada corresponde a un estudio de tipo experimental, el cual se desarrolló en el laboratorio de Ciencias Aplicada a la Tecnología Médica V (CATEM), sede República (Echaurren 183), a cargo de Alberto Cornejo, profesor asistente de la Facultad de medicina de UNAB.

4.2 Metodología

Los siguientes experimentos están basados en protocolos realizados por Cornejo, A. *et al* en trabajos previos, y fueron adaptados para el desarrollo de esta investigación[44, 45].

4.2.1 Obtención de proteína recombinante

Alfa sinucleína recombinante se obtuvo a partir de la transformación de *Escherichia coli* BL21 (DE3) a la cual se le insertó el vector pET28a+. Para esto, se tomaron 5 µL del vector pET28a+ con el inserto de alfa sinucleína, y 400 µL de bacteria competente, se incubó 30 minutos en hielo y luego se sometió a un shock térmico a 42°C por 30 minutos. Inmediatamente, se dejó en hielo a 4°C por 10 minutos. Posteriormente, se traspasó a 1,5 mL de medio LB con 30 µg/mL de kanamicina a un tubo Falcon de 15 mL y se incubó 1 hora a 37°C a 200 rpm. Subsiguientemente se pasó a un tubo Eppendorf para centrifugar 5 minutos a 2.500 rpm en centrífuga mini-spin, se recuperó el pellet y se resuspendió en 200 µL de sobrenadante. Finalmente se sembró por agotamiento de inóculo en placa de Petri con medio LB y agar nutritivo con kanamicina 30 µg/mL. Se dejó en la estufa a 37°C durante toda la noche. Al día siguiente se seleccionaron colonias (clones) al azar para su posterior inducción.

4.2.2 Cultivo bacteriano

Posterior a la transformación química bacteriana, se seleccionaron al menos 4 colonias, las cuales se traspasaron a un tubo Falcon de 50 mL con 5 mL de medio LB y kanamicina 30 µg/mL, y se incubaron a 37°C a 200 rpm durante 16 a 18 horas en agitación.

Al día siguiente, se hizo un cambio de medio en un tubo Falcon de 50 mL con 4,5 mL de LB y kanamicina 30 µg/mL, agregando 500 µL de cultivo inicial, para dejar un volumen final de 5 mL. Se incubó durante 1 hora a 37°C a 200 rpm en agitación y posteriormente se midió la densidad óptica (DO) cada 20-30 minutos hasta que alcanzó la DO ideal de 0,4-0,6 donde las bacterias aún estuvieran en fase exponencial de crecimiento, colocando en un pocillo de microplaca 200 µL del cultivo, contrastando con otro pocillo con LB como blanco, y se midió a 600 nm en fluorímetro.

Luego de alcanzar la DO, se guardó 1 mL de bacteria no inducida como control negativo, y 1 mL como stock en glicerol al 85% en proporción 1:5. El resto fue inducido con IPTG a 1 mM, e incubado durante 3 horas a 37°C a 200 rpm en agitación, y luego se centrifugó 5 minutos a 12.500 rpm. Se descartó el sobrenadante y el pellet obtenido se resuspendió en 1 mL de buffer Na_2HPO_4 25 mM, se agregó PMSF a 2 mM, y se sometió a ciclos de sonicado a 37°C y golpes de frío (-80°C), para finalmente centrifugar 5 minutos a 12.500 rpm, y recuperar solo el sobrenadante.

Se realizó una electroforesis con los sobrenadantes obtenidos para seleccionar el clon que produce más proteína, y repetir el cultivo en un volumen mayor. Se utilizaron filtros MiniSart con poros de 0,2 µm para los sobrenadantes obtenidos y así obtener una proteína más limpia, la cual fue almacenada a -80°C.

4.2.3 Purificación

Se utilizaron dos columnas cromatográficas: columna ProPac Imac 10 para HPLC y columna manual Pro-Imac, basadas en la técnica de afinidad a metales[46].

Para la columna ProPac Imac 10, en el HPLC, se utilizó un gradiente de concentración para la purificación, el cual inició con un 100% de buffer A, con 10 mM de imidazol, 500 mM de NaCl y 20 mM de Na_2HPO_4 a pH 7,4, que ambientó y estabilizó la columna, y terminó a los 40 minutos con 100% de buffer B, que contiene 120 mM de imidazol, 500 mM de NaCl y 20 mM de Na_2HPO_4 a pH 7,4, el cual eluyó la proteína. Ambas soluciones fueron filtradas y se verificó que no estuvieran contaminadas previo a su uso.

Se programó el equipo con el gradiente y se tomaron 200 µL de sobrenadante almacenado a -80°C, ya descongelado a 4°C, y se inyectaron mediante jeringa Microliter™ en el lugar de carga del HPLC. Se recuperaron las distintas fracciones del eluído según cada peak evidenciado en el cromatograma del HPLC, por medio del recolector Fraction Collector. Estos se almacenaron a 4°C para posterior concentración y electroforesis.

Para la columna manual, se utilizó una solución de unión entre la resina y la proteína, con 10 mM de imidazol, 500 mM de NaCl y 20 mM de Na_2HPO_4 a pH 7,4; una solución de lavado con 15 mM de imidazol, 500 mM de NaCl y 20 mM de Na_2HPO_4 a pH 7,4, y soluciones de elución con distintas concentraciones, 20

mM, 40 mM, 80 mM y 120 mM de imidazol: con 500 mM de NaCl y 20 mM de Na_2HPO_4 a pH 7,4.

Se incubaron 6 mL de sobrenadante con 12 mL de solución de unión y la resina de la columna durante 30 minutos a 70 rpm en agitador. Se eluyó y recuperó la solución, se adicionó la solución de lavado e incubó 30 minutos, se eluyó y recuperó la solución, y finalmente se adicionaron 12 mL de las soluciones de elución, se incubaron por 5 minutos, se eliminaron las primeras 6 gotas, y se recuperaron los eluídos en tubos Falcon de 15 mL, los cuales fueron concentrados para una posterior electroforesis y así determinar la pureza de alfa sinucleína.

4.2.4 Concentración proteica

Se utilizaron tubos Amicon para realizar un intercambio de buffer y a la vez concentrar la proteína mediante la adición en estos tubos de solución purificada con buffer Na_2HPO_4 25 mM. Se centrifugó a 4°C, a 3.500 rpm por 15 minutos en centrífuga Hettich ® Universal 320R. Se determinó la concentración en base a la fluorescencia intrínseca del aminoácido tirosina presente en la estructura de alfa sinucleína[47], cargando en una microplaca 200 µL de proteína y leyendo a emisión 275 y excitación 310 nm en fluorímetro Sinergy H1. Se utilizó la fórmula de regresión lineal de curva de albúmina realizada previamente, donde "y" es fluorescencia emitida por el equipo, mientras que "x" son los µg que presenta la muestra. Para llevarlo a concentración, se divide por peso molecular de alfa sinucleína que es 14.500 Da.

Se alicuotó 1 mL a 1,5 mL de proteína en tubos Eppendorf en concentraciones de 30 µM y se almacenaron a -80°C.

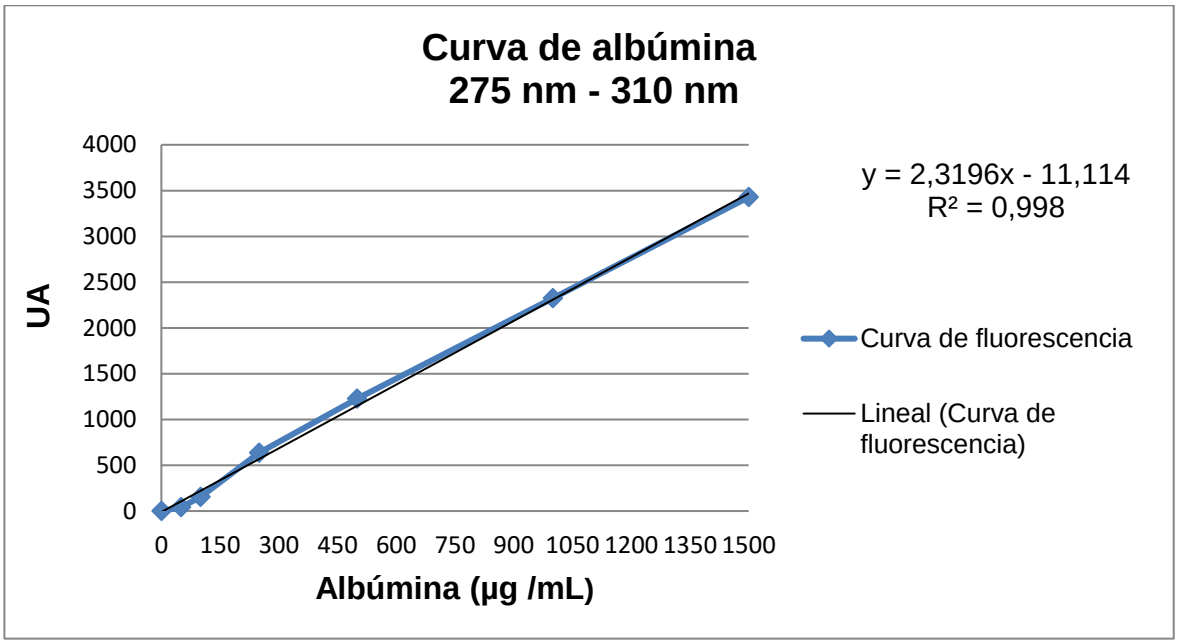


FIGURA 4.1*: Curva de calibración con estándar de albúmina 3 mg/dL. UA: unidades arbitrarias de fluorescencia.*

4.2.5 Electroforesis SDS-PAGE

La electroforesis tiene como objetivo determinar si las bacterias fueron inducidas correctamente, es decir, si hubo producción de monómeros de alfa sinucleína, y además seleccionar el clon más productivo, al observarse una banda de mayor densidad. Se realizaron geles de poliacrilamida al 15%, cuyas cantidades son descritas en Tabla 4.1.

TABLA 4.1*: Cantidades para geles de acrilamida al 15%.*

Componentes	Gel separador (mL)	Gel concentrador (mL)
30% acrilamida / 0,8% bis-acrilamida	7,50	0,650
4x Tris-HCl / SDS pH 8,8	3,75	-
4x Tris-HCl / SDS pH 6,8	-	1,250
H_2O	3,75	3,050
10% Persulfato de amonio	0,05	0,025
TEMED	0,01	0,005

4.2.6 Corrida electroforética

Las muestras fueron tratadas antes de ser cargadas en el gel. En tubo Eppendorf de 1,5 mL, se tomaron 20 µL de la muestra y se le adicionaron 5 µL de mezcla. Fue preparada a partir de 900 µL de 4x Laemmli Sample Buffer y 100 µL de β-mercaptoetanol. Se incubó en baño termorregulado seco a 95°C por 5 minutos y se centrifugó a 1.000 rpm por 1 minuto.

Se cargó en todos los geles 3 µL de marcador de peso molecular, y el volumen de las demás muestras fue dependiente de sus concentraciones,

teniendo como estándar haber cargado 15 ug/mL mínimo. Una vez cargado el marcador, control negativo y/o positivo y las muestras correspondientes, se corrieron a 110 mV por 2 horas.

Al finalizar la corrida, los geles fueron depositados en un pocillo plástico con una solución de fijación consistente en 40% de etanol, 10% de ácido acético y 50% de agua destilada, e incubados a 22°C a 50 rpm por 30 minutos. Luego, se retiró con agua destilada esta solución y se utilizó la solución de trabajo de azul de Coomassie (80% solución stock de azul de Coomassie y 20% metanol) para la tinción, dejando reposar durante toda la noche, a 50 rpm a 22°C en agitación.

Al día siguiente, se quitó el exceso de solución de tinción con una solución de lavado consistente en 65% de agua destilada, 15% de ácido acético y 20% de metanol, para la visualización de bandas.

4.2.7 Ensayos de agregación

Se realizaron ensayos de agregación para evaluar la producción de hoja β *in vitro* durante la agregación del monómero y su inhibición en los ensayos con moléculas naturales, utilizando Tioflavina T (ThT) como indicador de agregación[48, 49].

Para la cinética de agregación, se cargaron en microplaca 100 µL de Na_2HPO_4 25 mM como blanco y en duplicado 100 µL de proteína purificada en concentración 30 µM. En los pocillos que bordeaban la placa se cargaron 150 µL

de agua destilada. Se dejó en el equipo Thermo shaker a 26°C a 500 rpm durante 0, 6, 15, 24 y 48 horas.

Se agregaron 100 µL de ThT a los pocillos con proteína 1 hora antes de finalizar los tiempos establecidos, y se dejó incubando hasta cumplir los tiempos en el equipo Thermo shaker a 26°C a 500 rpm, para luego medir la fluorescencia a excitación 440 nm y emisión a 485 nm.

4.2.8 Ensayos de inhibición con moléculas naturales

Para los ensayos con moléculas naturales se mantuvo la preparación de la placa y las condiciones, con la diferencia en que a las muestras de alfa sinucleína a 30 µM se les agregaron 1 µL (100 mM) de concentración de moléculas naturales. Se incubaron durante 48 horas, y 1 hora antes de cumplido el tiempo establecido se agregaron 100 uL de ThT, para finalmente medir la fluorescencia a excitación 440 nm y emisión 485 nm.

4.2.9 Dot blot

Técnica realizada para determinar la presencia de oligómeros en muestras de alfa sinucleína agregada, en base al uso de anticuerpos específicos. Para esto, se cargó 1 µL de muestra de 48 horas de alfa sinucleína y una muestra de

48 horas tratada con la molécula natural en la membrana de nitrocelulosa previamente ambientada con buffer TBS 1x. Se dejó reposar la muestra en la membrana por 30 minutos, se añadió solución de bloqueo y se incubó en agitación (20 rpm) por 1 hora. Se hicieron 3 lavados de 10 minutos con TTBS con agitación a 80 rpm. Terminado los lavados se incubó el anticuerpo primario (AsyO5) diluido 1:2.000 en solución de bloqueo durante 1 hora a 20 rpm. Se repitieron los 3 lavados con TTBS, y se incubó la membrana con anticuerpo secundario diluido 1:2.000 en solución de bloqueo por 1 hora en agitación a 20 rpm. Se repitieron nuevamente los lavados. Finalmente, para el revelado se colocó la membrana en una funda plástica y adicionó el sustrato quimioluminiscente ECL, se dejó interactuar 3-5 minutos para luego exponer en film en el cassette por 3 minutos, y luego se reveló este film en un cuarto oscuro con soluciones de revelado y fijación[50].

4.3 Análisis estadístico

Para el análisis de los datos, se utilizó el software GraphPad Prism 6.0. Los datos fueron analizados utilizando la media ± SEM. Se realizaron análisis ANOVA y t-student, el grado de significancia fue de $p < 0,05$.

4.4 Eliminación de residuos

El laboratorio mantuvo basureros rotulados para cada tipo de desecho, con bolsas amarillas para el caso de material contaminado y desechos especiales, además de bolsas negras para la basura común. Para la eliminación de geles de poliacrilamida y sustancias tóxicas, se utilizaron bidones rotulados, los cuales posteriormente fueron retirados por una compañía externa para su eliminación.

Capítulo 5: Resultados

5.1 Alfa sinucleína recombinante

Se realizó una transformación química con la cepa *E. coli* BL21 (DE3) y el vector pET 28a+ para la producción de alfa sinucleína recombinante. Luego, se realizaron cultivos para inducir la bacteria mediante IPTG para aumentar la producción proteica. Se realizó una electroforesis SDS-PAGE al 15% de acrilamida-bisacrilamida, para determinar cuál clon generó más proteína, y así elegir el clon idóneo para realizar el cultivo. Se comparó el sobrenadante obtenido, marcado como control positivo, con un control negativo obtenido previo a la adición de IPTG. La Figura 5.1 (A) y (B) muestra los geles de electroforesis, en los que se puede comparar el tamaño de las bandas en los 14 kDa, y demostrando que el clon 5 fue el que generó una mayor cantidad de proteína.

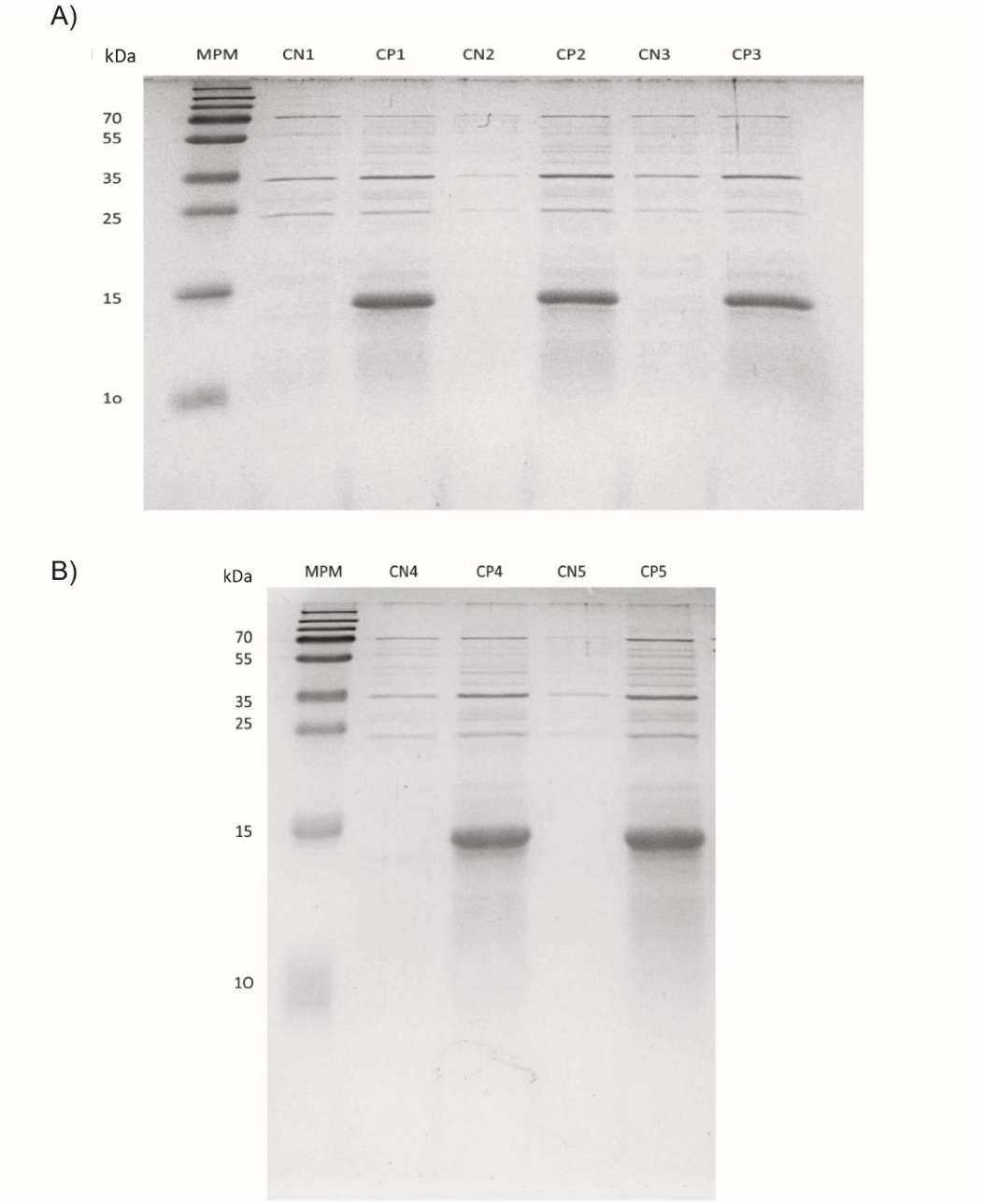


FIGURA 5.1: *Electroforesis SDS-PAGE 15% acrilamida-bisacrilamida. Gel para verificar la expresión de alfa sinucleína recombinante. A) Clones 1-3. B) Clones 4 y 5. MPM: marcador de peso molecular, CN: control negativo CP: control positivo.*

Se realizó un cultivo de mayor volumen del clon 5 para obtener una gran cantidad de sobrenadante con alfa sinucleína, que fue purificado y utilizado para ensayos posteriores. Se comprobó su correcta inducción mediante electroforesis indicada en Figura 5.2. La banda de 14 kD que corresponde a alfa sinucleína, demostrando que el clon está produciendo la proteína recombinante.

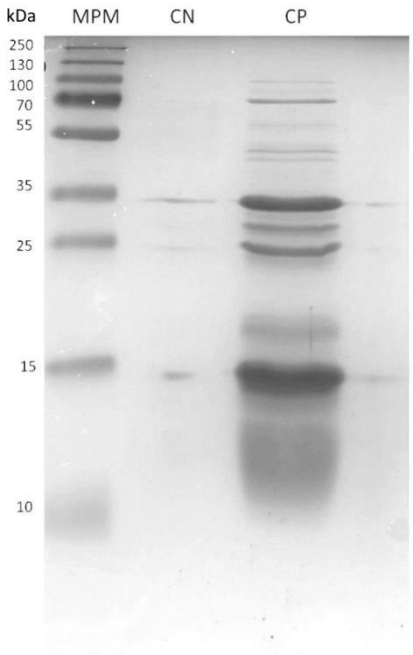


FIGURA 5.2: *Electroforesis SDS-PAGE 15% acrilamida-bisacrilamida. MPM: marcador de peso molecular, CN: control negativo, CP: control positivo.*

5.2 Purificación de alfa sinucleína

Posterior a la producción de alfa sinucleína es necesario extraer la proteína por medio de ciclos de sonicado y congelado para obtener el sobrenadante para su purificación con las columnas ProPac Imac 10 y Pro-Imac.

En la columna ProPac Imac, la purificación se llevó a cabo a través de un gradiente no isocrático generado por un buffer A y B que mantienen distintas concentraciones de imidazol, y se ejecutó el método de HPLC. Se inyectaron 500 µL en el loop del equipo cada vez, donde el gradiente generado duró 40 minutos y la proteína monomérica fue eluida por medio del buffer B, siendo recolectada mediante el Fraction Collector en tubos Khan de 10 mL, lo que se muestra en la Figura 5.3 según el cromatograma entregado por el equipo. Luego, el eluido se concentró en tubos Amicon.

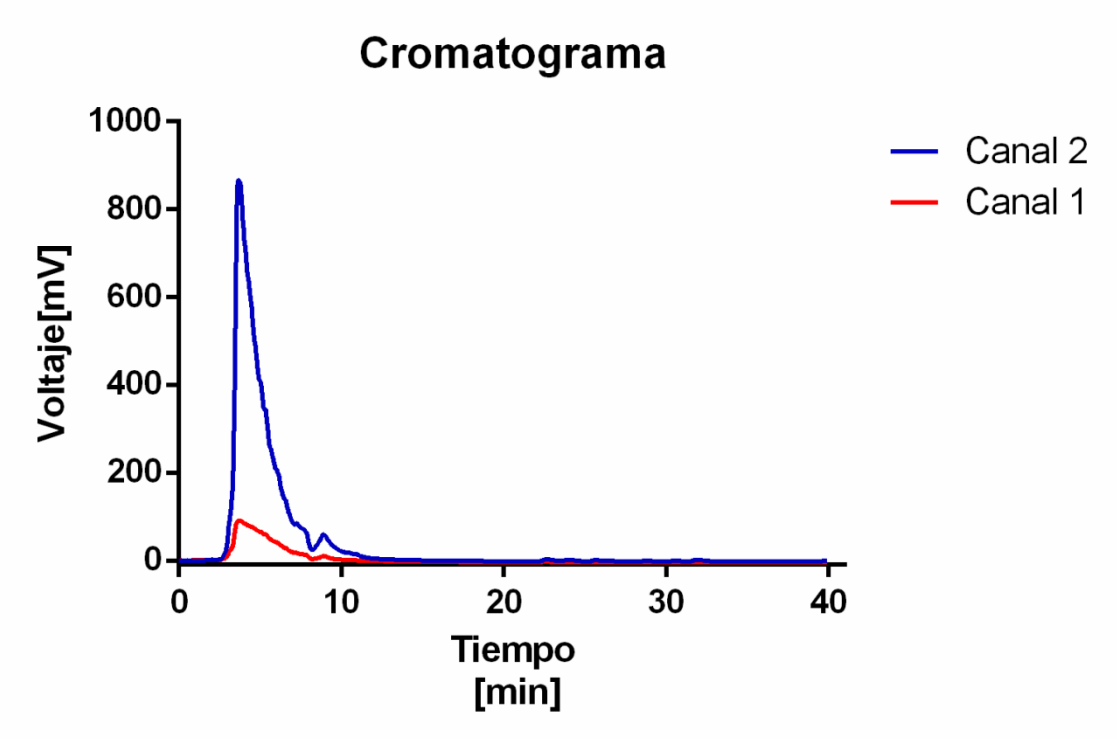


FIGURA 5.3: *Cromatograma HPLC. Canal 1: 215 nm monitoreo enlace peptídico. Canal 2: 276 nm, monitoreo de la tirosina de la proteína*.

Se realizó una electroforesis (Figura 5.4) para determinar la pureza de la proteína. En esta electroforesis, se observan bandas en los 14 kDa, correspondientes a alfa sinucleína monomérica, y se ven también algunas bandas en los 35 y 100 kDa, indicando que con el método de purificación utilizado en HPLC efectivamente se recupera el monómero de la proteína, aunque con ciertas impurezas.

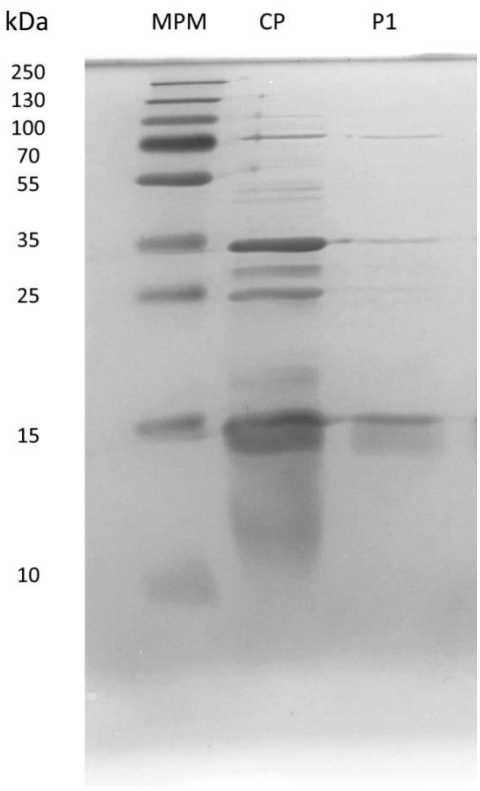


FIGURA 5.4*: Electroforesis SDS-PAGE 15% acrilamida-bisacrilamida. Purificación mediante HPLC por columna ProPac Imac10. MPM: marcador de peso molecular, CP: control positivo, P1: peak HPLC.*

Para columna manual, la purificación se llevó a cabo mediante un gradiente de concentración de imidazol aplicado de forma manual en la columna, descrita previamente. Se recolectaron 12 mL de cada solución en tubos Falcon de 15 mL, los cuales fueron concentrados para luego realizar una electroforesis y determinar si se logró obtener el monómero de alfa sinucleína y además determinar la pureza de la misma. En el gel, se observa la presencia de bandas de 35 y 70 kDa en los buffers de unión (10 mM de imidazol) y de lavado (15 mM de imidazol), pero a medida que la concentración de imidazol aumenta, estas bandas se van difuminando y finalmente a una mayor concentración de imidazol

(80 y 120 mM), se muestra la banda concentrada en los 14 kDa, demostrando que el monómero de alfa sinucleína obtenida con este método es más puro (Figura 5.5).

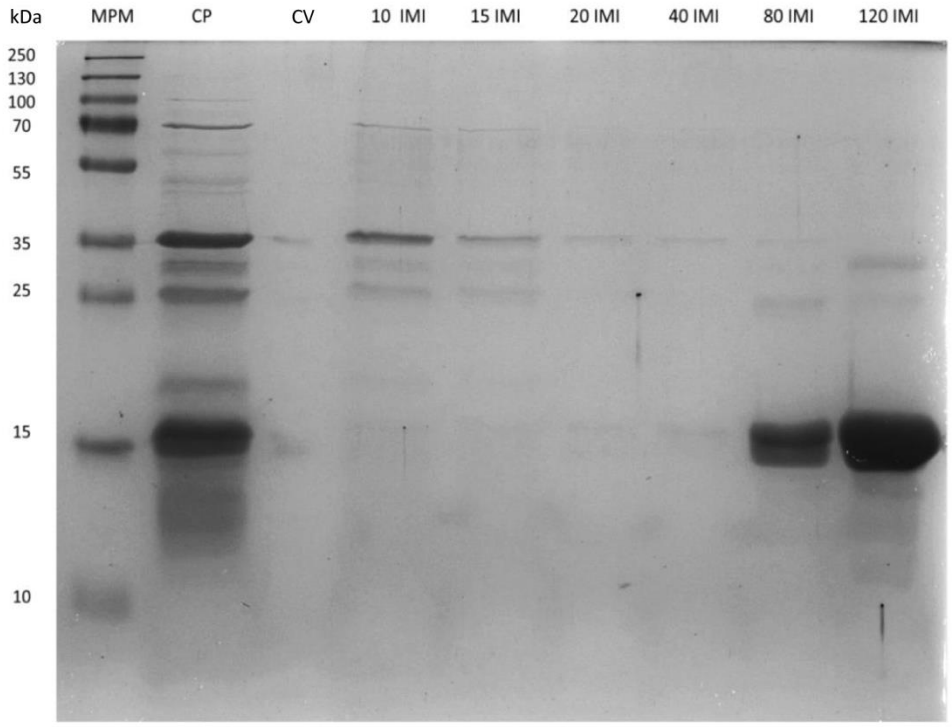


FIGURA 5.5: *Electroforesis SDS-PAGE 15% acrilamida-bisacrilamida con los distintos gradientes de concentración de imidazol, posterior a la concentración proteica. Se observa la banda de 14 kDa en los carriles de 80 y 120 mM de imidazol. MPM: marcador de peso molecular, CP: control positivo, CV: carril vacío, 10, 15, 20, 40, 80 y 120 IMI: concentraciones de imidazol.*

Utilizando el mismo sobrenadante de alfa sinucleína, se comparó la pureza de los métodos con columna ProPac Imac 10 versus la columna manual, pasando

7 mL de proteína por ambas columnas, se concentraron los volúmenes obtenidos y se realizaron electroforesis SDS-PAGE al 15%.

Al utilizar la columna ProPac Imac 10 se presentan interferentes, es decir, bandas de alto peso molecular, además de la de 14 kDa que correspondería al monómero puro como se observa en la Figura 5.4. En cambio, la proteína obtenida con la purificación mediante columna manual es más pura, evidenciándose en los carriles 80 IMI y 120 IMI.

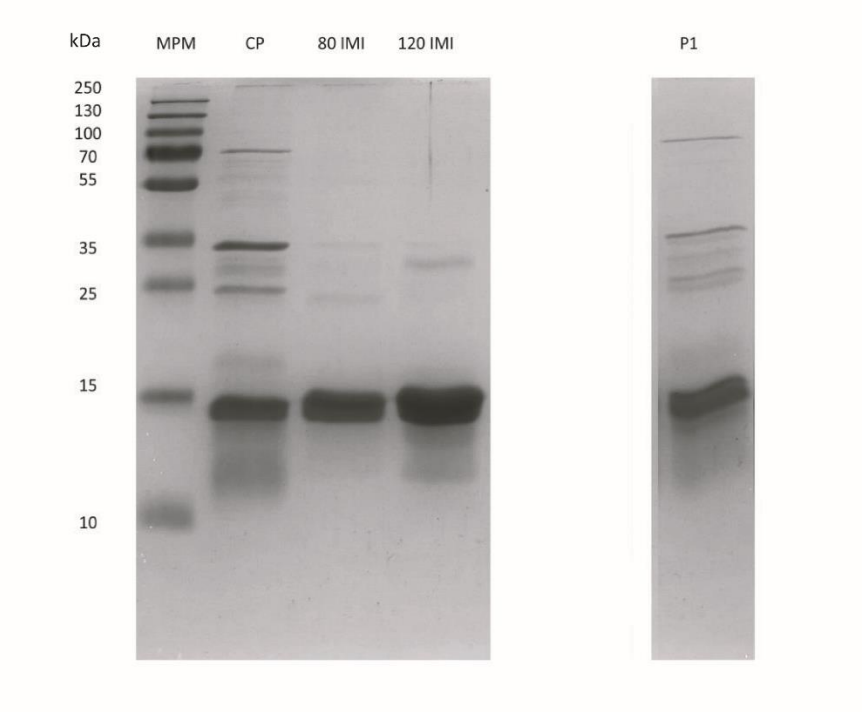


FIGURA 5.6*: Electroforesis SDS-PAGE 15% acrilamida-bisacrilamida. Comparación entre métodos Pro-Imac y ProPac Imac 10. MPM: marcador de peso molecular, CP: control positivo, 80 y 120 IMI: concentraciones de imidazol para recuperar proteína en columna manual.*

Finalmente, se realizó una purificación mixta de alfa sinucleína, en la que se sometió el sobrenadante a la purificación por HPLC con la columna ProPac Imac 10, y luego se pasó por la columna manual. Posteriormente se concentró lo obtenido y se realizó una electroforesis SDS-PAGE al 15% acrilamida-bisacrilamida, lo que mostró que hubo una diminución del rendimiento al mezclar ambos métodos, de igual forma se obtuvo monómero puro de alfa sinucleína.

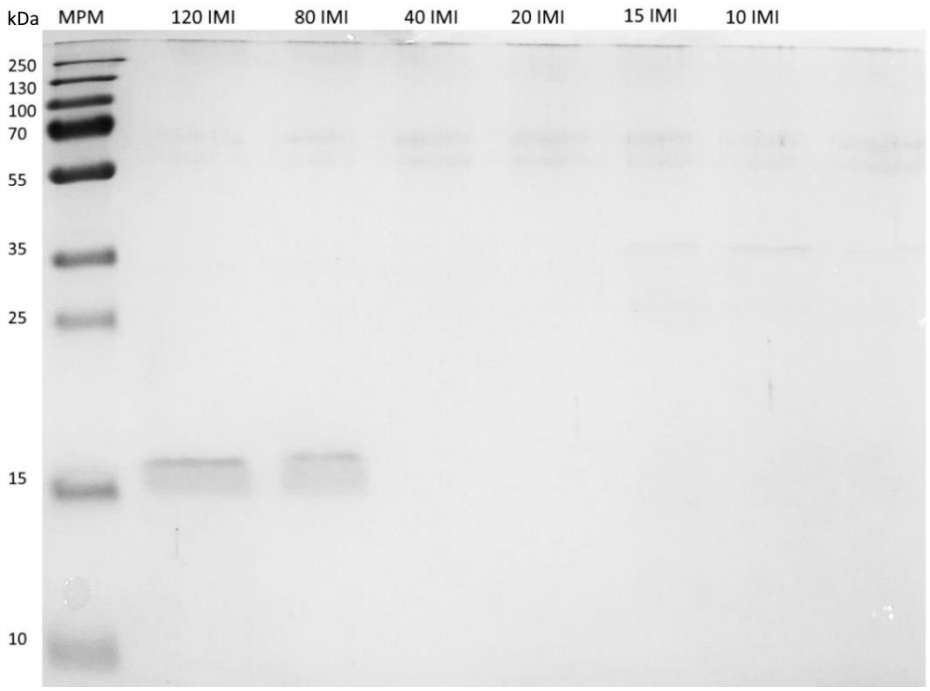


FIGURA 5.7*: Electroforesis SDS-PAGE 15% acrilamida-bisacrilamida. Método mixto: ProPac Imac 10 y Pro-Imac. En los carriles 80 y 120 imidazol se observa la obtención de alfa sinucleína. MPM: marcador de peso molecular, 10, 15, 20, 40, 80, 120 IMI: concentraciones de imidazol.*

5.3 Cinética de agregación de alfa sinucleína

Se realizó una curva de agregación de alfa sinucleína para determinar la cantidad de horas necesarias para generar oligómeros, para posteriores ensayos con moléculas naturales. Para esto se realizaron cinéticas de agregación controlando a las 0, 6, 15, 24 y 48 horas.

Posterior a la cinética de agregación, se realizó un gráfico con las unidades de fluorescencia recopiladas de la medición con ThT, el cual indicó que a medida que van pasando las horas, las unidades de fluorescencia van aumentando, indicando la cantidad de hoja β en las muestras. Para la cinética de agregación, las muestras se realizaron en duplicado, por lo que en el gráfico se utilizó el promedio de cada medición para definir la cantidad de hoja β.

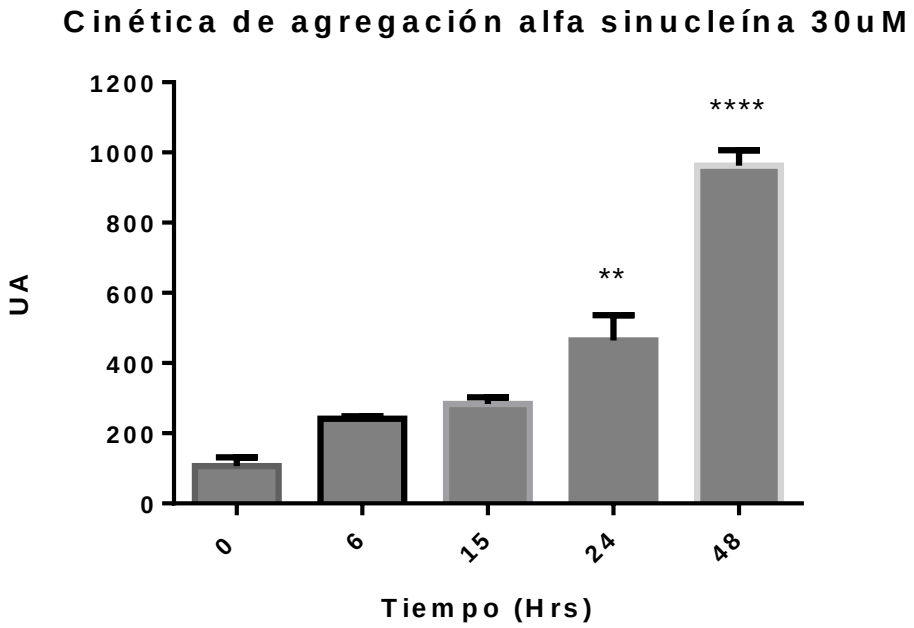


FIGURA 5.8: *Cinética de agregación. Se muestra el aumento de las unidades de fluorescencia indicando el aumento en el contenido de hoja β, según la detección por ThT. Los datos corresponden al promedio de fluorescencias del ensayo en duplicado ± SEM de la lectura de fluorescencia de cada tiempo establecido. Se utiliza análisis Anova aceptando un p <0,05, siendo **: p<0,005 y ****: p<0,00005 UA: unidades arbitrarias de fluorescencia.*

5.4 Inhibición de moléculas naturales

Se probó la acción de inhibición de extractos naturales frente a alfa sinucleína en ensayos de agregación *in vitro*, utilizando alfa sinucleína a 30 µM. Se agregaron extractos naturales a concentración 100 mM, y se incubó por 24 horas. Luego se midió ThT cumplido el tiempo, para detectar presencia de hoja

β, comparando con un control de agregación correspondiente a alfa sinucleína a 30 µM sin molécula natural incubada en las mismas condiciones a 24 horas.

Se graficaron las mediciones en duplicado de ThT en unidades de fluorescencia obtenidas del control de agregación y de alfa sinucleína sometidas a moléculas naturales, mostradas en la Figura 5.9, donde se ve que en las moléculas A2 y A4 disminuyen las unidades de fluorescencia. Además, se graficó el porcentaje de agregación obtenido de cada molécula junto a la proteína comparado con el control de agregación en Figura 5.10 y se tabularon los porcentajes de agregación e inhibición obtenidos en Tabla 5.1. En ambas figuras, se evidencia que la molécula A2 muestra menor valor de agregación entre las 4 moléculas, y por consiguiente, mayor porcentaje de inhibición, alcanzando un 62,05 % respecto al control de agregación. La muestra con la molécula A7 superó el 100% de agregación, por lo cual fue descartada de los ensayos posteriores.

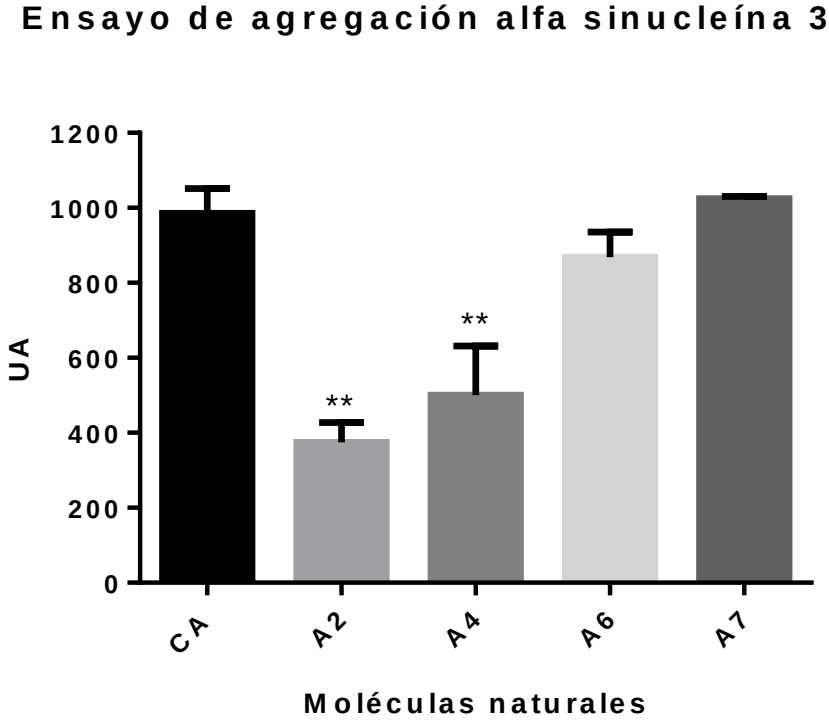


FIGURA 5.9*: Ensayo de agregación. Alfa sinucleína tratada con distintas moléculas naturales, comparadas con un control de agregación. Los datos corresponden al promedio de fluorescencias del ensayo en duplicado ± SEM de la lectura de fluorescencia de cada molécula, comparados con un control de agregación. Se utiliza análisis Anova con p <0,05, donde ** es p<0,005. UA: unidades arbitrarias de fluorescencia, CA: control de agregación, A: molécula natural.*

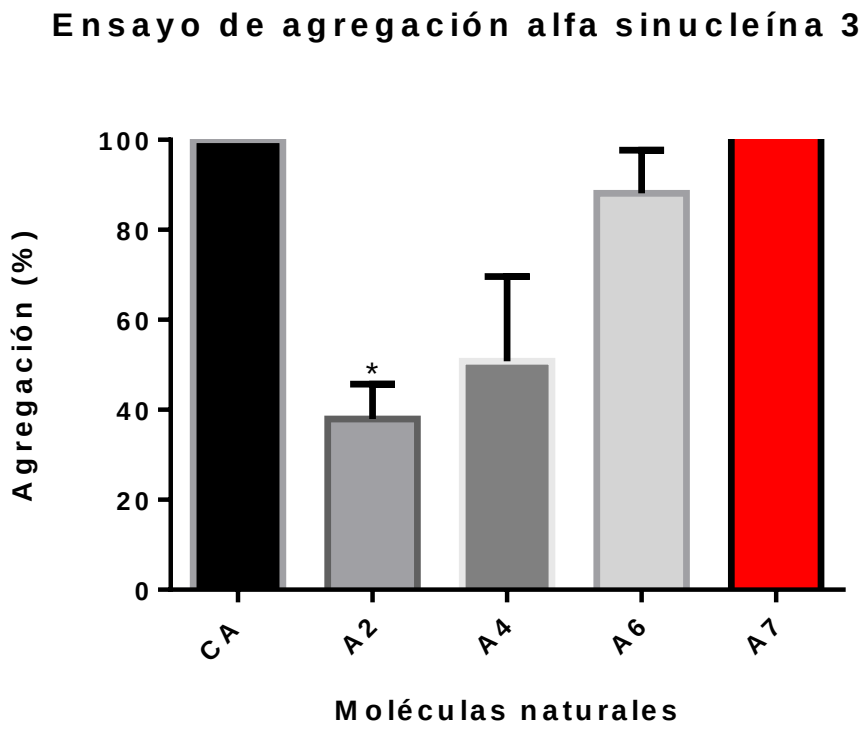


FIGURA 5.10*: Porcentajes de ensayo de agregación. Se muestra la disminución en la agregación de alfa sinucleína tratada. Los datos corresponden al promedio de fluorescencias del ensayo en duplicado ± SEM de la lectura de fluorescencia de cada molécula, comparado con un control de agregación. Se utiliza análisis Anova con p <0,05, representado con *. La molécula A7 está por sobre el límite de 100%. UA: unidades arbitrarias de fluorescencia, CA: control de agregación, A: molécula natural.*

TABLA 5.1: *Porcentajes de agregación e inhibición de moléculas naturales. Cálculo de porcentajes en base a lo obtenido en el ensayo de agregación de la Figura 5.10.*

Molécula natural	Agregación (%)	Inhibición (%)
A2	37,95	62,05
A4	50,79	49,21
A6	88,09	11,91
A7	103,97	-

5.5 Dot blot

Posterior a la cinética de agregación, se realizó ensayo dot blot con un anticuerpo contra oligómeros de alfa sinucleína, para determinar si la disminución de las unidades arbitrarias de fluorescencia correspondería al remodelamiento de los oligómeros por parte de la molécula natural escogida de la Figura 5.10. Para esto, se probó alfa sinucleína a 48 horas sin la molécula natural, considerada como control de agregación, junto a una muestra de 48 horas con molécula A2 como control de inhibición. Se utilizó el anticuerpo AsyO5, capaz de reconocer la porción específica Gly 111- Tyr 125 del oligómero de alfa sinucleína. Posteriormente, se realizó un gráfico mediante los datos obtenidos de 2 ensayos diferentes en el programa ImageJ, para comparar las intensidades de los puntos obtenidos en el dot blot.

Los resultados del dot blot indican una disminución en la intensidad de los puntos obtenidos, indicado en la Figura 5.11 y al ser cuantificada en ImageJ se

obtiene un 81,4% de intensidad en la muestra de 48 horas sin A2, comparada con un 18,6% de intensidad en la muestra de 48 horas con A2.

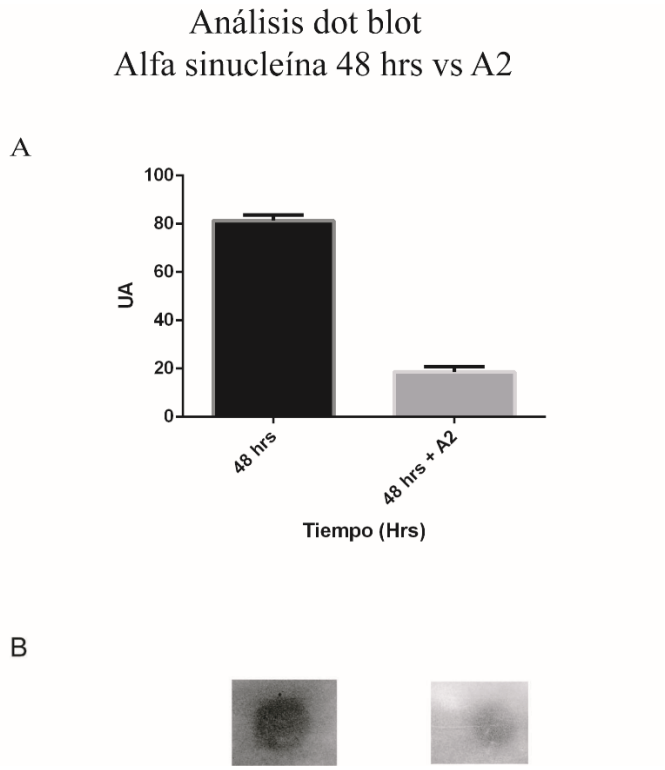


FIGURA 5.11: *Análisis dot blot de alfa sinucleína de 48 horas. A) Gráfico de intensidad del punto según análisis realizado con ImageJ. Los datos corresponden al promedio ± SEM de las figuras en duplicado. Se utiliza análisis t-student ($p<0,05$). B) Imágenes de dot blot correspondientes a 48 horas sin A2 y 48 horas con A2, de izquierda a derecha.*

Capítulo 6: Discusión

6.1 Producción de alfa sinucleína recombinante

Para la producción de alfa sinucleína recombinante, se utilizó *E. coli*, bacteria gram (-) utilizada ampliamente como modelo para producción de proteína recombinante, debido a su crecimiento exponencial a los 20 minutos utilizando un medio de cultivo rico en glucosa, como es el medio LB. Este crecimiento puede ser medido en base a DO a 600 nm, método en el que está descrito que una DO entre 0,3 y 1 indica crecimiento bacteriano exponencial[51]. En el modelo utilizado en esta investigación, *E.coli* BL21 (DE3), se determinó la medición de DO cada 20 minutos hasta alcanzar una DO entre 0,4 y 0,6, esto para inducir la bacteria, ya que en esta tiempo aún se encuentra en pleno crecimiento exponencial, evitando así la producción de metabolitos tóxicos bacterianos[52].

Este modelo además presenta en su genotipo lon y ompT, las cuales codifican para la ausencia de proteasas intra y extracelulares, respectivamente, de esta forma, se impide la posible degradación de alfa sinucleína por parte de la bacteria, al momento de su producción. Además, presenta un profago λ que permite la formación de T7 ARN polimerasa[53, 54], el cual permite la expresión de proteína recombinante unida a una cola de 6 histidinas.

pET-28a(+) sequence landmarks	
T7 promoter	370-386
T7 transcription start	369
His•Tag coding sequence	270-287
T7•Tag coding sequence	207-239
Multiple cloning sites	
(*Bam*H I - *Xho* I)	158-203
His•Tag coding sequence	140-157
T7 terminator	26-72
lacI coding sequence	773-1852
pBR322 origin	3286
Kan coding sequence	3995-4807
f1 origin	4903-5358

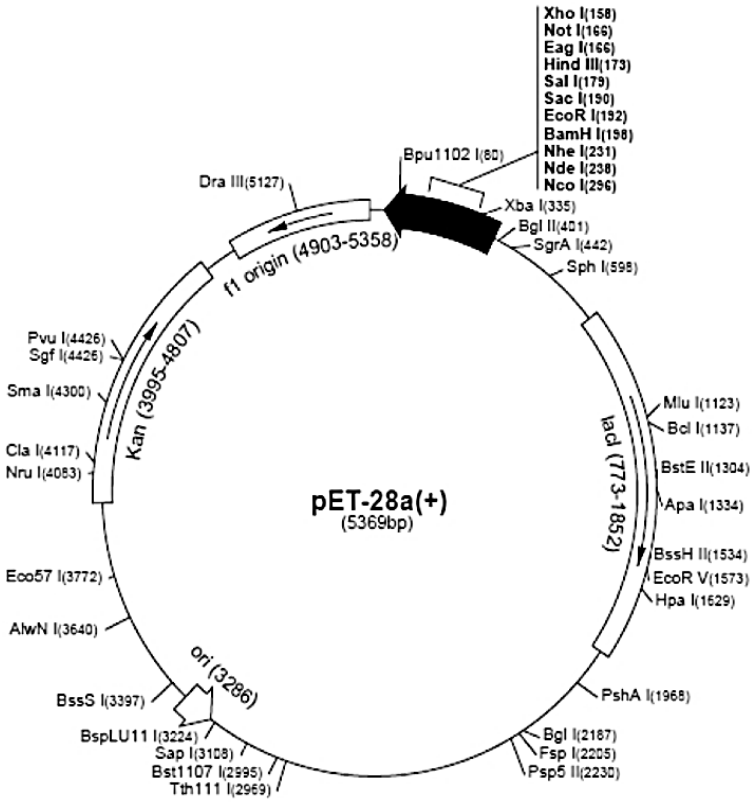


FIGURA 6.1: *Mapa del vector pET 28a+, utilizado para la producción de alfa sinucleína*[55].

El vector utilizado fue el vector pET28a+, el cual presenta en su genoma, además de la secuencia para el promotor T7, una región lac, una secuencia de resistencia a la kanamicina y una secuencia que codifica para una cola de poli-histidina. La región lac es reconocida por el promotor T7, el cual será reconocido por la T7 RNA polimerasa, de tal manera que, al agregar un inductor, como en este caso IPTG, se inicia la transcripción génica y la producción de alfa sinucleína recombinante[55, 56]. Finalmente, se aprovechó la resistencia a la kanamicina dada por el vector, utilizando un medio de cultivo con el antibiótico, para descartar, entre bacterias contaminantes y la bacteria con el inserto de alfa sinucleína, la cual se busca purificar posteriormente. Esto se observa en la Figura 5.1 en un

gel de electroforesis SDS-PAGE 15% acrilamida-bisacrilamida, que muestra una banda bajo los 15 kDa según el marcador de peso molecular, lo que corresponde a la alfa sinucleína, ya que su peso molecular es de 14,5 kDa.

6.2 Purificación de alfa sinucleína

Posterior a la producción de alfa sinucleína recombinante, se realizó su purificación mediante cromatografía inmovilizada por afinidad de metales (Imac). Este tipo de cromatografía se basa en la interacción de metales de transición como Co^{+2}, Ni^{+2}, Cu^{+2} o Zn^{+2} adheridos en una fase estacionaria, y aminoácidos de la proteína o péptido en solución. La histidina es un aminoácido positivo considerado como el más idóneo para esta interacción, capaz de realizar enlaces coordinados actuando como un dador de electrones a los metales de la fase estacionaria, permitiendo una purificación alrededor de un 90% de la proteína asociada[57, 58]. En el caso de la proteína recombinante a utilizar, el vector utilizado para su producción mantiene una secuencia para codificar una cola de poli-histidina en la posición 140-157 y 270-287[55], por lo tanto, la purificación de alfa sinucleína se realizó mediante la interacción entre los residuos de histidina de la proteína y el metal de la columna, que en este caso fue Co^{+2}.

En la columna de HPLC ProPac Imac 10, el Co^{+2} se encuentra en nanopartículas de 2-5 nm de diámetro, y estas interaccionarán con los residuos de histidina de la proteína[59, 60]. En tanto, la columna Pro-Imac utiliza una resina que viene cargada con Co^{+2}, y mediante soluciones de incubación y lavado se genera la interacción con la cola de histidina de alfa sinucleína[61, 62, 63].

Para lograr la elución de la proteína, se utilizan soluciones de elución, en las que se arrastren los distintos componentes del buffer en el que está contenida la proteína para que solo sea recuperada la proteína o péptido de interés. Existen dos tipos de gradientes que se pueden generar:

(i) Gradiente isocrático, en el que las concentraciones de la fase móvil no cambian durante todo el proceso de cromatografía, desde unión hasta elución.
(ii) Gradiente no isocrático, que se basa en generar distintas concentraciones de la fase móvil, para generar competencia por el ión de la resina entre el aminoácido de la proteína o el componente del buffer[64].

En este caso, se utilizó un gradiente no isocrático, para ambas columnas. Se utilizaron 500 mm de NaCl, para eliminar interacciones iónicas, que afecten la recuperación de la proteína, y el gradiente se generó con distintas concentraciones de imidazol, el cual es un análogo competitivo de la histidina, lo que permite la elución de alfa sinucleína mediante la competencia del imidazol y el residuo de histidina por el Co^{+2} de ambas columnas[65, 66].

En el caso de la columna de HPLC ProPac Imac 10, se realizó un gradiente de 2 concentraciones de imidazol: (A) 10 mM y (B) 150 mM, iniciando el método con la concentración más baja de imidazol para que la proteína pueda enlazarse con el metal de la columna hasta quedar completamente adherida. Aquí cualquier componente de la solución que contiene a la proteína no es capaz de unirse a la resina por no tener sitios de interacción con esta, siendo eluidos. A medida que incrementó la concentración de imidazol, mediante el cambio gradual de buffer A y buffer B descritos, la competencia por las uniones coordinadas entre el Co^{+2} aumentaron, de manera tal que, al llegar al paso del buffer con mayor

concentración de imidazol, la proteína fue desplazada y eluída para ser recuperada, lo que se observa en la Figura 5.3 donde se comienza a elevar el peak.

A pesar de obtener la proteína purificada, se decidió probar con otro método para purificar aún más el monómero. Por lo tanto, se decidió utilizar la columna manual. Se ocupó la concentración más baja de imidazol, 10 mM, como solución de incubación, para que la interacción entre la resina y proteína fuese de manera gradual, de manera que con las soluciones de mayor concentración se fuera recuperando la proteína purificada. Finalmente, se demuestra en la Figura 5.5 que, a mayor concentración de imidazol, específicamente a 80 mM de imidazol, ya es posible obtener el monómero de alfa sinucleína más puro que el obtenido mediante HPLC. Además, en la concentración de 120 mM de imidazol, en cuanto a la pureza del monómero, eluye mejor y en mayor cantidad el monómero de alfa sinucleína.

Por lo tanto, el método de la columna ProPac Imac del HPLC debiese modificarse para reproducir las condiciones de la columna manual y conseguir proteína lo más pura posible. Por otra parte, hay diferencias en el rendimiento, pues al colocar en ambas columnas 7 mL iniciales, la columna ProPac Imac obtuvo un volumen final concentrado de 3 mL de proteína, mientras que la columna manual obtuvo de 0,75 a 1 mL de volumen final de proteína concentrada.

Finalmente, para aprovechar el rendimiento obtenido por la columna ProPac Imac 10, se realizó una doble purificación, utilizando el eluído proveniente del HPLC concentrado, para posteriormente pasarlo por la columna manual, aludiendo a que esta última obtuvo una mejor calidad de monómero purificado de alfa sinucleína. Como se muestra en la Figura 5.7, la concentración de monómero obtenida fue considerablemente menor que en la columna manual,

pero fue capaz de conseguir solo el monómero puro de alfa sinucleína, sin la interferencia de bandas de mayor peso molecular. La poca presencia de proteína en el gel puede asociarse a todas las soluciones que se utilizaron en la columna ProPac Imac 10, junto con las soluciones de unión, lavado y elución de la columna manual, y posteriormente a una ambientación con Na_2HPO_4, lo que pudo haber sido diluida en el proceso.

6.3 Fluorescencia intrínseca como método de cuantificación de concentración

En investigaciones previas, se consideraba el método de medición de absorbancia como el ideal para determinar la concentración de alfa sinucleína. Este método consta de medir la emisión de la luz UV absorbida por aminoácidos aromáticos como tirosina, triptófano y fenilalanina. Cada aminoácido tiene su longitud de onda específica donde absorbe la luz, siendo para tirosina 274 nm, triptófano 280 nm y fenilalanina 257 nm[67]. La concentración se determina siguiendo la ley de Lambert-Beer: $A= \varepsilon \times l \times c$, siendo "A" el valor de absorbancia medida, "ε" es el coeficiente de extinción molar de la proteína, donde en alfa sinucleína corresponde a 5.600 $M^{-1}cm^{-1}$, "l" es el diámetro de la cubeta que generalmente corresponde a 1 cm, y "c" la concentración de la proteína que se desea determinar[67, 68, 69].

En el método utilizado previamente[70] se medía a 280 nm las tirosinas presentes en la muestra, contra un blanco de reactivo correspondiente a la solución en la que se ambientaba la proteína, la cual era buffer fosfato sódico

(PBS 1x). La concentración se determinaba reemplazando los valores en la fórmula de Lambert-Beer, utilizando como coeficiente de extinción para alfa sinucleína 5.600 $M^{-1}cm^{-1}$ y el valor de la concentración aumentaba en proporción a la cantidad de aromáticos presentes. En el caso de alfa sinucleína, este presenta 4 tirosinas en su estructura: tyr39, tyr125, tyr133, tyr136[71]. Durante el desarrollo de este proyecto, se notó que los valores de fluorescencia obtenidos en la medición del blanco eran muy altos con respecto a la muestra con proteína, lo que indicaría que el PBS 1x podría estar interfiriendo con la medición de la concentración. Se cambió el buffer de ambientación a Na_2HPO_4, y se buscó un nuevo método de medición, llegando a la cuantificación por fluorescencia.

Además de emitir absorbancia, los aminoácidos aromáticos pueden ser excitados con luz del rango UV, y pueden emitir esta fluorescencia a distintas longitudes de ondas, descritas en Tabla 6.1:

TABLA 6.1*: Tabla de valores de longitud de onda de excitación y emisión de aminoácidos aromáticos típicos[47].*

Aminoácido	**Longitud de onda de excitación**	**Longitud de onda de emisión**
Fenilalanina	260 nm	283 nm
Triptofano	285 nm	360 nm
Tirosina	275 nm	310 nm

La medición de la fluorescencia intrínseca de estos aminoácidos aromáticos se puede utilizar para determinar la concentración de la proteína[47], en base a una curva de calibración con muestras con concentraciones estándar diluidas en el mismo solvente en el cual está la proteína a medir posteriormente. En este caso, la curva de calibración se realizó con diferentes concentraciones de albúmina en Na_2HPO_4 a 25 mM, lo cual está indicado en la Figura 4.1. De esta forma, se cree que la determinación de concentración es más fidedigna, ya que no hay interferencia de los solventes en la medición, y se está utilizando la misma emisión de los aminoácidos presentes en alfa sinucleína para determinar su cantidad.

6.4 Agregación y remodelamiento de alfa sinucleína

Como fue descrito previamente, el elemento patológico principal de la EP son los cuerpos de Lewy, inclusiones citoplasmáticas compuestas de agregados de alfa sinucleína. Estudios refieren la agregación de esta proteína de forma dependiente a nucleación, en la que se requiere de un monómero para formar compuestos oligoméricos, dímeros, trímeros, hasta formar fibras[10]. Estos oligómeros, están compuestos de segmentos de lámina β presente entre los aminoácidos 37 a 95, involucrando en gran parte a la porción NAC de alfa sinucleína, formándose de manera paralela al eje axial de la proteína[4]. El estudio de estos elementos toma importancia ya que se ha reportado su capacidad de ejercer toxicidad en las células[72], causando el daño en las neuronas que conlleva a los síntomas de la enfermedad. Los tratamientos disponibles, hoy en día sólo se encargan de disminuir la sintomatología de los enfermos, y además traen efectos secundarios como náuseas, vómitos y delirios[39]. Por lo tanto, es importante investigar moléculas de tipo naturales que tengan por objetivo

terapéutico atacar a los oligómeros responsables por el deterioro de células dopaminérgicas y neuroinflamación.

En esta investigación, se hicieron cinéticas de agregación, ensayos que tienen como utilidad determinar la línea de tiempo de formación de oligómeros de alfa sinucleína, mediante la medición de ThT, capaz de determinar oligómeros presentes en la muestra a través de la detección de hoja β, aumentando las unidades de fluorescencia[73].

En reportes previos se indica que la agregación de alfa sinucleína responde a una curva en ascenso donde hay una fase de retraso, correspondiente a la nucleación del monómero, y que luego pasa a fase exponencial o de elongación, donde se van formando los oligómeros. El proceso de agregación puede verse afectado por diversos factores[28, 74], los cuales se estudiaron durante esta investigación para determinar los tiempos de agregación, en cuanto a la producción de oligómeros, datos útiles para ensayos posteriores. Dentro de los factores que afectan la agregación están:

(i) Concentración: La literatura indica que los ensayos de agregación se pueden utilizar concentraciones desde los 35 a 70 µM[74], siendo un proceso dependiente de la concentración de la proteína, donde a mayor cantidad de proteína es más rápida la oligomerización. Por lo tanto, se realizaron cinéticas a concentración 20 mM, 30 mM y 50 mM. Las cinéticas realizadas a 20 mM y 50 mM los resultados obtenidos no fueron concluyentes debido a que dieron valores dispersos, los cuales no mostraron una curva de agregación estable, marcando una curva en descenso. Esto se explica ya que a concentraciones bajas alfa sinucleína no es capaz de generar oligómeros, y a concentraciones altas es capaz de saturar el medio y disminuir la fase de retraso[75].

Sin embargo, la cinética realizada con 30 mM fue la única que mostró una curva en ascenso de la formación de agregados, como se evidencia en la Figura 5.6, estableciendo esta concentración como la ideal para los ensayos a realizar.

(ii) Temperatura: Se realizaron ensayos a 37°C para lograr una cinética ágil, además de mejorar las interacciones hidrofóbicas[76, 77], pero se notó que la curva descendía en esta temperatura, lo que podría significar el agotamiento del monómero de alfa sinucleína por una alta tasa de agregación, impidiendo determinar el momento donde hay un disparo en la agregación proteica. Se probó realizando ensayos a 25°C y estos permitieron indicar el aumento de unidades de fluorescencia de ThT, para determinar la presencia de oligómero, mostrando que entre las 24 y 48 horas hay un aumento significativo en la agregación.

(iii) Agitación: Estudios han indicado que el aumento de la agitación permite acelerar la cinética de agregación de alfa sinucleína, al propiciar la colisión de especies monoméricas para la formación de oligómeros. Se han descrito rangos entre 120 y 1000 rpm. Se decidió usar una agitación de 500 rpm para facilitar las interacciones hidrofóbicas en la proteína y lograr la formación de oligómeros[76].

Ya establecidas las condiciones de la cinética de agregación, se obtuvo una curva de agregación representada en la Figura 5.8, donde se observa el aumento de las unidades de fluorescencia a medida que van aumentando las horas de agregación. Tanto a 24 horas como a 48 horas hay un aumento de ThT, por ende, de hoja β, lo que significaría la presencia de oligómeros entre estos dos periodos de tiempo.

Las estructuras secundarias de alfa sinucleína se han estudiado los últimos años, determinándose que la proteína sufre un remodelamiento al agregarse, formando una estructura denominada “llave griega”, conformada por interacciones a lo largo de la hoja β de la proteína, junto con puentes de sal entre el ácido glutámico 46 y lisina 80 y uniones hidrofóbicas en valinas 49,77 y 82[78]. Este remodelamiento, sin embargo, no afecta las últimas tirosinas en la estructura proteica, y, por tanto, no afecta la medición de hoja β que pudieran estar presentes en los oligómeros de alfa sinucleína, manteniendo entonces medición de esta porción con ThT.

Posterior a la determinación de los tiempos de agregación de alfa sinucleína, se realizaron realizar ensayos de agregación con moléculas naturales utilizando muestras de 24 horas, puesto que a este tiempo se establecería la formación de oligómeros. En las Figuras 5.9 y 5.10, se observan los resultados obtenidos de un ensayo con moléculas naturales. En ambas, se puede ver una diferencia respecto al control de agregación de 24 horas de parte de la molécula A2, la cual es capaz de inhibir la agregación en un 62,05 % según la Tabla 5.1. Esto indicaría la disminución en la cantidad de hoja β en la muestra, lo que sería el primer indicio de la posible remodelación de alfa sinucleína.

Para comprobar la remodelación, se escogió la técnica dot blot. Esta técnica se basa en exponer la muestra a un anticuerpo contra alguna región específica (denominado anticuerpo primario), el que será reconocido por un anticuerpo secundario marcado con un fluoróforo, que suele ser una enzima, para aplicar un sustrato que permita revelar el resultado del ensayo[50, 79]. Esta técnica realiza un análisis cualitativo de las muestras, indicando ausencia o presencia de estructuras, y mediante el uso del programa ImageJ fue posible realizar un análisis cuantitativo del ensayo.

El dot blot fue realizado con el anticuerpo AsyO5, anticuerpo monoclonal que reconoce oligómeros de alfa sinucleína, mediante la interacción del anticuerpo con la porción Gly111-Tyr125[80]. Por lo tanto, se utilizaron dos muestras de 48 horas, las cuales presentan gran cantidad de hoja β según la Figura 5.8 para comprobar la presencia de oligómeros, teniendo una como control de agregación inicial y otra muestra tratada con la molécula. En la Figura 5.11 se aprecia que el control de 48 horas marca gran intensidad, evidenciando la presencia de oligómeros según la detección del anticuerpo y además corrobora que a mayor cantidad de hoja β se está en presencia de estructuras oligoméricas por aumento de la señal de la ThT. En el caso de la muestra tratada con A2, se observa una disminución en la cantidad de oligómeros detectada por el anticuerpo, comprobando así la remodelación por parte de A2 a los oligómeros de alfa sinucleína. Este análisis cualitativo se refuerza con el análisis en ImageJ, en el cual la disminución a 18,6% de la muestra tratada respecto al 81,4% de intensidad obtenida en la muestra control indica que la cantidad de oligómeros disminuyó considerablemente.

Se ha estudiado la acción en el remodelamiento de oligómeros de parte de moléculas naturales o derivados de estos, relacionados con interacciones covalentes y no covalentes con la estructura de alfa sinucleína oligomérica, de manera de lograr estructuras no tóxicas para las células. Casos como la interacción de polifenoles como el epigalocatequin galato (EGCG), capaz de remodelar los oligómeros de alfa sinucleína uniéndose a la porción amiloide β para formar oligómeros no tóxicos[81, 82], o la curcumina, capaz de unirse al componente no amiloide β inhibiendo la formación de oligómeros mediante interacciones no covalentes[83, 84], o casos de flavonoides como la baicaleina, que mediante interacciones covalentes en las que forma una base de shiff con lisinas de la cadena lateral de alfa para lograr inhibir la formación de fibras y desagregar fibras maduras[85, 86], muestran la potente acción lograda con moléculas que pueden estar presentes en la dieta.

En el caso de esta investigación, la molécula estudiada es de origen natural, pero su estructura aún está en estudio, por lo que faltarían más ensayos para determinar específicamente que tipo de interacción es la que mantiene con alfa sinucleína para lograr remodelar la estructura. De todas formas, los ensayos aquí propuestos pudieron dar luces del remodelamiento de alfa sinucleína.

Estas terapias serán importantes tanto para disminuir la sintomatología de los pacientes y además frenar el proceso de agregación y toxicidad neuronal, sin causar los efectos secundarios logrados por la levodopa carbidopa descritos anteriormente. Por lo tanto, es necesario seguir estudiando moléculas de origen natural que aporten al tratamiento paliativo de la EP, y lograr entender su mecanismo de acción contra la proteína.

Capítulo 7: Conclusión

Los resultados obtenidos en esta investigación indican el remodelamiento de una molécula natural frente a oligómeros de alfa sinucleína recombinante, causante de la EP.

Se realizaron cinéticas de agregación de alfa sinucleína monitoreadas con ThT para determinar que entre las 24 y 48 horas hay mayor producción de hoja β y, por tanto, producción de oligómeros. Mediante ensayos de agregación con moléculas naturales, se demostró que la molécula denominada A2 es capaz de inhibir en un 62,05 % la agregación de alfa sinucleína recombinante.

Finalmente, mediante análisis por dot blot se demostró la remodelación de los oligómeros de alfa sinucleína obteniendo un 18,6 % de intensidad del marcaje con anticuerpo monoclonal AsyO5 en la muestra tratada con A2 respecto del 81,4 % obtenido de la muestra control.

Capítulo 8: Organigrama

MES	JUL				AGO				SEP				OCT				NOV				DIC			
SEMANA	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Inducción																								
Transformación química de *E.coli*																								
Cultivo piloto de *E.coli*																								
Cultivo mayor de *E.coli*																								
Purificación de alfa sinucleína																								
Escritura de anteproyecto																								
Entrega de anteproyecto																								
Ensayos de agregación																								
Dot blot de agregados proteicos																								
Evaluación de hoja β mediante fluorescencia																								
Análisis de resultados																								
Redacción resultados, discusión y conclusiones																								
Redacción final de proyecto de investigación																								
Entrega proyecto de investigación																								

Capítulo 9: Bibliografía

1. Moore DJ, West AB, Dawson TM. Molecular Pathophysiology of Parkinson's Disease. Annu Rev Neurosci. 2005;28:57–87.

2. Salud Md. Guía clínica Enfermedad de Parkinson. In: Ministerio de Salud, Santiago, 2010.

3. Chaná P, Garín A, Martínez V, Tapia J, Kunstmann C, Benavides O, Parrao T. Enfermedad de Parkinson, guía paciente inicial. In: Centro de estudios de trastornos del movimiento, Universidad de Chile, Santiago 2010.

4. Vilar M, Chou HT, Luhrs T, Maji SK, Riek-Loher D, Verel R, Manning G, Stahlberg H, Riek R. The fold of alpha-synuclein fibrils. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2008;105:8637-8642.

5. Jakes R, Spillantini MG, Goedert M. Identification of two distinct synucleins from human brain. Federation of European Biochemical Societies Letters. 1994;345:27-32.

6. Lavedan C. The synuclein family. Genome Research. 1998;8:871-880.

7. Cheng F, Vivacqua G, Yu S. The role of alpha-synuclein in neurotransmission and synaptic plasticity. Journal of Chemical Neuroanatomy. 2011;42:242-248.

8. Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM-Y, Trojanowski JQ, Jakes R, Goedert M. Alpha-synuclein in Lewy bodies. Nature. 1997;388: 839-840.

9. Goedert M. Alpha-synuclein and neurodegenerative diseases. Nature Reviews. 2001;2:492-501.

10. Lashuel HA, Overk CR, Oueslati A, Masliah E. The many faces of alpha-synuclein: from structure and toxicity to therapeutic target. Nature reviews Neuroscience. 2013;14:38-48.

11. Pfefferkorn CM, Jiang Z, Lee JC. Biophysics of alpha-synuclein membrane interactions. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes. 2012;1818:162-171.

12. Jo E, McLaurin J, Yip CM, St George-Hyslop P, Fraser PE. Alpha-synuclein membrane interactions and lipid specificity. The Journal of Biological Chemistry. 2000;275:34328-34334.

13. George JM, Jin H, Woods W, Clayton DF. Characterization of a novel protein regulated during the critical period for song learning in the zebra finch. Neuron. 1995;15:361-372.

14. Spillantini MG, Divane A, Goedert M. Assignment of human alpha-synuclein (SNCA) and beta-synuclein (SNCB) genes to chromosomes 4q21 and 5q35. Genomics. 1995;27:379-381.

15. Chartier-Harlin MC, Kachergus J, Roumier C, Mouroux V, Douay X, Lincoln S, Levecque C, Larvor L, Andrieux J, Hulihan M, Waucquier, Defebvre, Amouyel P, Farrer M, Destée A. Alpha-synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease. The Lancet. 2004;364:1167-1169.

16. Singleton AB, Farrer M, Johnson J, Singleton A, Hague S, Kachergus J, Hulihan M, Peuralinna T, Dutra A, Nussbaum R, Lincoln S, Crawley A, Hanson M, Maraganore D, Adler C, Cookson MR, Muenter M, Baptista M, Miller D, Blancato J, Hardy J, Gwinn-Hardy K. Alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. Science. 2003;302:841.

17. Polymeropoulos MH. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. Science. 1997;276:2045-2047.

18. Zarranz JJ, Alegre J, Gómez-Esteban JC, Lezcano E, Ros R, Ampuero I, Vidal L, Hoenicka J, Rodriguez O, Atarés B, Llorens V, Gomez E, Del Ser T, Muñoz DG, De Yebenes JG. The new mutation, E46K, of alpha synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia. Annals of Neurology. 2004;55:164-173.

19. Conway KA, Lee SJ, Rochet JC, Ding TT, Williamson RE, Lansbury, Jr PT. Acceleration of oligomerization, not fibrillization, is a shared property of both alpha-synuclein mutations linked to early-onset Parkinson’s disease: Implications for pathogenesis and therapy. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1999;97:571-576.

20. Krüger R, Kuhn W, Müller T, Woitalia D, Graeber M, Kösel S, Przuntek H, Epplen JT, Schöls L, Riess O. Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson’s disease. Nature Genetics. 1998;18:106-108.

21. Appel-Cresswell S, Vilarino-Guell C, Encarnacion M, Sherman H, Yu I, Shah B, Weir D, Thompson C, Szu-Tu C, Trinh J, Aasly JO, Rajput A, Rajput AH, Jon Stoessl A, Farrer MJ. Alpha-synuclein p.H50Q, a novel pathogenic mutation for Parkinson's disease. Movement disorders. 2013;28:811-813.

22. Lesage S, Anheim M, Letournel F, Bousset L, Honoré A, Rozas N, Pieri L, Madiona K, Dürr A, Melki R, Verny C, Brice A. G51D alpha-synuclein mutation

causes a novel parkinsonian-pyramidal syndrome. Annals of Neurolog. 2013;73:459-471.

23. Proukakis C, Dudzik C, Brier T, MacKay DS, Cooper JM, Millhauser GL, Houlden H, Schapira AH. A novel alpha-synuclein missense mutation in Parkinson disease. Neurology. 2013;80:1062-1064.

24. Baba M, Nakajo S, Tu PH, Tomita T, Nakaya K, Lee VMY, Trojanowski JQ, Iwatsubo T. Aggregation of alpha-synuclein in Lewy bodies of sporadic Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. American Journal of Pathology. 1998;152:879-884.

25. Danzer KM, Haasen D, Karow AR, Moussaud S, Habeck M, Giese A, Kretzschmar H, Hengerer B, Kostka M. Different species of alpha-synuclein oligomers induce calcium influx and seeding. The Journal of Neuroscience. 2007;27:9220-9232.

26. Jerrett JT, Lansbury, Jr PT. Seeding "one-dimensional crystallization" of amyloid A pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie? Cell. 1993;73:1055-1058.

27. Sawaya MR, Sambashivan S, Nelson R, Ivanova MI, Sievers SA, Apostol MI, Thompson MJ, Balbirnie M, Wiltzius JJW, McFarlane HT, Madsen A, Riekel C, Eisenberg D. Atomic structures of amyloid cross-beta spines reveal varied steric zippers. Nature. 2007;447:453-457.

28. Hoyer W, Antony T, Cherny D, Heim G, Jovin TM, Subramaniam V. Dependence of alpha-synuclein aggregate morphology on solution conditions. Journal of Molecular Biology. 2002;322:383-393.

29. Apetri MM, Maiti NC, Zagorski MG, Carey PR, Anderson VE. Secondary structure of alpha-synuclein oligomers: characterization by raman and atomic force microscopy. Journal of Molecular Biology. 2006;355:63-71.

30. Danzer KM, Krebs SK, Wolff M, Birk G, Hengerer B. Seeding induced by alpha-synuclein oligomers provides evidence for spreading of alpha-synuclein pathology. Journal of Neurochemistry. 2009;111:192-203.

31. Fujiwara H, Hasegawa M, Dohmae N, Kawashima A, Masliah E, Goldberg MS, Shen J, Takio K, Iwatsubo T. Alpha-Synuclein is phosphorylated in synucleinopathy lesions. Nature Cell Biology. 2002;4:160-164.

32. Giasson BI, Duda JE, Murray IVJ, Chen Q, Souza JM, Hurtig HI, Ischiropoulos H, Trojanowski JQ, Lee VMY. Oxidative damage linked to neurodegeneration by selective alpha-synuclein nitration in synucleinopathy lesions. Science. 2000;290:985-989.

33. Auluck PK, Caraveo G, Lindquist S. Alpha-synuclein: membrane interactions and toxicity in Parkinson's disease. Annual Review of Cell and Developmental Biology. 2010;26:211-233.

34. Deas E, Cremades N, Angelova PR, Ludtmann MH, Yao Z, Chen S, Horrocks MH, Banushi B, Little D, Devine MJ, Gissen P, Klenerman D, Dobson CM, Wood NW, Gandhi S, Abramov AY. Alpha-synuclein oligomers interact with metal ions to induce oxidative stress and neuronal death in Parkinson's disease. Antioxidants and redox signaling. 2016;24:376-391.

35. Ingelsson M. Alpha-synuclein oligomers-neurotoxic molecules in Parkinson's disease and other Lewy body disorders. Frontiers in Neuroscience. 2016;10:408.

36. Lee HJ, Bae EJ, Lee SJ. Extracellular alpha-synuclein-a novel and crucial factor in Lewy body diseases. Nature Reviews Neurology. 2014;10:92-98.

37. Bae EJ, Lee HJ, Rockenstein E, Ho DH, Park EB, Yang NY, Desplats P, Masliah E, Lee SJ. Antibody-aided clearance of extracellular alpha-synuclein prevents cell-to-cell aggregate transmission. The Journal of Neuroscience. 2012;32:13454-13469.

38. Kim C, Ho DH, Suk JE, You S, Michael S, Kang J, Joong Lee S, Masliah E, Hwang D, Lee HJ, Lee SJ. Neuron-released oligomeric alpha-synuclein is an endogenous agonist of TLR2 for paracrine activation of microglia. Nature communications. 2013;4:1562.

39. Zanforlin E, Zagotto G, Ribaudo G. The medicinal chemistry of natural and semisynthetic compounds against Parkinson's and Huntington's diseases. ACS Chemical Neuroscience. 2017;8:2356-2368.

40. Gazewood JD, Richards R, Clebak K. Parkinson disease: an update American Family Physician. 2013;87:267-273.

41. Pietta PG. Flavonoids as antioxidants. Journal of Natural Products. 2000;63:1035-1042.

42. Gao X, Cassidy A, Schwarzschild MA, Rimm EB, Ascherio A. Habitual intake of dietary flavonoids and risk of Parkinson disease. Neurology. 2012;78:1138-1145.

43. Masuda M, Suzuki N, Taniguchi S, Oikawa T, Nonaka T, Iwatsubo T, Hisanaga S, Goedert M, Hasegawa M. Small molecule inhibitors of alpha-synuclein filament assembly. Biochemistry. 2006;45:6085-6094.

44. Cornejo A, Jimenez JM, Caballero L, Melo F, Maccioni RB. Fulvic acid inhibits aggregation and promotes disassembly of tau fibrils associated with Alzheimer's disease. Journal of Alzheimer's disease. 2011;27:143-153.

45. Chua SW, Cornejo A, van Eersel J, Stevens CH, Vaca I, Cueto M, Kassiou M, Gladbach A, Macmillan A, Lewis L, Whan RM, Ittner LM. The polyphenol altenusin inhibits in vitro fibrillization of Tau and reduces induced Tau pathology in primary neurons. ACS chemical neuroscience. 2017;8:743-751.

46. Gaberc-Porekar V, Menart V. Perspectives of immobilized-metal affinity chromatography. Journal of biochemical and biophysical methods. 2001;49:335-360.

47. Simonian MH. Spectrophotometric determination of protein concentration. In: John Wiley and Sons I. Current Protocols in Cell Biology. 2002. 15:3B A.3B1-A.3B.7.

48. Biancalana M, Koide S. Molecular mechanism of Thioflavin-T binding to amyloid fibrils. Biochimica et Biophysica Acta. 2010;1804:1405-1412.

49. Biancalana M, Makabe K, Koide A, Koide S. Molecular mechanism of thioflavin-T binding to the surface of beta-rich peptide self-assemblies. Journal of Molecular Biology. 2009;385:1052-1063.

50. Scientific F. EMD Millipore protein blotting handbook: Tips and tricks. In: Fisher Scientific. 2012.

51. Sezonov G, Joseleau-Petit D, D'Ari R. *Escherichia coli* physiology in Luria-Bertani broth. Journal of bacteriology. 2007;189:8746-8749.

52. Widdel F. Theory and measurement of bacterial growth. 2010. .

53. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. Methods Enzymol. 1990;185:60-89

54. Invitrogen. One Shot Competent cells. In: Invitrogen. 2010.

55. pET-28a-c(+) Vectors. In: Novagen. 1998.

56. Rosano GL, Ceccarelli EA. Recombinant protein expression *in Escherichia coli:* advances and challenges. Frontiers in Microbiology. 2014;5:172.

57. Bornhorst JA, Falke JJ. Purification of proteins using polyhistidine affinity tags. Methods in Enzymology. 2000;326:245-254.

58. Block H, Maertens B, Spriestersbach A, Brinker N, Kubicek J, Fabis R, Labahn J, Schäfer F. Immobilized-metal affinity chromatography (IMAC): A review. 2009;463:439-473.

59. ProPac IMAC Product manual. In: Thermo Scientific. 2012.

60. Patrick McCarthy AH, Chris Pohl. Separation of His-tag protein aggregation variants on the new analytical ProPac® IMAC-10 column. In: Dionex. The application notebook 2005.

61. TALON Metal affinity resins user manual. In: Clontech Laboratories I.

62. Samuelson JC. Purifying recombinant His-tagged proteins. Biotechnology News. 2016;36:26-27.

63. Zhao X, Li G, Liang S. Several affinity tags commonly used in chromatographic purification. Journal of Analytical Methods in Chemistry. 2013;2013:581093.

64. Fanali S, Haddad PR, Poole C, Riekkola ML. Liquid Chromatography: Fundamentals and Instrumentation. Elsevier, 2013;1:269-283.

65. Johnson RD, Todd RJ, Arnold FH. Multipoint binding in metal-affinity chromatography II. Effect of pH and imidazole on chromatographic retention of engineered histidine-containing cytochromes c. Journal of Chromatography A. 1996;725:225-235.

66. Cheung RC, Wong JH, Ng TB. Immobilized metal ion affinity chromatography: a review on its applications. Applied Microbiology and Biotechnology. 2012;96:1411-1420.

67. Teale FWJ, Weber G. Ultraviolet fluorescence of the aromatic amino acids. Biochemical Journal. 2010. 1957;65:476-482.

68. Grimsley GR Pace CN. Spectrophotometric determination of protein concentration. Current Protocols in Protein Science. 2004. 3:1.

69. Extinction Coefficients: A guide to understanding extinction coefficients, with emphasis on spectrophotometric determination of protein concentration. In: Thermo Scientific. 2013.

70. Majluf F, Zúñiga D. Unidad de investigación: Evaluación del efecto inhibidor de extractos de líquenes antárticos sobre el proceso de agregación de alfa sinucleína. 2017;1:52-63.

71. Gonzalez-Horta A, Gonzalez B, Chavez-Montes A. Fuorescence as a tool to study lipid-protein interactions: The case of alpha-synuclein. Open Journal of Biophysics. 2013. 112-119.

72. Winner B, Jappelli R, Maji SK, Desplats PA, Boyer L , Aigner S, Hetzer C, Loher T, Vilar M, Campioni S, Tzitzilonis C, Soragni A, Jessberger S, Mira H, Consiglio A, Pham E, Masliah E,Gage FH, Riek R. In vivo demonstration that alpha-synuclein oligomers are toxic. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2011;108:4194-4199.

73. LeVine H, 3rd. Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer's disease beta-amyloid peptides: Detection of amyloid aggregation in solution. Protein Science. 1993;2:404-410.

74. Narkiewicz J, Giachin G, Legname G. In vitro aggregation assays for the characterization of α-synuclein prion-like properties. Prion. 2014;8:19-32.

75. Uversky VN, Li J, Fink AL. Metal-triggered structural transformations, aggregation, and fibrillation of human alpha-synuclein. A possible molecular NK between Parkinson's disease and heavy metal exposure. The Journal of Biological Chemistry. 2001;276:44284-44296.

76. Uversky VN, Li J, Fink AL. Evidence for a partially folded intermediate in alpha-synuclein fibril formation. The Journal of Biological Chemistry. 2001;276:10737-10744.

77. Accardo A, Shalabaeva V, Hesse B, Cotte M, Krahne R, Riekel C, Dante S. Temperature, surface morphology and biochemical cues: A combined approach to influence the molecular conformation of alpha-synuclein. Microelectronic Engineering. 2016;158:64-68.

78. Tuttle MD, Comellas G, Nieuwkoop AJ, Covell DJ, Berthold DA, Kloepper KD, Courtney JM, Kim JK, Barclay AM, Kendall A, Wan W, Stubbs G, Schwieters CD, Lee VMY, George JM, Rienstra CM. Solid-state NMR structure of a

pathogenic fibril of full-length human alpha-synuclein. Nature Structural & Molecular Biology. 2016;23:409-415.

79. Promega. ProtoBlot® II AP System with Stabilized Substrate including Western Express® Fast Blotting Protocol. In: Promega. 2012.

80. Brannstrom K, Lindhagen-Persson M, Gharibyan AL, Iakovleva I, Vestling M, Sellin ME, Brännström T, Morozova-Roche L, Forsgren L, Olofsson A. A generic method for design of oligomer-specific antibodies. Plos One. 2014;9:90857.

81. Bieschke J, Russ J, Friedrich RP, Ehrnhoefer DE, Wobst H, Neugebauer K, Wanker EE. EGCG remodels mature alpha-synuclein and amyloid-beta fibrils and reduces cellular toxicity. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2010;107:7710-7715.

82. Lorenzen N, Nielsen SB, Yoshimura Y, Vad BS, Andersen CB, Betzer C, Kaspersen JD, Christiansen G, Pedersen JS, Jensen PH, Mulder FA, Otzen DE. How epigallocatechin gallate can inhibit alpha-synuclein oligomer toxicity in vitro. The Journal of Biological Chemistry. 2014;289:21299-21310.

83. Ahmad B, Lapidus L. Curcumin prevents aggregation in alpha-synuclein by increasing reconfiguration rate. The Journal of Biological Chemistry. 2012;287:91939-9199.

84. Jha NN, Ghosh D, Das S, Anoop A, Jacob RS, Singh PK, Ayyagari N, Namboothiri IN, Maji SK. Effect of curcumin analogs on alpha-synuclein aggregation and cytotoxicity. Scientific reports. 2016;6:28511.

85. Zhu M, Rajamani S, Kaylor J, Han S, Zhou F, Fink AL. The flavonoid baicalein inhibits fibrillation of alpha-synuclein and disaggregates existing fibrils. The Journal of Biological Chemistry. 2004;279:26846-26857.

86. Hu Q, Uversky VN, Huang M, Kang H, Xu F, Liu X, Lian L,Liang Q, Jiang H, Liu A, Zhang C, Pan-Montojo F, Zhu S. Baicalein inhibits alpha-synuclein oligomer formation and prevents progression of alpha-synuclein accumulation in a rotenone mouse model of Parkinson's disease. Biochimica et Biophysica Acta. 2016;1862:1883-1890.