

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Caracterización estructural de oligómeros
amiloides de α -sinucleína y su interacción con
membranas modelo

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS QUÍMICAS

POR

Biol. José Ignacio GALLEA

Directora

Dra. María Soledad CELEJ

ARGENTINA 2018



Director de tesis

Prof. Dra. M. Soledad Celej

Comisión de tesis

Prof. Dra. Gladys E. Granero

Prof. Dr. Guillermo G. Montich

Prof. Dr. Alfredo G. Lorenzo

Evaluador externo

Prof. Dr. José María Delfino

A mis viejos

Resumen

α -sinucleína (AS) es una proteína expresada mayormente en cerebro y su función está asociada a la dinámica de vesículas sinápticas en neuronas dopaminérgicas. Su agregación anómala amiloide está vinculada con numerosas patologías neurodegenerativas como por ejemplo la enfermedad de Parkinson. A pesar de los grandes avances realizados, aún se desconocen cuáles son los mecanismos patogénicos asociados a estas enfermedades. Los oligómeros amiloides pre-fibrilares son señalados como las especies más neurotóxicas. Al respecto, la hipótesis mayormente aceptada sugiere una ganancia de toxicidad de AS cuando se encuentra en estado oligomérico. Sin embargo, una pérdida de la función de la proteína al autoensamblarse en estos agregados podría también contribuir a la disfunción celular. En esta tesis se dirigieron los esfuerzos en estos dos sentidos, por un lado, aportando información estructural de las especies oligoméricas para comprender las bases moleculares de su toxicidad y por el otro, evaluando el impacto de la oligomerización en las propiedades de unión a membranas lipídicas, claves para la función de la proteína.

Utilizando técnicas espectroscópicas se logró obtener información sobre el arreglo supramolecular de una población de especies oligoméricas de AS. Este ensamble resultó estar formado por agregados estructurados, ricos en estructura hoja- β antiparalela que poseen un patrón bien definido de interacciones intermoleculares. Se demostró que esta estructura distintiva también está presente en especies que se pueblan a lo largo del proceso de agregación amiloide, evidenciando además que este proceso involucra un marcado re-arreglo conformacional de la proteína.

A su vez, se midió cuantitativamente la unión de AS en su estado monomérico y oligomérico a membranas de distinta composición y curvatura. Se evidenció que la oligomerización de la proteína influye marcadamente en su interacción con membranas, cambiando su sensibilidad a curvatura y alterando su afinidad, llegando en algunos casos a abolir su asociación completamente.

La información estructural obtenida en este trabajo, junto con el estudio de unión a biomembranas, constituyen un avance clave para la comprensión de la toxicidad y pérdida de la función de AS asociada a las patologías neurodegenerativas.

Abstract

α -synuclein (AS) is a protein highly expressed in the brain and its function is linked to synaptic vesicle dynamics in dopaminergic neurons. Its aberrant amyloid aggregation is associated with several neurodegenerative disorders such as Parkinson's disease. Despite the progress that has been made over the years, the pathogenic mechanisms governing these diseases remain unknown. Prefibrillar amyloid oligomeric species are pointed as the more neurotoxic species. In this regard, the prevailing hypothesis indicates a gain-of-toxicity mechanism when the protein is in its oligomeric state. Nevertheless, a loss-of-function due to protein self-assembling might also be involved in cellular dysfunction. In this thesis, we directed our efforts to pave the molecular understanding of these two possibilities. On one hand, providing structural information on oligomeric species to understand the molecular basis of their toxicity and on the other, evaluating the impact of AS oligomerization on its membrane lipid binding properties, key elements for protein function.

By means of spectroscopic techniques we gathered information on the supramolecular arrangement of a population of oligomeric species. This ensemble was formed by structured, antiparallel β -sheet rich aggregates with a well-defined pattern of intermolecular contacts. We demonstrated that this distinctive structural feature is also present at the level of prefibrillar intermediates in the pathway of amyloid formation, also showing that this process involves a large conformational re-arrangement of the protein.

Simultaneously, we quantitatively measured the binding of AS in its monomeric and oligomeric state to membranes of different curvature and composition. We showed that protein oligomerization has a deep impact on its interaction with membranes, changing its curvature sensitivity and modifying its affinity at such an extent that binding is abolished in some cases.

The structural information attained in this work, together with the membrane binding study, constitute a key advance for the understanding of toxicity and loss-of-function mechanisms of AS associated to neurodegenerative diseases.

Contenidos



Contenidos

Agradecimientos	iv
Resumen	viii
Abstract	ix
Capítulo 1 Introducción y objetivos	15
1.1 Plegamiento y agregación amiloide de proteínas.....	15
1.2 Proteínas intrínsecamente desordenadas (IDPs).....	17
1.3 Mecanismo de agregación amiloide	18
1.4 α -sinucleína	19
1.4.1 Características fisicoquímicas y estructurales.....	19
1.4.2 Función.....	21
1.4.3 Disfunción	22
1.4.4 Agregados amiloides de AS y su relación con la EP	23
1.4.5 Características estructurales de las fibras amiloides de AS	23
1.4.6 Características estructurales de los oligómeros amiloides de AS.....	25
1.5 Objetivos del trabajo de tesis	26
Capítulo 2 Materiales y métodos	28
2.1 Reactivos químicos y materiales biológicos.....	28
2.1.1 Sondas Fluorescentes.....	28
2.1.2 Lípidos	28
2.1.3 Medios de cultivo, cepas y plásmidos.....	28
2.2 Protocolos de síntesis y preparación de material biológico	29
2.2.1 Transformación de <i>E. coli</i> BL21(D3)	29
2.2.2 Expresión y purificación de las proteínas.....	29
2.2.3 Marcación de proteínas y péptidos con sondas fluorescentes.....	30
2.2.4 Preparación de especies agregadas	31
2.2.5 Preparación de vesículas unilamelares	32
2.2.6 Purificación vesículas sinápticas	32
2.3 Técnicas y ensayos de exploración/caracterización	33

2.3.1	Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)	33
2.3.2	Electroforesis en geles en gradiente de poliacrilamida en condiciones nativas..	33
2.3.3	<i>Dot Blot</i>	33
2.3.4	Microscopia electrónica de transmisión (TEM)	34
2.3.5	Cromatografía de exclusión molecular (SEC)	34
2.3.6	Espectroscopia de masa de tiempo de vuelo con ionización por electrospray (ESI-TOF-MS)	34
2.3.7	Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier por reflectancia total atenuada (ATR-FTIR)	34
2.3.8	Espectroscopia de fluorescencia.....	35
2.3.9	Estabilidad conformacional de los oligómeros	36
2.3.10	Cinética de agregación de mAS y mAS-Ac.....	36
2.3.11	Ensayo de permeación de biomembranas.....	36
2.3.12	Espectroscopia de correlación de fluorescencia (FCS).....	37
2.3.13	Herramientas bioinformáticas	38
Capítulo 3	Organización supramolecular de los oAS	40
3.1	Selección de las sondas fluorescentes	40
3.2	Producción de los oligómeros marcados	42
3.3	Comparación entre los oAS marcados y los oAS de tipo salvaje	42
3.4	Polaridad del microambiente con resolución sitio-específica	44
3.5	Estabilidad conformacional de los oAS con resolución sitio-específica.....	46
3.6	Mapeo de contactos intermoleculares en los oAS	48
3.7	Discusión	50
Capítulo 4	Remodelado estructural de AS y AS-Ac durante amiloidogénesis	54
4.1	Obtención y caracterización de los mAS-Ac.....	54
4.2	Propiedades generales de los distintos ensamblajes conformacionales de AS y AS-Ac.....	56
4.3	Evolución de la estructura secundaria de AS y AS-Ac durante amiloidogénesis	60
4.4	Discusión	63
Capítulo 5	Efecto de la oligomerización en la interacción de AS con biomembranas.....	69
5.1	Medidas de interacción lípido-proteína mediante FCS	69
5.2	Sistemas modelo de biomembranas.....	70
5.3	Interacción de los mAS con biomembranas modelo	71

5.4	Interacción de los oAS con biomembranas modelo	74
5.5	Interacción de los mAS y los oAS con vesículas sinápticas	76
5.6	Discusión	77
	Conclusiones.....	81
	Anexo	84
	Referencias.....	90
	Comunicación de la ciencia.....	103
	Curriculum Vitae	105

Capítulo 1 - Introducción y objetivos

Capítulo 1 Introducción y objetivos

En este capítulo se expondrá el marco teórico y antecedentes bibliográficos con el fin de orientar la lectura y propiciar el entendimiento de esta tesis, así como para comprender por qué este trabajo representa un avance en el conocimiento sobre oligómeros amiloides de la proteína α -sinucleína (AS) y su relación con la enfermedad de Parkinson (EP). Finalmente, se expondrán los objetivos generales y específicos abordados a lo largo de estos años.

1.1 Plegamiento y agregación amiloide de proteínas

En la biosíntesis de proteínas, la información unidimensional codificada en la secuencia nucleotídica del ADN se transforma secuencialmente en la información unidimensional de la secuencia aminoacídica de la proteína. A medida que la interacción entre aminoácidos alejados en la secuencia comienza a entrar en juego y a tener un rol crucial en el plegado de la proteína, este proceso obviamente se desvía de la información lineal de la traducción. Sólo algunos aminoácidos son cruciales para el plegamiento proteico. Por lo tanto, las proteínas con muy baja homología de secuencia pueden tener estructuras similares y un solo remplazo aminoacídico puede, en algunos casos extremos, detener por completo el plegamiento correcto de la proteína. Muchas proteínas tienen estructuras globulares en soluciones acuosas y son funcionales solamente en este estado. El estado nativo o funcional de estas proteínas es entrópicamente desfavorable ya que corresponde a un ensamble de conformaciones con significativas restricciones de grados de libertad si lo comparamos con el estado desplegado. Por lo tanto, la posibilidad de que una dada cadena polipeptídica se pliegue en un estado compacto está determinado por el efecto hidrofóbico y por su habilidad de formar contactos intramoleculares de diferente naturaleza física para contrarrestar la disminución de la entropía conformacional [1].

Toda la información necesaria para que una dada cadena polipeptídica se pliegue en una estructura terciaria nativa está codificada en su secuencia de aminoácidos [2]. Es decir, que el plegamiento podría ser considerado como una segunda parte del código genético. Si una cadena polipeptídica de 100 aminoácidos debiera explorar todas las conformaciones posibles para llegar a su estado nativo de mínima energía le llevaría mil millones de años. Sin embargo, una proteína globular de estas características se pliega en la escala de tiempo de los milisegundos a los segundos. Esta contradicción, que es la esencia de la paradoja de Levinthal [3], se resuelve por el hecho que la secuencia aminoacídica no sólo posee la información relacionada a la estructura nativa, sino también de los caminos de esta información. De acuerdo con la concepción actual, estos caminos pueden ser diversos y están determinados por el paisaje energético de la proteína (Figura 1.1A) [4, 5]. Este paisaje describe la energía libre de la cadena polipeptídica en función de sus propiedades conformacionales. La energía libre del estado desplegado de la cadena polipeptídica representa un gran “plateau rugoso” describiendo el ensamble dinámico de un gran número de conformaciones accesibles que la cadena puede muestrear estocásticamente. Debido a que las interacciones “correctas” (parecidas a las del estado nativo) entre distintos residuos son, en promedio, más estables que las “incorrectas” (disímiles a la del estado nativo), este mecanismo de búsqueda es en principio capaz de encontrar el ca-

mino para llegar a la estructura de menor energía [4, 5]. Dado que el número de conformaciones accesibles a la cadena polipeptídica se reduce a medida que se acerca al estado nativo, el paisaje energético tiene una forma cónica irregular y es por esto también llamado embudo de plegamiento (Figura 1.1A).

El estado nativo de una proteína se encuentra en equilibrio con conformaciones parcialmente plegadas propensas a agregar, incluso en condiciones fisiológicas. Si bien normalmente el equilibrio se encuentra desplazado hacia el estado nativo, cambios en la secuencia de la proteína (mutaciones) o en el medio pueden afectar este equilibrio favoreciendo las especies parcialmente plegadas. Estas especies, consideradas mal plegadas debido a que la función fisiológica de la proteína está comprometida, son un primer paso para el auto-ensamblado a través del establecimiento de interacciones intermoleculares. Estas interacciones guían a la cadena polipeptídica hacia el denominado embudo de agregación (Fig. 1.1A), donde a través de especies oligoméricas y/o protofibrilares pueden formarse fibras amiloides altamente estables [6].

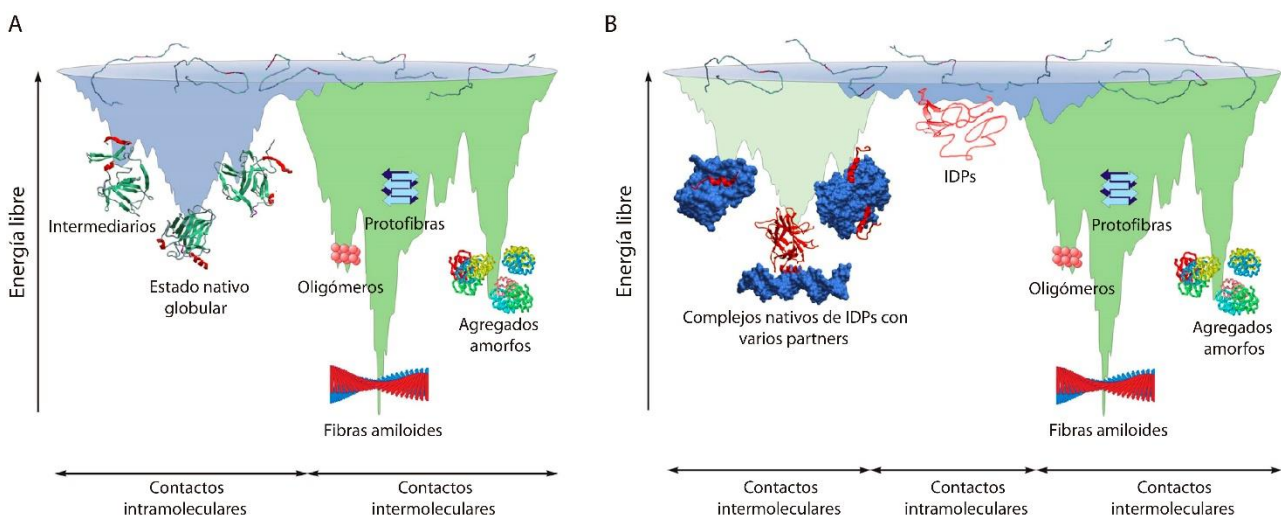


Figura 1.1 Paisaje energético de plegamiento y agregación de proteínas globulares (A) e intrínsecamente desordenadas (B). Imagen adaptada de ref. [6].

Las fibras amiloides cobraron notoriedad debido a que están involucradas en un gran número de enfermedades asociadas al plegamiento incorrecto y agregación de proteínas, colectivamente denominadas amiloidosis [7]. Sin embargo, se demostró que proteínas que no están asociadas a ninguna patología pueden formar fibras amiloides *in vitro* [8]. Además, las proteínas precursoras de las fibras amiloides no poseen similitud de secuencia y son estructuralmente muy distintas entre ellas. Estas evidencias indican que la habilidad de formar estas fibras es una propiedad inherente de la cadena polipeptídica [7]. La adopción espontánea de la conformación amiloide por un gran número de proteínas desafió varios paradigmas del plegamiento proteico previamente aceptados, incluyendo la asunción de que el estado nativo de una proteína representa el estado de mínima energía y, por lo tanto, la conformación termodinámicamente más favorable. De hecho, actualmente se propone que las fibras amiloides representan el estado termodinámico más estable [9, 10].

1.2 Proteínas intrínsecamente desordenadas (IDPs)

Durante un largo tiempo dominó en el mundo científico el paradigma de la relación estructura-función de las proteínas, en el cual una estructura bien definida es la que determina la función y es imprescindible para que la proteína pueda desempeñarla. Sin embargo, más recientemente surgieron indicios que las proteínas funcionales podrían ser completamente desordenadas, o contener largos segmentos desordenados. Actualmente se sabe que estos casos forman parte de una amplia familia de proteínas que son naturalmente flexibles, llamadas proteínas intrínsecamente desordenadas o IDPs (por sus siglas en inglés *Intrinsically Disordered Proteins*) [11]. Estas proteínas, a pesar de ser incapaces de formar estructuras ordenadas, son no obstante nativas ya que poseen importantes funciones biológicas. La proteína α -sinucleína, estudiada en esta tesis, forma parte de esta familia.

La incapacidad de las IDPs de formar estructuras globulares compactas está relacionada a las peculiaridades de su secuencia aminoacídica. Generalmente, estas proteínas contienen una baja proporción de aminoácidos hidrofóbicos y promotores de orden como Cys y Asn, una alta proporción de aminoácidos polares y cargados y promotores de desorden como Pro y Gly [11]. La variabilidad estructural de las IDPs es muy alta, pudiendo ser completamente desestructuradas, contener algunos elementos de estructura secundaria, o tener largos bucles o colas desordenadas. Algunas IDPs se pliegan total o parcialmente cuando interactúan con otras biomoléculas, las cuales puede ser proteínas, ácidos nucleicos, ligandos, biomembranas, etc [11, 12]. Esto sucede si la energía libre del complejo es más baja que la energía libre de la IDP y de la otra biomolécula antes de la interacción (Figura 1.1B).

La falta de estructura intrínseca y las transiciones desorden-orden relacionadas a su función proveen a las IDPs de varias ventajas como, por ejemplo, la de establecer interacciones altamente específicas de baja afinidad, presentar cinéticas de unión rápidas debido a las bajas barreras energéticas, poseer una vasta área de interacción y múltiples puntos de contactos con la biomolécula con la cual forma un complejo funcional y la de adoptar diferentes estructuras dependiendo del complejo que forme exhibiendo así una gran versatilidad.

La predisposición de formar complejos específicos con otras biomoléculas representa las bases moleculares para la función de las IDPs en vías de señalización, reconocimiento molecular y regulación. De hecho, muchas de las IDPs representan nodos altamente conectados, conocidos como nodos (*hubs*), en las redes de interacción proteína-proteína. Debido a que las IDPs tienen un rol importante en la regulación y coordinación de diversos procesos bioquímicos dentro de la célula, alteraciones en sus propiedades conformacionales pueden ser patogénicas. En este sentido, análisis bioinformáticos mostraron que un alto porcentaje de proteínas con diferente grado de desorden están asociadas a enfermedades como el cáncer, la diabetes, las enfermedades cardiovasculares o, como en el caso de α -sinucleína, con desordenes neurodegenerativos [13].

Estas proteínas, en contraste con las proteínas globulares que deben desplegarse al menos parcialmente antes de agregar [6], están siempre disponibles para establecer interacciones intermoleculares (Figura 1.1B). Si en lugar de establecer estas interacciones con una biomolécula natural formando complejos fisiológicamente funcionales lo hace con ella misma formando agregados, esto conducirá al embudo de agregación resultando en un estado patológico (Figura 1.1B).

1.3 Mecanismo de agregación amiloide

La transición de una proteína desde su estado soluble funcional al estado amiloide es un proceso complejo, que depende de las características intrínsecas de la proteína y de las condiciones del medio ambiente. La cinética de formación de fibras amiloides sigue un mecanismo general de nucleación-polimerización [7], donde especies solubles se asocian formando núcleos de agregación oligoméricos que luego pueden crecer a través de la adición de monómeros para finalmente formar las fibras. De acuerdo con este mecanismo, el perfil de crecimiento es característicamente sigmoideo [7], reflejando la mayor facilidad de la adición de monómeros a los agregados existentes comparado con la formación *de novo* de nuevos oligómeros. El proceso se puede dividir a nivel macroscópico en tres fases (Figura 1.2), una fase de latencia sin cambios aparentes en la solución, una fase exponencial donde comienzan a observarse las fibras amiloides maduras y una fase final estacionaria donde el monómero está en equilibrio con las fibras maduras [14]. En todas estas etapas, los monómeros y las fibras son las especies dominantes, prevaleciendo los monómeros durante la fase de latencia y las fibras durante la fase estacionaria. La concentración de todos los intermediarios oligoméricos que se forman es baja durante toda la reacción, teniendo su pico máximo durante la fase de latencia.

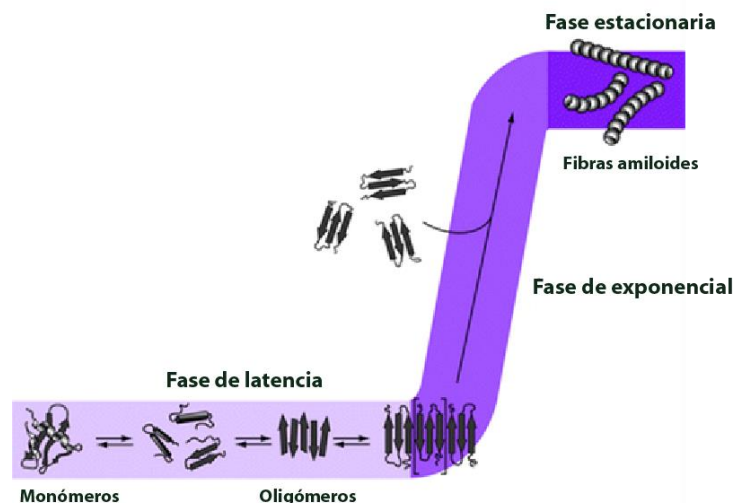


Figura 1.2 Esquema del modelo de polimerización dependiente de nucleación de la formación de fibras amiloides. Imagen adaptada de ref. [17].

A nivel microscópico, este proceso consta de muchas etapas en las cuales el desplegamiento completo o parcial del precursor nativo es usualmente, pero no siempre, el evento desencadenante [6, 7] generando especies propensas a agregar. Alternativamente, la agregación amiloide puede comenzar a partir de proteínas o péptidos intrínsecamente desordenados [6]. A través de una cascada de interacciones proteína-proteína, estos monómeros forman un núcleo crítico oligomérico durante la fase de nucleación (Figura 1.2) en un proceso reminiscente de las etapas tempranas de la cristalización [15, 16]. En una etapa más tardía luego de la formación del núcleo crítico, un segundo cambio conformacional causa que la proteína que se está agregando adopte en un proceso rápido el plegamiento *cross-β* característico de las fibras amiloides [6, 7], en el cual la estructura hoja- β se orienta paralela al eje longitudinal de la fibra. El agregado de pro-

teína monomérica a la ya existente estructura *cross-β* produce el crecimiento de los protofilamentos en la fase de elongación (Figura 1.2). Es interesante destacar que la formación amiloide puede ser favorecida por la adición de fibras fragmentadas o en algunos casos oligómeros, que actúan como “semillas” sorteándose la fase de nucleación.

1.4 α -sinucleína

1.4.1 Características fisicoquímicas y estructurales

AS es una proteína pequeña de 140 aminoácidos que se expresa abundantemente en el sistema nervioso [18]. Al igual que más del 90 % de las proteínas eucariotas se encuentra acetilada en el extremo N^α-terminal [19], aunque hasta el momento no se comprende el efecto fisiológico de esta modificación post-traducciona.

A partir de su composición aminoacídica, AS se puede dividir en tres dominios funcionales con propiedades fisicoquímicas distintas (Figura 1.3). La región N-terminal (Met¹-Lys⁶⁰) está caracterizada por la presencia de una secuencia imperfecta conservada de 11 aminoácidos repetida 7 veces y es característica de los dominios de unión a lípidos encontrados en apolipoproteínas [20]. La región central o NAC (Glu⁶¹-Val⁹⁵) posee un segmento de 12 aminoácidos altamente hidrofóbicos (⁷¹VTGVTAVAQKTV⁸²) [21] clave en la formación de agregados amiloides y finalmente la región C-terminal (Lys⁹⁶-Ala¹⁴⁰) que es rica en residuos Pro y aminoácidos cargados negativamente, incluyendo 10 Glu y 5 Asp, importante para la interacción con ligandos catiónicos.

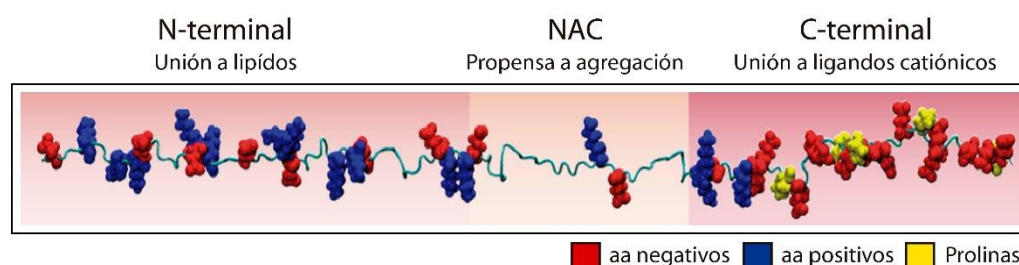


Figura 1.3 Representación esquemática de los dominios funcionales de AS. Se destacan los aminoácidos cargados y residuos Pro.

Los primeros estudios estructurales de AS realizados *in vitro* a partir de proteína obtenida en forma recombinante indicaron que se trata de una IDP [22]. Posteriormente, se demostró que el estado nativo de AS en solución corresponde a un ensamble de confórmers desordenados rápidamente interconvertibles, con estructuras secundarias transitorias [23-26] y una compleja red de interacciones terciarias de largo alcance que mantienen a la proteína en un estado de agregación auto-inhibido [27, 28]. Más recientemente, Bartels y colaboradores sugirieron que AS se encontraría formando un tetrámero plegado con estructura helicoidal en el interior celular [29]. Sin embargo, estudios posteriores demostraron que AS *in vivo* existe predominantemente en un estado desordenado [30-32]. En un estudio reciente empleando resonancia magnética nuclear en células (*in-cell* NMR), Theillet y colaboradores demostraron que AS mantiene su naturaleza in-

trínseca desestructurada y exhibe alta flexibilidad en células de mamíferos, a pesar de estar más compacta que en solución debido a posibles interacciones con algunos componentes intracelulares [33].

Al igual que otras IDPs, AS presenta una gran plasticidad estructural pudiendo adquirir una variedad de conformaciones dependiendo del entorno o de las interacciones que establezca [13]. Como se describirá en las próximas secciones, la interacción de AS con membranas juega un importante rol en la fisiopatología de esta proteína. Aunque aún incierta, su función estaría mediada por la interacción de AS con vesículas sinápticas (SVs) y estudios *in vitro* mostraron que AS interacciona preferencialmente con vesículas aniónicas altamente curvadas similares en tamaño a las SVs [20]. La interacción de AS con membranas induce la adopción de una α -hélice anfipática en la región N-terminal de la proteína, mientras que el dominio C-terminal permanece libre y desordenado [20, 23, 34]. Los primeros estudios realizados empleando RMN de alta resolución, utilizando micelas de dodecilsulfato sódico (SDS) como modelo de membrana, indicaron que AS formaría dos hélices antiparalelas (Val³-Val³⁷ y Lys⁴⁵-Thr⁹²) [35]. Sin embargo, estudios posteriores empleando vesículas de ~30 nm de diámetro mostraron que AS forma una α -hélice curvada continua que se extiende al menos hasta el residuo Ala⁹⁰ [36]. Una representación esquemática de esta conformación se muestra en la Figura 1.4A. Más recientemente, mediante el uso combinado de RMN en solución y en estado sólido para caracterizar las propiedades de AS unida a membranas que modelan la composición y propiedades físicas de SVs, Fusco y colaboradores determinaron que los primeros 25 aminoácidos de la proteína forman una hélice anfipática bien definida actuando como anclaje para la unión a la membrana, mientras que el segmento central (residuos Val²⁶-Lys⁹⁷) exhibe flexibilidad estructural pudiendo estructurarse dependiendo de las propiedades físicas de la membrana [34].

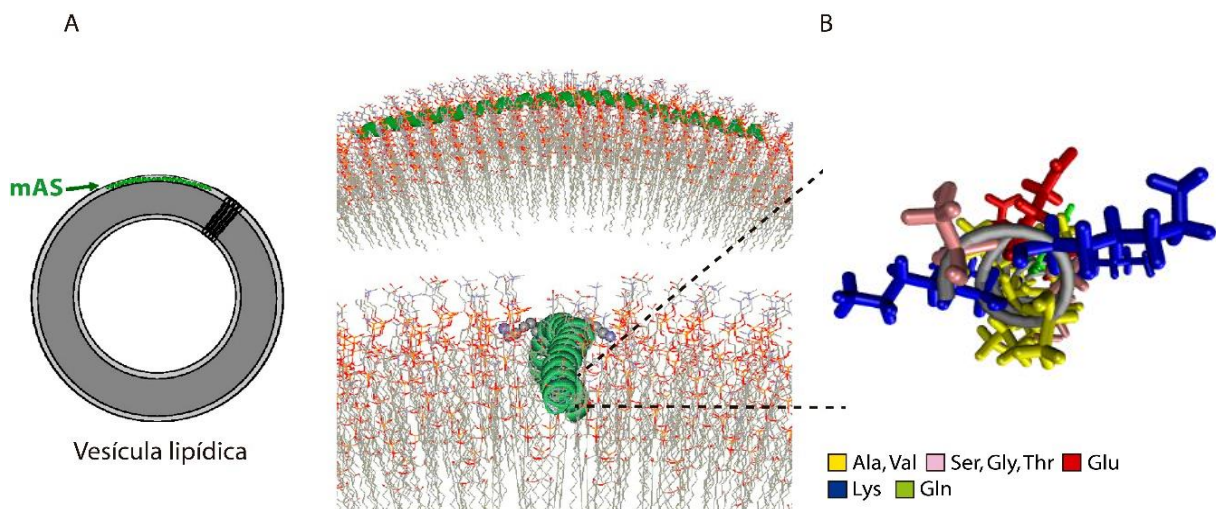


Figura 1.4 Representación esquemática de la interacción de AS con una vesícula lipídica. **A**, La hélice anfipática de AS (verde) sigue la curvatura de la membrana posicionándose justo por debajo de los grupos polares de los lípidos. Imagen adaptada de ref. [36]. **B**, Visualización de los residuos 9-30 de AS (PDB 1XQ8), coloreados según se indica en la imagen.

La interacción preferencial de AS con membranas acídicas de alta curvatura [20, 37, 38] parece estar relacionada a las características químicas particulares de su hélice anfipática [39, 40]. En las hélices anfipáticas clásicas presentes en proteínas que interaccionan con lípidos, la segregación de residuos polares y no polares entre las dos caras de la hélice tienden a estar equilibradas. Sin embargo, la hélice anfipática de AS se

encuentra desbalanceada ya que su cara apolar es poco desarrollada debido a la abundancia de residuos hidrofóbicos poco voluminosos como Val y Ala e incluso Thr y su cara hidrofílica posee una distribución equitativa de residuos Lys en la interface entre ambas caras formando dos alas y residuos Glu formando una cresta (Figura 1.4B). Mientras que los residuos básicos le dan a la proteína su especial afinidad por las membranas aniónicas, el desbalance entre la cara hidrofóbica y la polar le proporciona la sensibilidad a interfases curvadas menos empaquetadas [39, 40]. Este desbalance entre las caras hidrofóbica e hidrofílica de la hélice anfipática es una característica común de proteínas sensoras de curvatura [39].

1.4.2 Función

Como se mencionó anteriormente aún se desconoce la función exacta de AS. Sin embargo, desde su detección por primera vez cuando AS se identificó en vesículas colinérgicas del órgano eléctrico de la raya *Torpedo Californica*, se propuso una posible función sináptica [41]. Posteriormente, esta idea se vio fortalecida, al demostrarse que AS se localiza específicamente en los terminales nerviosos de neuronas donde estaría asociada a SVs de reserva en un sitio distal a la sinapsis [42-44], y se encuentra relativamente poco en el cuerpo celular, dendritas, o sitios no sinápticos a lo largo del axón [18].

AS no es esencial para el desarrollo neuronal o la formación de la sinapsis ya que su expresión se detecta luego del desarrollo sináptico [42]. Además, ratones que tienen inactivado el gen de AS (*knockout* AS) no ven comprometida las funciones cerebrales básicas o la sobrevivencia sugiriendo que la proteína no sería un componente esencial para las funciones sinápticas [43, 45]. Sin embargo, se reportaron anomalías en la liberación de dopamina y una desregulación en las poblaciones y reciclado de SVs en respuesta a los niveles de AS [42-44, 46]. En este sentido, se mostró que la sobreexpresión de AS induce una disminución en la liberación de neurotransmisores ya sea por interferir en la etapa de *priming* [44] o por inhibir el reagrupamiento de las SVs durante el reciclado luego de la endocitosis [46]. Por otro lado, la disminución de los niveles de AS reduce el número de SVs de reserva [42] y enlentece la reposición de SVs ancladas en la sinapsis desde el reservorio distal [43].

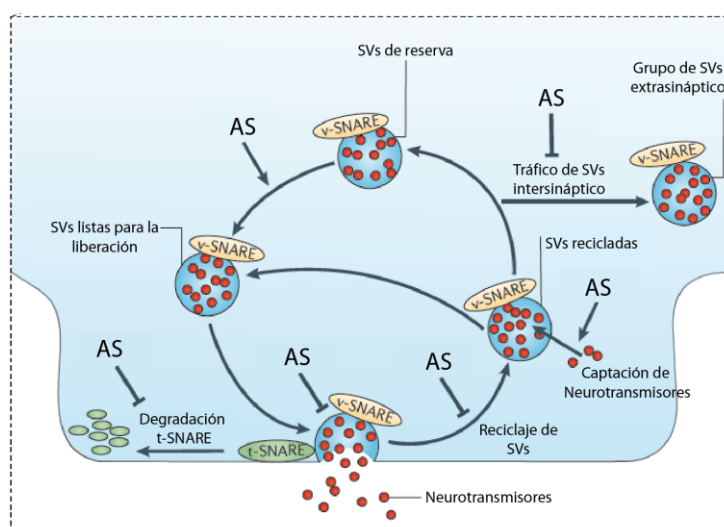


Figura 1.5 Representación esquemática de un terminal presináptico donde se destacan las propiedades funcionales de AS. Imagen adaptada de ref. [61].

Complementariamente, AS puede regular funciones sinápticas a través de la interacción con otras proteínas sinápticas. En ausencia de la co-chaperona CSP α (por su nombre en inglés *Cysteine-String-Protein- α*) la cual es esencial para el ensamblado de la maquinaria de exocitosis, AS actúa como una chaperona neuroprotectora para mantener la función de fusión de vesículas mediadas por proteínas SNAREs (acrónimo derivado de su nombre en inglés *Soluble NSF Attachment Protein Receptor*) [47]. Además, AS facilita el ensamblado del complejo SNARE a través de la interacción directa entre su dominio C-terminal y la región N-terminal de *synaptobrevina-2*, una proteína integral de membrana de las vesículas secretoras (v-SNARE) [48]. Esta interacción, junto a la asociación a lípidos aniónicos, promueve el agrupamiento de vesículas reconstituidas *in vitro* [49]. Otros estudios realizados también *in vitro* sugieren que AS inhibiría la fusión mediada por las SNAREs interfiriendo en la aposición de las bicapas a través de la interacción directa con lípidos de membrana [50, 51].

En conjunto, estos antecedentes indican que AS participa de la homeostasis sináptica interviniendo en varios procesos relacionados a la regulación y tráfico de SVs, incluyendo agregación, *priming*, fusión y reciclado de vesículas (Figura 1.5).

1.4.3 Disfunción

Posteriormente a su descubrimiento, AS se identificó en placas seniles presentes en pacientes con la enfermedad de Alzheimer. En estas placas, junto con el principal componente de las mismas el péptido β -amiloide, se encontró también la región NAC de AS [52]. Esta fue la primera relación de AS con una enfermedad neurodegenerativa. En 1997, Spillantini y colaboradores mostraron que las fibras amiloides de AS eran el principal componente de los cuerpos de Lewy, inclusiones intraneuronales que son el sello distintivo de la EP [53].

La EP es un desorden neurodegenerativo progresivo caracterizado por una severa deficiencia en las funciones motoras que afecta a más del 2% de la población mayor a 65 años y cuya incidencia incrementa marcadamente con la edad. Uno de los primeros eventos patológicos en la EP es la degeneración axonal retrógrada y el deterioro de la sinapsis de neuronas dopaminérgicas que se localizan en la *sustancia nigra pars compacta* y que proyectan a regiones del estriado. En estadios más avanzados ocurre una significativa pérdida de neuronas dopaminérgicas en la *sustancia nigra*, provocando una reducción drástica de dopamina causando la mayoría de las alteraciones motoras [54]. El rol patológico de AS en la EP se sustenta por una variedad de datos genéticos. Por ejemplo, las multiplicaciones del gen que codifica para AS o mutaciones puntuales (A30P, E46K, H50Q, G51D y A53T), conducen a un desarrollo temprano de la EP familiar [55-60]. Actualmente, AS se asocia a un grupo heterogéneo de desórdenes denominados colectivamente enfermedades con cuerpos de Lewy o sinucleinopatías, los cuales se caracterizan por la acumulación progresiva de AS en forma de fibras amiloides y por la degeneración de los circuitos neocorticales, límbicos y nigroestriales. Además de la EP, estas enfermedades comprenden a la EP con demencia, la demencia con cuerpos de Lewy, la atrofia sistémica múltiple, entre otras, afectando en conjunto a más de 5 millones de personas en el mundo [61].

Los mecanismos moleculares por los cuales AS contribuye a la neurodegeneración y la naturaleza de la especie patogénica son aun objeto de intenso debate. A continuación, se presentan evidencias sobre la participación de distintos conformeros estructurales de AS en las patologías neurodegenerativas.

1.4.4 Agregados amiloides de AS y su relación con la EP

La contribución de AS a la EP y a otras sinucleinopatías puede estar relacionada a una pérdida de la función normal de la proteína, a una ganancia de toxicidad, o a una combinación de ambas, probablemente causadas por la agregación amiloide. Evidencias significativas apuntan a una ganancia en toxicidad como el factor dominante en la etiología de estos desordenes.

Diferentes confórmeros, entre los que se encuentran los oligómeros solubles (oAS), las protofibras y las fibras, se asociaron a estas enfermedades. Las fibras se detectan principalmente en los cuerpos de Lewy y una serie de evidencias indican que son citotóxicas [62] y pro-inflamatorias [63, 64]. Sin embargo, algunos autores postulan que los oligómeros pre-fibrilares serían las especies más tóxicas y que la formación de cuerpos de Lewy sería un mecanismo protector que refleja el intento de las neuronas de convertir estas especies en fibras, estructuras estables, menos dinámicas y tóxicas [61].

Se detectaron niveles incrementados de oAS en regiones degeneradas del cerebro [65-68] y fluido cefalorraquídeo de pacientes con EP [69, 70] así como en modelos animales de la enfermedad [68, 71, 72]. Además de las observaciones clínicas, hay evidencias experimentales directas de la toxicidad de estas especies en diversos modelos celulares y animales. Por ejemplo, los oAS formados *in vitro* y aplicados ectópicamente a cultivos celulares o formados a través de la sobreexpresión de AS inducen muerte celular [73, 74]. Además, se mostró que la expresión de mutantes de AS diseñadas para reducir la propensión de formar fibras e incrementar la formación de oligómeros resulta citotóxico para líneas celulares inmortalizadas, neuronas primarias de ratón y células dopaminérgicas de *C. elegans* y *Drosophila* [75]. Estudios recientes indican que la conversión de oligómeros a fibras contribuye a la toxicidad y neurodegeneración, sugiriendo que la transición conformacional juega un rol central en determinar el destino celular [76-78].

Los mecanismos neurotóxicos asociados a los oAS incluyen una variedad de disfunciones celulares tales como defectos mitocondriales, estrés del retículo endoplasmático, deterioro proteosomal, daño a biembranas, disfunción lisosomal, desregulación de autofagia y transmisión transcelular de agregados, entre otros [61, 79, 80].

A raíz del papel protagónico de estos agregados en la EP, diversos grupos de investigación dirigieron sus esfuerzos para obtener información estructural sobre estas especies para comprender la relación estructura-toxicidad y los mecanismos moleculares subyacentes en estas patologías. Sin embargo, determinar las características estructurales de estas especies a nivel molecular representa un desafío que implica superar una serie de dificultades técnicas relacionadas a la inestabilidad intrínseca, polidispersidad y baja proporción en la que pueden producirse *in vitro* los oligómeros amiloides y a la insolubilidad y naturaleza polimérica de las fibras. A pesar de estas dificultades se lograron significativos avances, los cuales se resumen brevemente a continuación.

1.4.5 Características estructurales de las fibras amiloides de AS

El núcleo de las fibras se identificó por primera vez mediante la digestión proteolítica con proteinasa K de las fibras formadas a partir de AS recombinante, así como aisladas de cerebros enfermos [81]. El mismo comprende el segmento ~Gly³¹-Gln¹⁰⁹, cubriendo enteramente la región NAC y parte de los extremos N- y C-terminal de la proteína. Posteriormente, estudios espectroscópicos de alta resolución determinaron que el corazón *cross-β* fibrilar abarca la región comprendida entre los residuos ~Glu³⁵-Lys⁹⁶, de donde ambos extremos son excluidos y permanecen desordenados [82].

La fibra está formada por protofilamentos alineados y enlazados. El modelo estructural originalmente propuesto para los protofilamentos derivó de experimentos de resonancia paramagnética electrónica y RMN en estado sólido [82-85]. En este modelo cada monómero se asemeja a una serpentina- β compuesta de 5 hebras que se ordenan en hojas- β paralelas y en registro a lo largo del eje fibrilar (Figura 1.6A). Según este modelo, las posiciones reportadas para las hojas- β en la secuencia de AS son $\beta 1$: Val³⁷-Lys⁴³, $\beta 2$: Val⁵²-Thr⁵⁹, $\beta 3$: Gln⁶²-Val⁶⁶, $\beta 4$: Gly⁶⁸-Val⁷⁷, $\beta 5$: Ala⁹⁰-Val⁹⁵.

Recientemente, se empleó difracción microelectrónica para analizar los cristales de las fibras formadas por péptidos derivados de AS y proponer un modelo atómico a una resolución de 1.4 Å [86]. La estructura adoptada por un segmento de la región NAC reveló la típica estructura de cremallera estérica de fibras amiloides (Figura 1.6B). Su nombre deriva de la interdigitación de las cadenas laterales de dos hojas- β adyacentes en el sentido del eje longitudinal del protofilamento, al igual que los dientes de una cremallera [87]. La interface entre ambas hebras- β es altamente complementaria, formada por residuos Thr e Ile y desprovista de moléculas de agua. En el corazón fibrilar, las hojas- β de un mismo monómero estarían estabilizadas por interacciones de tipo hetero-cremallera (Figura 1.6B).

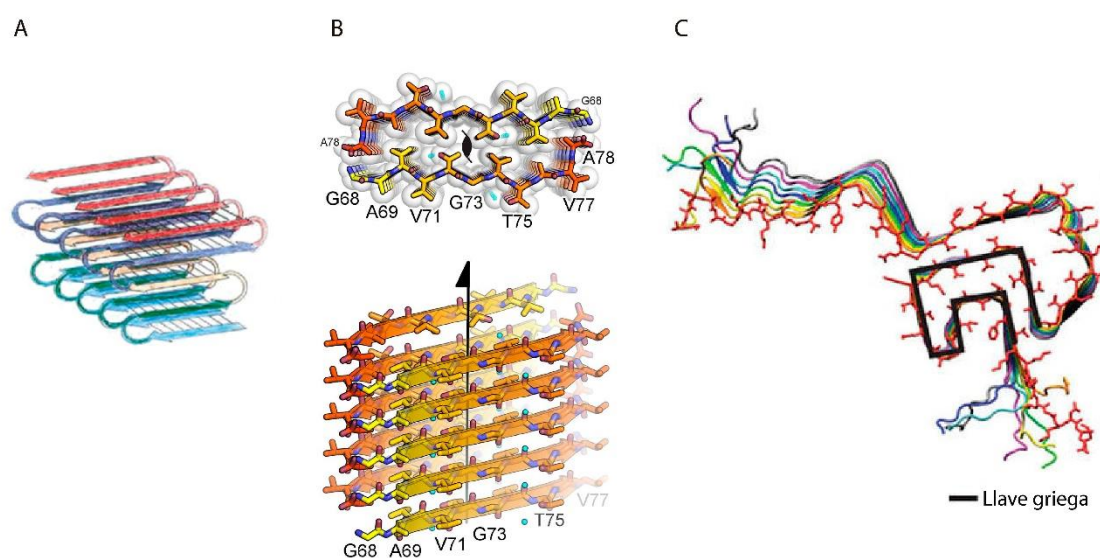


Figura 1.6 Modelos de plegamientos propuestos para fibras de AS obtenidos por NMR de estado sólido (**A** y **C**) y de un fragmento de la región NAC determinado mediante microcristalografía (**B**). Imagen adaptada de ref. [85, 86, 88].

Más recientemente, se presentó el primer modelo tridimensional de las fibras de la forma completa de AS determinado mediante RMN en estado sólido [88], en el cual los residuos del corazón fibrilar (residuos Glu⁴⁶-Thr⁵⁴ y Val⁶³-Lys⁹⁶) adquieren una topología tipo llave griega (Figura 1.6C). El corazón fibrilar está formado por 5 hojas- β paralelas en registro, que comprenden los siguientes segmentos $\beta 1$: Leu³⁸-Val⁵⁵, $\beta 2$: Glu⁶¹-Val⁶⁶, $\beta 3$: Val⁷⁰-Ala⁷⁸, $\beta 4$: Thr⁸¹-Glu⁸³ y $\beta 5$: Ile⁸⁸-Lys⁹⁷. Las hebras- β paralelas en registro están estabilizadas por hetero-cremalleras estéricas, puentes salinos, una escalera de Glu e interacciones hidrofóbicas (Figura 1.6C). Si bien las posiciones exactas de las hebras- β no coinciden exactamente por las reportadas anteriormente por el grupo de Riek [85], en ambos polimorfos, el número y longitud de las hebras- β son similares y la región NAC se encuentra en la zona más interna del corazón fibrilar.

Las diversas estructuras de las fibras de AS reflejan la naturaleza polimórfica del plegamiento amiloide pudiendo conducir a una variedad de fenotipos clínicos. Por ejemplo, se reportó recientemente que dos polimorfos de las fibras de AS con distinta morfología y arquitectura interna exhiben diferentes niveles de neurotoxicidad y capacidad de transmisión célula-célula, y por lo tanto, podrían conducir a diferentes grados o tipos de sinucleopatías [62].

1.4.6 Características estructurales de los oligómeros amiloides de AS

El término oligómero hace referencia a agregados de AS que no son fibrilares, siendo inespecífico en cuanto a su composición molecular. De hecho, las especies prefibrilares con un amplio espectro de pesos moleculares, contenido de estructura secundaria, regiones hidrofóbicas expuestas y morfologías se referencian como oligómeros [80]. Por ejemplo, se observaron varias especies oligoméricas de AS *in vitro* previo a la formación de las fibras con morfología diferente, incluyendo especies esféricas, elongadas, con forma de cadena o anulares [89, 90]. Estas especies están en equilibrio con AS monomérica y experimentan eventualmente una conversión a fibras [89, 90].

En estos años, se desarrollaron diversos métodos para generar oligómeros estables en cantidad suficiente y en un tiempo reducido para su estudio a nivel molecular [80]. Estos métodos pueden conducir a la generación de especies estructural y funcionalmente distintas. Por ejemplo, empleando diferentes condiciones de agregación se obtuvieron especies oligoméricas que difieren en el número de monómeros que las conforman [91-94], en su habilidad para inducir permeabilidad de membranas celulares o actuar como semillas de agregación intracelular [74, 95]. De todas maneras, considerando que la fuerza impulsora para la agregación es la misma para todas las especies, que la toxicidad asociada a los oligómeros amiloides parece estar relacionada a su estructura [96] y que diversos intermediarios pre-fibrilares comparten epítopes estructurales [97], se podría esperar que todas estas especies compartan características estructurales comunes.

Uno de los métodos más utilizados, incluido el empleado en nuestro laboratorio, está basado en la liofilización de la proteína [93, 94, 98-101]. Los oAS formados de esta manera son reconocidos por el anticuerpo específico para oligómeros amiloides A11 [93, 100] y contienen importantes cantidades de estructura hoja- β [98, 100, 102]. En nuestro laboratorio se demostró que las hojas- β en los oAS están organizadas en un arreglo antiparalelo en contraposición a la orientación paralela que se encuentra en las fibras [100], observación que fue posteriormente confirmada por otros grupos [93, 94, 103]. Este ensamble contiene una población heterogénea de especies, con un tamaño promedio de ~ 30 monómeros/oligómero [91, 93, 94] y son capaces de asociarse con bicapas lipídicas e inducir permeabilización de membranas [93, 94, 98, 102]. Subramanian y colaboradores propusieron que el núcleo oligomérico abarca la región comprendida entre los residuos Phe⁴-Ala⁹⁰ [104]. En dicha región, segmentos discretos Phe⁴-Ala¹⁷, Tyr³⁹-Thr⁵⁴ y Val⁷⁰-Ala⁸⁹ exhiben estructuras estables unidas por puentes hidrógenos o estructuras protegidas del solvente [105], mientras que el resto de la proteína se encontraría esencialmente desestructurada [94, 103, 104]. En conjunto, estas evidencias indican que el corazón con estructura hoja- β de estos oligómeros pareciera involucrar residuos similares a aquellos del corazón fibrilar, aunque difieren en el arreglo de sus hojas- β [93, 100].

Recientemente, se propuso un modelo tridimensional para una subpoblación de los oAS basado en la reconstrucción de imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica criogénica [93]. Este modelo reveló una arquitectura cilíndrica con una cavidad central, similar a la observada previamente mediante microscopía electrónica [89], la cual podría alojar sustratos como metales, ácidos grasos y otras moléculas pequeñas.

Es relevante señalar que estos ensamblajes oligoméricos producidos por estos métodos resultan tóxicos para células neuronales, por ejemplo por la generación de especies reactivas del oxígeno [106] o la disrupción de la membrana celular [95].

1.5 Objetivos del trabajo de tesis

Los antecedentes resumidos anteriormente realzan el rol crucial de los oAS en la patogénesis de la EP, evidenciando a su vez la escasa información estructural que se tiene de estas especies y la ausencia de un claro entendimiento respecto a los mecanismos moleculares que las asocian a la patología.

En este marco, el objetivo general de este trabajo de tesis es contribuir a la comprensión de la relación estructura-toxicidad de los oligómeros amiloides de AS. Para poder alcanzar nuestro objetivo general se delinearon los siguientes objetivos específicos:

- I. Obtener información a nivel molecular sobre la organización supramolecular de los oAS.
- II. Determinar si los intermediarios formados durante el proceso de agregación amiloide de AS poseen la característica estructural distintiva de los oAS.
- III. Evaluar el impacto de la oligomerización de AS en sus propiedades de asociación a membrana, con especial interés en su sensibilidad a curvatura.

Capítulo 2 - Materiales y Métodos

Capítulo 2 Materiales y métodos

En este capítulo se presentan los materiales, principales detalles técnicos y los diferentes procedimientos experimentales empleados a lo largo de esta tesis. Los mismos serán posteriormente referenciados en el análisis de los resultados obtenidos descritos en los próximos capítulos. En primer lugar, se enumerarán los principales reactivos químicos y materiales biológicos utilizados. Luego, se describirán los protocolos empleados para la expresión y purificación de las proteínas y finalmente las diferentes técnicas de exploración y caracterización empleadas.

2.1 Reactivos químicos y materiales biológicos

2.1.1 Sondas Fluorescentes

En este trabajo de tesis se utilizaron las moléculas fluorescentes 6-acriloil-2-dimetilaminonaftaleno (acrildan), Alexa Fluor 488-maleimido (Alexa488), ácido-8-anilinaftaleno-1-sulfónico (1,8-ANS) de la firma Invitrogen- EE. UU. y N-(1-pireno)-maleimida (pireno), 5(6)-carboxifluoresceína (CF), fluoresceína sódica (Fluoresceína) y Tioflavina T (TioT) de la empresa Sigma Aldrich-EE. UU., por sus distintas propiedades que se describirán en los siguientes capítulos.

2.1.2 Lípidos

Los lípidos utilizados durante el desarrollo de esta tesis fueron 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfoserina (POPS), 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (POPC), 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfoglicerol (POPG), 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (POPE) y colesterol (Col), los cuales se obtuvieron comercialmente de la empresa Avanti Polar Lipids- EE. UU.

2.1.3 Medios de cultivo, cepas y plásmidos

Para la sobreexpresión de las distintas variantes proteicas se emplearon los siguientes medios de cultivo, cepas y plásmidos:

- Medio de cultivo rico Luria-Bertani (LB): Contiene peptona de caseína (1 % p/v), extracto de levadura (0,5 % p/v), NaCl (0,5 % p/v). En su versión sólida este medio incluye agar-agar (1 % p/v).
- Medio de cultivo Súper Óptimo con represión por Catabolitos (SOC, por sus siglas en inglés *Super Optimal broth with Catabolite repression*): Extracto de lavadura (0,5 % p/v), triptona (2 % p/v), 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM Glucosa.
- *Escherichia coli* BL21 (D3): La cepa químicamente competente BL21 contiene el gen de la ARN polimerasa del fago T7 con un promotor inducible por isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) para utilizar con cualquier plásmido de expresión que contenga el promotor T7. Se conservan a una temperatura de -70 °C.

- Plásmido pT7-7 AS: Este vector de expresión, de alto número de copias en *E. coli*, contiene la secuencia que codifica para la proteína de interés bajo el control del promotor fuerte del fago T7. Además, posee el gen de resistencia a ampicilina *amp^r* como marcador de selección de transformantes en *E. coli*. Los plásmidos conteniendo las secuencias codificantes para las variantes únicas de Cys se obtuvieron comercialmente de la empresa GenScript- EE. UU. a partir de dicho plásmido. En todos los casos se modificó el codón 136 TAC por el codón TAT para prevenir la incorporación errónea de residuos Cys durante la sobreexpresión en bacterias [107]. La secuencia correcta de los genes se verificó mediante el servicio de secuenciación de la Universidad de Chicago- EE. UU.
- Plásmido pNatB: plásmido pACYCduet-naa20+-naa25+, que permite la co-expresión de las subunidades catalíticas (Naa20) y regulatoria (Naa25) del complejo NatB de levadura y posee el gen de resistencia a cloranfenicol *clf^r* como marcador de selección de transformantes en *E. coli*. Dicho plásmido fue donado por el Profesor Daniel Mulvihill de la Universidad de Kent, Reino Unido.

2.2 Protocolos de síntesis y preparación de material biológico

2.2.1 Transformación de *E. coli* BL21(D3)

Se adicionaron 2 μL (concentración de 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) de plásmido conteniendo el gen que codifica para la proteína de interés a 100 μL de bacterias competentes BL21 (D3) y se incubó durante 30 min en hielo. Para la obtención de la proteína AS-Ac, las bacterias se co-transformaron adicionado en forma simultánea los plásmidos PT7-7 y pNatB (0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) que codifican para AS y la acetiltransferasa NatB, respectivamente. Posteriormente, se aplicó un shock térmico para incrementar temporariamente la permeabilidad de la membrana bacteriana, incubando la suspensión a 42 °C durante 90 s, seguido de 2 min de incubación en hielo. Las células se recuperaron en 1 mL de medio LB o SOC sin antibiótico a 37 °C con agitación durante 45 min. Posteriormente se centrifugó durante 2 min a 5000 $\times g$, se descartaron 900 μL de sobrenadante y se resuspendieron las bacterias en los 100 μL restantes para ser sembrados en placas de Petri conteniendo medio sólido LB suplementado con ampicilina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ o ampicilina/cloranfenicol 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente, en el caso de la co-transformante y se incubaron durante 12 h en estufa de cultivo a 37°C.

2.2.2 Expresión y purificación de las proteínas

Se utilizó un protocolo de expresión y purificación similar para la producción de AS monomérica salvaje (mAS-WT), la isoforma acetilada (mAS-Ac) y las diferentes variantes únicas de Cys. La cepa de *E. coli* BL21 transformada con el plásmido de interés se inoculó en 50 mL de medio líquido LB suplementado con los antibióticos correspondientes y se dejó crecer hasta saturación durante toda la noche a 37 °C. Este cultivo saturado se utilizó para inocular un cultivo de 1 L de LB también suplementado con los antibióticos adecuados para cada expresión y se incubó a 37 °C con agitación orbital constante hasta alcanzar una densidad óptica $\text{DO}^{600} = 0,6-0,8$, cuando se indujo la expresión de las proteínas con la adición de IPTG a concentración final de 0,5 mM IPTG. Luego de 4 h de incubación, las células se cosecharon por centrifugación a 4000 $\times g$ durante 15 min y el precipitado de bacterias se resuspendió en *buffer* Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 1 mM y se procedió a lisar las bacterias mediante 5 ciclos de frío/calor mediante inmersión en N_2 líquido y en baño termostático a 70 °C, y posterior exposición a ultrasonidos (Homogeneizador ultrasónico Cole Parmer). El extracto obtenido se hirvió durante 30 min y se centrifugó a 13000 $\times g$ durante 20 min para precipitar proteínas termosensibles y otros componentes celulares.

Al sobrenadante recuperado se le adicionó sulfato de estreptomicina (10 mg/mL), se incubó con agitación orbital constante durante 15 min a 4 °C y se centrifugó como en el paso previo a fin de precipitar el ADN genómico. Posteriormente se adicionó al sobrenadante (NH₄)₂SO₄ (360 mg/mL), se incubó con agitación orbital constante durante 15 min a 4 °C y se centrifugó para precipitar las proteínas presentes entre las que se encuentra la proteína de interés. El precipitado se resuspendió en *buffer* Tris-HCl 25 mM, pH 7,5 y se sometió a una etapa de cromatografía de intercambio aniónico empleando una columna POROS HQ (Applied Biosystems) acoplada a un equipo FPLC Äkta purifier (GE Healthcare Life Sciences). Debido al carácter aniónico de AS y sus variantes, las proteínas fueron retenidas en la columna y su elución se obtuvo mediante la aplicación de un gradiente salino lineal de NaCl en el rango de 0 a 600 mM con el *buffer* Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, 1,5 M NaCl, donde AS se disocia a una concentración de NaCl 300 mM. Este paso de purificación se realizó para separar la proteína de interés de otras proteínas y ADN remanentes de los pasos anteriores. Finalmente, las muestras se dializaron durante 12 h en agua Milli-Q o el *buffer* deseado dependiendo del tipo de experimento. La pureza de la proteína se verificó mediante electroforesis en geles de acrilamida. En los *buffers* empleados para la purificación y guardado de las variantes conteniendo Cys, se adicionó 5 mM de ditioneitol (DTT) para evitar la formación de puentes disulfuro. La concentración de las proteínas se determinó mediante espectroscopia UV-visible utilizando un coeficiente de absortividad molar de $\epsilon^{275} = 5600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

2.2.3 Marcación de proteínas y péptidos con sondas fluorescentes

Las variantes proteicas que poseen un único residuo Cys se marcaron con sondas reactivas a tioles, acrilodan, pireno o Alexa488 dependiendo del experimento, utilizándose un procedimiento similar en cada caso. Primeramente, se removió el DTT empleando una columna de desalado PD-10 Sephadex G-25 (GE Healthcare Life Sciences). En el caso de la marcación con pireno o acrilodan se utilizó como *buffer* de elución NaH₂PO₄/ Na₂HPO₄ 25 mM pH 6,5, mientras que para Alexa488 se utilizó HEPES 10 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM. La sonda N-(1-pireno)-maleimida puede estar sujeta a aminólisis a un pH de 7,5, especialmente en la presencia de aminos libres, por este motivo se mantuvo un pH de trabajo $\leq 6,5$ [108]. Las fracciones que contenían la proteína se identificaron mediante fluorescencia de Tyr. Posteriormente la sonda correspondiente disuelta en el solvente orgánico CH₃SOCH₃ (DMSO), se adicionó en una proporción de 4 veces respecto de la concentración de la proteína en el caso de acrilodan y pireno y de 2 veces en el de Alexa488. La concentración final de DMSO en cada una de las mezclas fue menor al 1 %. Las soluciones se incubaron durante 12 h a 4 °C en oscuridad y las reacciones se detuvieron con la adición de DTT 10 mM. Las proteínas marcadas se purificaron utilizando nuevamente una columna de desalado PD-10 Sephadex G-25 empleando los *buffers* de elución correspondientes y las fracciones conteniendo proteína se identificaron mediante la detección de la fluorescencia de las sondas conjugadas. Las fracciones colectadas se centrifugaron a 14000 × g durante 20 min a 4 °C para remover posibles precipitados y los sobrenadantes recuperados se concentraron mediante filtración utilizando un filtro Amicon Ultra-4 10KDa (Millipore) que retiene moléculas de masas moleculares mayores a 10 KDa. Posteriormente, la proteína marcada se incubó en presencia de cloruro de guanidinio (GdmCl) 0,1 M durante 12 h a 4 °C para disociar la sonda que pudiera estar unida inespecíficamente y se dializó en el *buffer* determinado para cada experimento. Debido al solapamiento espectral de las bandas de absorción de las sondas fluorescentes con la de la proteína a 275 nm, se utilizó el método de Lowry [109] para la cuantificación del contenido proteico empleando soluciones de mAS-WT de concentración conocida determinada mediante espectroscopia UV-visible para la construcción de la curva de calibración. Las concentraciones de las sondas se determinaron mediante absorbancia empleando los coeficientes de absortividad molar $\epsilon^{372} = 16400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [110], $\epsilon^{343} = 36000 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ [108] y $\epsilon^{495} = 72000 \text{ M}^{-1}$

cm^{-1} [111], para acrilodan, pireno y Alexa488, respectivamente. A partir de ambas valoraciones se determinaron las eficiencias de marcado, las cuales fueron típicamente de entre 70-85 % en el caso de acrilodan y pireno y ≥ 95 % en el caso de Alexa488. Las distintas especies monoméricas marcadas se designarán como mAS-acri, mAS-pir y mAS-A488 indicando la conjugación con la sonda acrilodan, pireno o Alexa488, respectivamente.

Para la marcación del tripéptido glutatión (GSH), se incubó una solución de GSH 100 μM en presencia de la sonda a una relación de GSH/sonda 100:1, en oscuridad durante 12 h a 4 °C en *buffer* $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 25 mM, pH 6,5. La solución se centrifugó a 14000 x g para remover posibles particulados y se liofilizó para su disolución en los distintos solventes.

2.2.4 Preparación de especies agregadas

Las soluciones de la proteína se filtraron empleando un filtro de Amicon Ultra-4 mL de 100 KDa de corte (Millipore) a fin de eliminar posibles agregados. La producción de los oAS se llevó a cabo mediante un protocolo basado en la liofilización de las soluciones concentradas de la proteína monomérica [80], el cual promueve la formación de estas especies por un efecto que puede ser atribuido a un aumento del acceso de moléculas de proteínas a las interfases solvente/aire y de la interacción intermolecular durante el proceso de vitrificación. Se utilizaron entre 0,4 y 2,5 mL de soluciones acuosas de la proteína monomérica 300 μM , dependiendo del experimento y la cantidad de oligómeros necesarios. Para la generación de los oligómeros marcados, se prepararon las soluciones mezclando cantidades adecuadas de mAS-WT y mAS marcada con los distintos fluoróforos de manera de obtener distintas proporciones de la proteína marcada inicial dependiendo del experimento: 5 % en el caso de mAS-acri o mAS-pir para los ensayos de polaridad, entre 5 y 40 % de mAS-pir para los experimentos de proximidad intermolecular y 14 % de mAS-A488 para las determinaciones de espectroscopia de correlación de fluorescencia. Para los experimentos de proximidades intermoleculares, que se basan en la determinación de los excímeros de pireno (*Capítulo 3*), se incluyó un paso adicional de pre-incubación de mAS-pir en presencia de 0,1 M GdmCl a -20 °C a fin de disociar cualquier agregado proteico (dímeros u otros oligómeros n-mer de bajo peso molecular) que pudiera estar presente en la solución de almacenado, pudiendo resultar en interpretaciones erróneas. El *buffer* conteniendo GdmCl se intercambió por agua Milli-Q mediante lavados sucesivos empleando filtros Amicon Ultra-0,5 mL de 10 KDa de corte (Millipore) antes de proseguir con el protocolo de oligomerización.

Las muestras se liofilizaron y luego se resuspendieron en el *buffer* respectivo para cada experimento: Tris-HCl 25 mM pH 7,5 para oAS salvajes (oAS-WT), $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 25 mM pH 6,5 para oAS marcados con acrilodan y pireno (oAS-acri y oAS-pir, respectivamente) y HEPES 10 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM para oAS marcados con Alexa488 (oAS-A488). Posteriormente, las soluciones se centrifugaron a 20000 x g durante 30 min a 4 °C para remover agregados amorfos o fibras. Los oligómeros se purificaron mediante lavados sucesivos con el *buffer* correspondiente, empleando filtros Amicon Ultra-0,5 mL de 100 kDa de corte (Millipore) a 4 °C, para disminuir la tendencia de la formación de fibras, que en el caso de la proteína marcada puede estar aumentada debido a interacciones aromáticas entre las sondas fluorescentes [112]. Los pasos de lavado se continuaron hasta que la señal de fluorescencia de Tyr para oligómeros no marcados o de la sonda fluorescente para aquellos marcados detectada en el eluyente, fuera despreciable comparada con la intensidad medida en la solución retenida por el filtro. La remoción de la proteína monomérica se confirmó mediante geles nativos en gradiente mientras que la ausencia de fibras amiloides se verificó mediante la fluorescencia de la sonda TioT. En caso de que resultara necesario, se realizó un paso adicional de ultracentrifugación a 50000 x g durante 30 min para remover posibles agregados TioT positivos. Con este procedi-

miento, se obtuvieron entre 50 a 150 μL de soluciones de oligómeros de entre 100 a 150 μM , los cuales se mantuvieron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

Las fibras amiloides se obtuvieron incubando una solución de mAS-WT 300 μM a $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ bajo agitación orbital constante de 800 rpm durante 12 h, condición que acelera la formación de las mismas [113]. Luego se procedió a su purificación, realizando ciclos de centrifugación a $14000 \times g$ durante 30 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ y lavado con *buffer* Tris-HCl 25 mM pH 7,5. La concentración de las fibras se determinó en unidades monoméricas mediante la lectura de la absorbancia de las alícuotas incubadas en GdmCl 6 M a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 h.

2.2.5 Preparación de vesículas unilamelares

Los lípidos se disolvieron a una concentración final de 10-20 mg/mL en cloroformo/metanol (2:1 v/v) y se conservaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Las alícuotas de los lípidos puros, o de las mezclas correspondientes, se secaron bajo flujo constante de N_2 y se deshidrataron por medio del vacío en un desecador durante 12 h. La película lipídica resultante se rehidrató durante 1 h en el *buffer* apropiado para cada experimento. Para la preparación de las vesículas unilamelares grandes (LUVs, por sus siglas en inglés *Large Unilamellar Vesicles*), las soluciones acuosas de lípidos se agitaron durante 5 min y luego se extruyeron 20-25 veces a través de membranas de policarbonato de 100 nm de diámetro de poro a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Para la preparación de las vesículas unilamelares pequeñas (SUVs, por sus siglas en inglés *Small Unilamellar Vesicles*), los lípidos rehidratados se sometieron a 5 ciclos de congelamiento-descongelamiento sumergiéndolos en N_2 líquido y posteriormente en baño termostático a una temperatura mayor a la de transición de los lípidos. La solución se expuso 3 veces a ultrasonido durante 5 min en un homogeneizador ultrasónico (Cole Parmer) a un ciclo de trabajo de 50 %. Las SUVs se centrifugaron a $14000 \times g$ durante 30 min para sedimentar partículas grandes.

La cuantificación del lípido total se realizó mediante la determinación de fósforo inorgánico utilizando el método colorimétrico de Fiske-Subbarow [114] que se basa en una primera etapa de conversión de la materia orgánica a inorgánica para la posterior determinación de fósforo con una reacción colorimétrica. En el caso de la mezcla que contenía un 25 % de colesterol, se calculó la concentración lipídica total adicionándole un 25 % a la concentración determinada mediante cuantificación de fosforo. El tamaño de las vesículas obtenidas se determinó mediante dispersión dinámica de la luz (DLS, por sus siglas en inglés *Dynamic Light Scattering*) en un equipo Nicomp 380 (Particle Sizing Systems) empleando una distribución Gaussiana ponderada por volumen.

2.2.6 Purificación vesículas sinápticas

La purificación de las SVs se realizó siguiendo el protocolo optimizado descrito por Ahmed y colaboradores [115]. Brevemente, se obtuvieron los cerebros de dos ratones jóvenes (6-8 semanas) y se homogenizaron en *buffer* HEPES 4 mM pH 7,4, sacarosa 320 mM a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ suplementado con inhibidor de proteasas. Se centrifugó el homogeneizado a $1000 \times g$ durante 10 min para remover los grandes fragmentos celulares y los núcleos. El sobrenadante se centrifugó a $15000 \times g$ para separar sinaptosomas de SVs en solución. Este sobrenadante se almacenó en frío hasta su posterior uso (S1). El precipitado se expuso a una solución hipotónica para liberar las SVs de los sinaptosomas, se centrifugó a $17000 \times g$ durante 15 min para remover grandes partículas membranosas y se recuperó el sobrenadante (S2). Se combinaron los sobrenadantes recuperados (S1 y S2), los cuales se centrifugaron a $48000 \times g$ durante 25 min. Se depositaron 5 mL del sobrenadante sobre un colchón de 5 mL de una solución de sacarosa 0,7 M (por duplicado) y se ultracentrifugó.

gó a $133000 \times g$ durante 1 h a 4°C para separar las SVs de complejos macromoleculares como ribosomas y proteosomas. Luego se fraccionó en alícuotas de 500 μL y se colectaron aquellas enriquecidas en SVs (generalmente las fracciones 12- 20). Posteriormente, se realizó una última ultracentrifugación a $300000 \times g$ durante 2 h a 4°C recuperándose las SVs en el precipitado. Para la disociación de las proteínas periféricas se incubó la suspensión de SVs en una solución de Na_2CO_3 pH 12 a 4°C durante 30 min y se realizaron sucesivos lavados con *buffer* Tris-HCl 100 mM pH 7,6, 100 mM KCl empleando un filtro Amicon Ultra-0,5 mL de 100 KDa de corte (Millipore). La presencia de SVs se constató mediante *dot blot* con un anticuerpo anti-sinaptofisina, proteína integral de membrana de estas vesículas. Con este procedimiento se logró una preparación de SVs de ~ 35 nm ($>95\%$) determinado mediante DLS. La cuantificación de los fosfolípidos totales se realizó mediante la técnica de Fiske-Subbarow [114].

2.3 Técnicas y ensayos de exploración/caracterización

2.3.1 Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)

Los geles se prepararon utilizando un equipo para minigeles (Mini Protean II Dual Slab Cell Electrophoresis System, Bio Rad Laboratories). Cada gel se armó con dos estratos de composiciones distintas, la región concentradora que contenía acrilamida/bis-acrilamida (29:1) 4 %, tetrametiletilendiamina (TEMED) 0,1 %, Persulfato de amonio (PSA) 0,07 %, Tris-HCl 125 mM pH 6,8, 0,1 % de SDS y la región separadora con acrilamida/bis-acrilamida (29:1) 15 %, TEMED 0,1 %, APS 0,09 %, Tris-HCl 125 mM pH 8,8, 0,1 % de SDS. Las muestras se calentaron a 100°C durante 5 min en el *buffer* de siembra Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8, glicerol 0,1 % v/v, 0,1 % v/v de SDS y 2 % v/v de β -mercaptoetanol y azul de bromofenol 0,01 % p/v. El *buffer* de corrida consistió en Tris-HCl 2,5 mM Glicina 0,2 M pH 8,3, 0,1 % de SDS. La electroforesis se desarrolló a temperatura ambiente y a una diferencia de potencial eléctrico de 150 V. Al final de la corrida, los geles se tiñeron durante 1 h en la solución de fijado consistente en metanol 40 % y ácido acético 10 %, conteniendo azul de coomassie 0,1 %. El desteñido se realizó con sucesivos lavados con la solución de fijado.

2.3.2 Electroforesis en geles en gradiente de poliacrilamida en condiciones nativas

Los geles nativos de poliacrilamida se prepararon empleando un gradiente lineal de acrilamida/bis-acrilamida (29:1) de 4 a 15 % sin uso adicional de SDS. El *buffer* de siembra se preparó de manera similar al empleado en SDS-PAGE, sin el agregado de SDS ni de β -mercaptoetanol. Se utilizó el marcador de masa molecular comercial HMW Native Marker (GE Healthcare Life Sciences) como patrón de referencia. Las corridas electroforéticas se realizaron en condiciones no-desnaturalizantes (sin SDS) aplicando una diferencia de potencial eléctrico constante de 60 V durante ~ 4 h en frío. Los geles se tiñeron con AgNO_3 como se detalla brevemente a continuación. Se fijaron los geles durante 1 h en solución de fijado (metanol 50 %: ácido acético 12 %) con formaldehído 0,2 % y se lavaron tres veces durante 20 min con metanol 50 %. Posteriormente se pretrataron con $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,02 % e incubaron durante otros 20 min en una solución de AgNO_3 0,2 % y formaldehído 0,03 %. El revelado se realizó con una solución de Na_2CO_3 6 %, formaldehído 0,02 % y $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,4 %. La reacción se detuvo con la solución de fijado.

2.3.3 Dot Blot

Las muestras se depositaron en forma de punto sobre una membrana de nitrocelulosa y se dejaron secar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Luego se sumergió la membrana en una solución de leche en

polvo sin grasa 10 % (p/v) en 0,01 % TBST (10 mM Tris-HCl, pH 8, 150 mM NaCl, 0,01 % Tween 20) por 1 h y se enjuagó con 0,01% TBST. Posteriormente, la membrana se incubó con el anticuerpo que reconoce la proteína sinaptofisina de ratón (anti-Sf) durante 3 h a 25 °C (1:1000). Luego de lavar la membrana 3 veces con 0,01% TBST, se ensayó con un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón acoplado a la molécula fluorescente IRDye800CW (1:15000). Finalmente, tras otra etapa de lavado con 0,01% TBST (3 veces) la señal fluorescente fue visualizada utilizando un equipo de escaneo infrarrojo Odyssey (Li-Cor Biosciences).

2.3.4 Microscopia electrónica de transmisión (TEM)

Los distintos estados de agregación de las proteínas se observaron en un microscopio electrónico de transmisión JEM-1200 Ex (Jeol) equipado con una cámara GATAN modelo 785, disponible en el INTA-IFFIVE de la ciudad de Córdoba. Para ello, alícuotas de 5 µL se adsorbieron en grillas de carbón recubiertas con Formvar (malla de 200), se lavaron con agua Milli-Q y se tiñeron con acetato de uranilo 1 % p/v.

2.3.5 Cromatografía de exclusión molecular (SEC)

Para las determinaciones de los volúmenes hidrodinámicos de mAS o mAS-Ac, se empleó una columna cromatográfica de exclusión por tamaño Superdex 200 10/300 (GE Healthcare Life Sciences) acoplada a un sistema FPLC ÄKTA (GE Healthcare Life Sciences) equilibrada con *buffer* Tris-HCl 25 mM, pH 7,5. Las proteínas se eluyeron a una velocidad de flujo de 0,5 mL/min empleando *buffer* Tris-HCl 25 mM, pH 7,5 como fase móvil. Se utilizó albumina sérica bovina (Sigma) a una concentración de 8 mg/mL como patrón de referencia.

2.3.6 Espectroscopia de masa de tiempo de vuelo con ionización por electrospray (ESI-TOF-MS)

Se inyectaron en un espectrómetro de masa ESI-Qq-TOF micrOQTOF-II (Bruker) soluciones de la proteína monomérica 100 µM suplementadas con ácido fórmico 0,1% a una velocidad de inyección de 10 µL/min. Los espectros se tomaron en un rango masa/carga (m/z) de 250 a 2250 m/z en el modo de iones positivos, utilizando un voltaje capilar de -5000 V y una compensación de la placa final de -500 V. Se utilizó una presión de nebulización de 3,0 bar y como gas de secado un flujo de N₂ de 7,0 L/m a 180 °C. La calibración de las masas se logró inyectando una solución de formiato de sodio 40 mM y seleccionando las mejores 8 señales de acuerdo con el algoritmo de ajuste *The High Precision Calibration* (HPC). Una inyección extra de calibrante se realizó después de ensayar cada proteína para incrementar la precisión. Para el procesamiento de los datos se utilizó el programa de análisis de espectros de masa *The Software Data Analysis* (Bruker). El total de los cromatogramas de iones se promediaron con una ventana de 2 min. Al espectro promediado se le restó la línea de base, se suavizó para obtener una resolución más alta de datos m/z y el estado de carga y finalmente se deconvolucionó por la carga. Alternativamente, la deconvolución de los datos se llevó a cabo utilizando el algoritmo *The Maximum Entropy Algorithm* para obtener espectros de masa neutros. En los dos enfoques, se utilizó una restricción de masa teórica de entre 13000 y 15000 Dalton, considerando en el análisis la formación de aductos de sodio.

2.3.7 Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier por reflectancia total atenuada (ATR-FTIR)

Los espectros infrarrojos de AS en sus diferentes estados de agregación se registraron en un espectrómetro infrarrojo (Nicolet Nexus) y aquellos obtenidos durante los ensayos de agregación (ver a continuación) se

realizaron en un espectrómetro infrarrojo Equinox 55 (Bruker Optics). En ambos casos, las determinaciones se realizaron en el modo de reflectancia total atenuada (ATR) empleando un accesorio de reflexión única sobre cristal de diamante (Golden Gate, Specac). Los equipos se purgaron con aire seco para reducir las distorsiones del vapor de agua en los espectros. Alícuotas de muestras de $\sim 5 \mu\text{L}$ se dializaron en agua Mili-Q durante 30 min para reducir la concentración de *buffer*/sal que distorsionan el perfil infrarrojo de la proteína. Las muestras se depositaron en el cristal, se secaron con un flujo constante de N_2 y se rehidrataron utilizando N_2 saturado con D_2O para obtener los espectros de la proteína deuterada. Para cada determinación se promediaron 256 espectros registrados a 21°C , utilizando una resolución nominal de 2 cm^{-1} . El procesamiento y análisis de los espectros se realizó utilizando el programa *Kinetics*, desarrollado en el grupo del Dr. Erik Goormaghtigh del Centro de Biología Estructural y Bioinformática, Universidad Libre de Bruselas, Bélgica. Primero se realizó la sustracción de la contribución del vapor de agua y de las cadenas laterales de los aminoácidos de la proteína, se corrigió la línea de base y se normalizó el área en la región amida I' comprendida entre 1600 y 1700 cm^{-1} . La identificación de las bandas superpuestas, es decir, el número de picos que componen la banda amida I', se realizó mediante el análisis de autodeconvolución por transformada de Fourier (FSD) y segunda derivada (SD). La FSD del espectro infrarrojo se realizó antes de la sustracción de la línea de base empleando una función Lorentziana con una anchura a media altura (FWHM, por sus siglas en inglés *Full Width at Half Maximum*) de 30 cm^{-1} y apodización con una función Gaussiana (FWHM = $16,7 \text{ cm}^{-1}$) dando como resultado un factor de aumento de resolución de línea $K = 1,8$. La posición y el número de los componentes detectados se utilizaron como parámetros iniciales para el ajuste iterativo por mínimos cuadrados del espectro infrarrojo original ($K = 1$), empleando bandas con forma Gaussiana-Lorentziana. Una banda adicional en el extremo de la región amida I' de bajo número de onda se introdujo para mejorar el ajuste. La posición y el valor FWHM de cada componente individual se restringieron a rangos físicamente plausibles esperados para cada tipo de estructura secundaria según datos experimentales reportados en la literatura [116-120]. Las restricciones de posición asignadas fueron: de 1696 - 1686 cm^{-1} y 1628 - 1620 cm^{-1} para los componentes de alto y bajo número de onda de hojas- β , respectivamente, 1660 - 1640 cm^{-1} para estructura α -hélice/desordenada y 1680 - 1668 cm^{-1} para giros. Los valores iniciales de FWHM en cm^{-1} fueron de 9 (variando entre 8 y 11) para el componente de alto número de onda de hojas- β , 17 (variando entre 14 y 19) para el componente de bajo número de onda de hojas- β , 43 (variando entre 30 y 56) para α -hélice/desordenada y 20 (variando de 5 a 30) para giros.

2.3.8 Espectroscopia de fluorescencia

Los espectros de emisión de fluorescencia se adquirieron con un espectrofluorímetro Cary Eclipse (Agilent Technologies) equipado con un soporte multi-cubetas termostatzado, excepto para las determinaciones de la cinética de agregación donde se utilizó un espectrofluorímetro LS55 (PerkinElmer Instruments). Se promediaron 10 espectros registrados a 25°C . Las longitudes de onda de excitación (λ_{ex}), ancho de bandas y paso óptico de las cubetas utilizadas se indican en la Tabla 2.1.

En los ensayos realizados con el 1,8-ANS, los espectros de emisión se obtuvieron luego de incubar una solución de la proteína $5 \mu\text{M}$ y $100 \mu\text{M}$ de la sonda en *buffer* Tris-HCl 25 mM , pH 7,5 durante 30 min a temperatura ambiente. Las mediciones de la TioT se realizaron a una concentración final de $0,5 \mu\text{M}$ de proteína y $5 \mu\text{M}$ de sonda en *buffer* glicina 50 mM , pH 8,2.

Tabla 2.1: Sondas fluorescentes utilizadas y parámetros de medición para cada caso.

Sonda	λ_{ex} (nm)	Ancho de banda excitación/emisión (nm)	Paso óptico de la cubeta
acrilodan	380	5/5	0,3 mm
pireno	343	5/2,5	0,3 mm
1,8-ANS	370	10/10	0,3 mm
TioT	446	10/10	10 mm
CF	492	5/5	0,3 mm

2.3.9 Estabilidad conformacional de los oligómeros

Se realizaron experimentos de desnaturalización química de los oligómeros inducida por el GdmCl. Para ello, las soluciones de oAS-WT y oAS-acri se equilibraron en presencia de concentraciones crecientes del desnaturalizante durante 30 min. La concentración de las soluciones stock de los oligómeros se determinó mediante el método de Lowry y típicamente fue 100-150 μM . La transición de desplegamiento global se evaluó mediante geles nativos en gradiente de poliacrilamida, mientras que las transiciones locales se monitorearon a partir del comportamiento solvatocrómico de acrilodan. Los ensayos se realizaron al menos por duplicado y se analizaron independientemente.

2.3.10 Cinética de agregación de mAS y mAS-Ac

Se incubaron las soluciones de la proteína 100 μM en *buffer* Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, NaCl 100 mM, 0,01 % de azida sódica a 37 °C con agitación constante (350 rpm). Se tomaron alícuotas a diferentes tiempos durante la agregación y se determinó la formación de amiloides (mediante el ensayo de fluorescencia de TioT) y las transiciones estructurales (mediante ATR-FTIR). La cinética de formación amiloide se analizó empleando la siguiente ecuación:

$$y = \frac{1}{[1 + e^{-k_{ap}(t-t_{1/2})}]} \quad \text{Ecuación 1}$$

donde k_{ap} es la constante de velocidad aparente para la incorporación de los monómeros a las regiones de crecimiento y $t_{1/2}$ es el tiempo medio aparente de la conversión amiloide. El tiempo de latencia está definido como $t_{1/2} - \frac{2}{k_{ap}}$ [121]. Los ensayos se realizaron por lo menos en triplicado y se analizaron independientemente.

2.3.11 Ensayo de permeación de biomembranas

Se prepararon LUVs en *buffer* HEPES 10 mM pH 7,5, NaCl 50 mM, EDTA 1 mM conteniendo la sonda fluorescente CF 50 mM. La sonda no encapsulada se separó empleando una columna de desalado PD-10 Sephadex G-25 (GE Healthcare Life Sciences) equilibrada con el mismo *buffer*. Se incubó una solución de LUVs (20 μM) en presencia de las distintas especies proteicas (1 μM) durante 30 min a temperatura ambiente y se evaluó la liberación de la sonda mediante determinaciones de fluorescencia. El *plateau* de máximo de señal se obtuvo tras los primeros ~5 min de incubación. Luego de la sustracción del blanco (liberación basal de CF de vesículas en ausencia de proteína), el porcentaje de liberación del contenido se expresó en relación a la señal máxima alcanzada luego de la adición del detergente Tritón X-100 al 0,1% (p/v).

2.3.12 Espectroscopia de correlación de fluorescencia (FCS)

Las medidas se realizaron en un microscopio confocal de barrido Olympus FV1200 equipado con un objetivo de inmersión en silicona 60 x 1.3 y un láser en estado sólido de 473 nm. Los ensayos se realizaron en vidrios cubreobjeto pasivados con una solución de albúmina al 1 % para prevenir la adsorción de las muestras a la superficie del vidrio. El foco del láser se posicionó en la solución ~15 μm por encima de la superficie superior del cubre objeto. Cada medida de fluorescencia se adquirió durante 91 s y la imagen se analizó con el programa Global- simFCS 4 (desarrollado en el grupo del Dr. Enrico Gratton, Laboratorio de Dinámica de Fluorescencia, Universidad de California, Irvine, EE. UU.) obteniendo 33 curvas de autocorrelación que se promediaron entre ellas. El factor de estructura s , es decir, la relación entre la dimensión radial y la axial del volumen focal ($s = \frac{\omega}{z}$), se determinó empleando nanopartículas fluorescentes TetraSpeck (Invitrogen) de tamaño conocido fijadas en un porta objeto, arrojando un valor de 0,25. En forma complementaria, este factor se determinó como un parámetro de ajuste a partir de las curvas de autocorrelación de la sonda fluoresceína la cual tiene un coeficiente de difusión conocido ($D= 430 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$), obteniéndose valores similares al determinado previamente. El valor de s se mantuvo fijo en los ajustes posteriores de las curvas de autocorrelación.

Los estudios de interacción lípido-proteína se realizaron en *buffer* HEPES 10 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM empleando una concentración constante de AS (100 nM para mAS-A488 y 1 mM para oAS-A488) y variando la concentración de los lípidos. Las mismas poblaciones de SUVs y LUVs se emplearon para analizar la interacción de mAS-A488 y oAS-A488 con las vesículas. Las muestras a las distintas relaciones lípido/proteína se incubaron durante 30 min antes de la medición para permitir alcanzar el equilibrio y se midieron a 23 °C. Los experimentos se realizaron al menos por duplicado y se analizaron independientemente. Las curvas de autocorrelación se ajustaron con la función de autocorrelación $G(\tau)$ que describe la difusión de dos especies a través de un volumen tridimensional con forma Gaussiana [122]:

$$G(\tau) = \frac{1}{N} \left[(1 - F_{AS}^u) \frac{1}{1 + \frac{\tau}{\tau_{AS}}} \left(\frac{1}{1 + \frac{s^2\tau}{\tau_{AS}}} \right)^{\frac{1}{2}} + F_{AS}^u \frac{1}{1 + \frac{\tau}{\tau_{AS}^u}} \left(\frac{1}{1 + \frac{s^2\tau}{\tau_{AS}^u}} \right)^{\frac{1}{2}} \right] \quad \text{Ecuación 2}$$

donde N es el número de partículas fluorescentes, $1 - F_{AS}^u$ es la fracción de AS libre en solución, F_{AS}^u la fracción de AS unida a las vesículas, τ_{AS} y τ_{AS}^u los tiempos de difusión de AS libre y unida, respectivamente. El subíndice AS se refiere tanto a mAS-A488 como a oAS-A488. Los valores de τ_{AS} y τ_{AS}^u se obtuvieron independientemente a partir de mediciones realizadas con la proteína sola o en presencia de un exceso de lípido, donde se espera que ~100 % de la proteína se encuentre unida a los liposomas. En estas dos condiciones, las curvas se ajustaron con la función de autocorrelación para un solo componente:

$$G(\tau) = \frac{1}{N} \left[\frac{1}{1 + \frac{\tau}{\tau_{AS}}} \left(\frac{1}{1 + \frac{s^2\tau}{\tau_{AS}}} \right)^{\frac{1}{2}} \right] \quad \text{Ecuación 3}$$

Los valores de F_{AS}^u extraídos del ajuste de las curvas de autocorrelación con la Ecuación 2 se graficaron en función de la concentración de los lípidos accesibles ($[L]_{ac}$). Las curvas de titulación se analizaron considerando un equilibrio de partición entre dos fases fluidas inmiscibles, la fase acuosa y la lipídica. De esta manera, suponiendo que la interacción es no-cooperativa, la fracción molar de la proteína unida a las vesículas a través de interacciones hidrofóbicas y electrostáticas es [123]:

$$F_{AS}^u = \frac{K_p[L]_{ac}}{[H_2O] + K_p[L]_{ac}} \quad \text{Ecuación 4}$$

donde K_p es el coeficiente de partición en términos de la fracción molar y $[H_2O] = 55,3 M$ es la concentración molar de agua. Esta constante define la energía libre de partición $\Delta G_p^o = -RT \ln K_p$.

Alternativamente, debido a su amplio uso en la literatura, las curvas de titulación se analizaron considerando un equilibrio químico de asociación donde F_{AS}^u queda definida como:

$$F_{AS}^u = \frac{[L]_{ac}}{K_d^{ap} + [L]_{ac}} \quad \text{Ecuación 5}$$

para obtener la constante de disociación aparente (K_d^{ap}).

Para calcular $[L]_{ac}$ se consideró la fracción de lípido en la hemicapa externa de la membrana (x_{ac}) la cual corresponde al cociente entre el área de la hemicapa externa de las vesículas y el área total, es decir la suma de las áreas de las hemicapas interna y externa según:

$$x_{ac} = \frac{(4\pi r_{ext}^2)}{(4\pi(r_{in}^2 + r_{ext}^2))} = \frac{r_{ext}^2}{((r_{ext} - d)^2 + r_{ext}^2)} \quad \text{Ecuación 6}$$

donde r_{in} y r_{ext} son los radios de las hemicapas interna y externa, respectivamente y la diferencia entre ambos es el espesor de la bicapa, d . Finalmente, para una dada concentración de lípido total $[L]_{tot}$, la concentración de lípido accesible será $[L]_{ac} = x_{ac}[L]_{tot}$.

Los valores de r_{ext} para las distintas poblaciones de vesículas se obtuvieron experimentalmente mediante DLS y $[L]_{tot}$ se determinó mediante la técnica de Fiske-Subbarow [114]. Los valores de d para vesículas compuestas por lípidos puros se obtuvieron de la literatura: POPG 4,45 nm, POPS 4,45 nm, POPC 4,05 nm [124]. En los experimentos donde se utilizó una mezcla de lípidos, se aproximó el espesor de la bicapa con el valor de d correspondiente al lípido mayoritario en la mezcla.

2.3.13 Herramientas bioinformáticas

Los perfiles que describen la propensión de formar hojas- β y agregados amiloides se calcularon utilizando los algoritmos basados en secuencia TANGO [125], WALTZ (filtro de alta sensibilidad) [126] y Zyggregator [127]. El índice de hidropatía promedio se calculó de acuerdo con la escala Kyte-Doolittle utilizando una ventana de 7 aminoácidos [128]. La propensión de la formación de hélices enrolladas (*coiled-coil*) se calculó con el algoritmo COILS [129].

Capítulo 3 - Resultados

Capítulo 3 Organización supramolecular de los oAS

A pesar de su relevancia biológica se conoce poco acerca de la estructura y organización molecular de los intermediarios oligoméricos de AS. Su estudio y caracterización ha sido obstaculizado por la naturaleza transitoria, polidispersidad y la baja proporción en la que usualmente pueden generarse. A pesar de estas limitaciones, se logró establecer que los mismos contienen un importante componente de estructura hoja- β [98], en un arreglo antiparalelo en contraposición al arreglo paralelo presente en las fibras amiloides [100]. En este capítulo se presentan los resultados obtenidos empleando fluorescencia sitio-específica con el objetivo de identificar unidades de plegamiento cooperativo y proximidades intermoleculares dentro del agregado y así poder obtener información más detallada sobre la organización supramolecular de oAS.

3.1 Selección de las sondas fluorescentes

Dentro de la miríada de sondas fluorescentes disponibles para estudiar la organización molecular de proteínas, se eligieron dos que por sus características espectrales resultaron útiles para responder el objetivo propuesto: acrilodan y pireno (Figura 3.1A).

El acrilodan presenta una emisión de fluorescencia sensible a la polaridad del microambiente que circunda la sonda. Cuando se localiza en un ambiente de baja constante dieléctrica, como el interior de una proteína globular, su espectro de emisión de fluorescencia se encuentra desplazado hacia el azul y tiene un mayor rendimiento cuántico en comparación a cuando se encuentra en un medio de mayor polaridad (Figura 3.1B). Es por ello que el análisis de los cambios espectrales de acrilodan permite estudiar los dominios hidrofóbicos, los cambios conformacionales y los procesos de relajación dipolar en las proteínas.

El pireno es una de las sondas más utilizadas para estudiar biomoléculas. Su espectro de emisión está caracterizado por 5 bandas vibriónicas denominadas bandas monoméricas I, II, III, IV, V posicionadas a ~ 375 , 379, 385, 395 y 410 nm, respectivamente. Especialmente, el pico a 385 nm (correspondiente a la banda III, Figura 3.1B) tiene una particular sensibilidad a la polaridad del microambiente donde se encuentra la sonda. Comparada con la banda I a 375 nm, la intensidad de la banda III aumenta significativamente en ambientes hidrofóbicos, mientras que en ambientes polares es menos intensa. La relación entre las intensidades de ambas bandas (I/III) define la escala P_y , la cual puede ser usada para sensar la polaridad del ambiente proteico donde se encuentra la sonda. Otra característica de la emisión de fluorescencia de esta sonda es la aparición de una banda ancha a mayores longitudes de onda (desde 425 a 550 nm, centrada a 460 nm) cuando dos moléculas de pireno se encuentran ~ 4 -10 Å de distancia. El tiempo de vida de ~ 100 ns de esta sonda permite la interacción entre una molécula de pireno en estado basal y otra en estado excitado antes de la emisión, dando lugar a la banda de excímero a ~ 460 nm (Figura 3.1B) [130]. La comparación de la intensidad de fluorescencia de la banda I (375 nm) y la banda de excímero (460 nm), es indicativo del grado de formación del excímero y, por lo tanto, de la proximidad espacial entre dos moléculas de pireno. Estas

características hacen que el pireno sea una sonda extremadamente útil para el análisis conformacional y de proximidades en las proteínas.

Tanto el acrilodan como el derivado maleimida del pireno reaccionan selectivamente con los grupos tioles, permitiendo de esta manera la marcación sitio-específica de los residuos Cys en las proteínas.

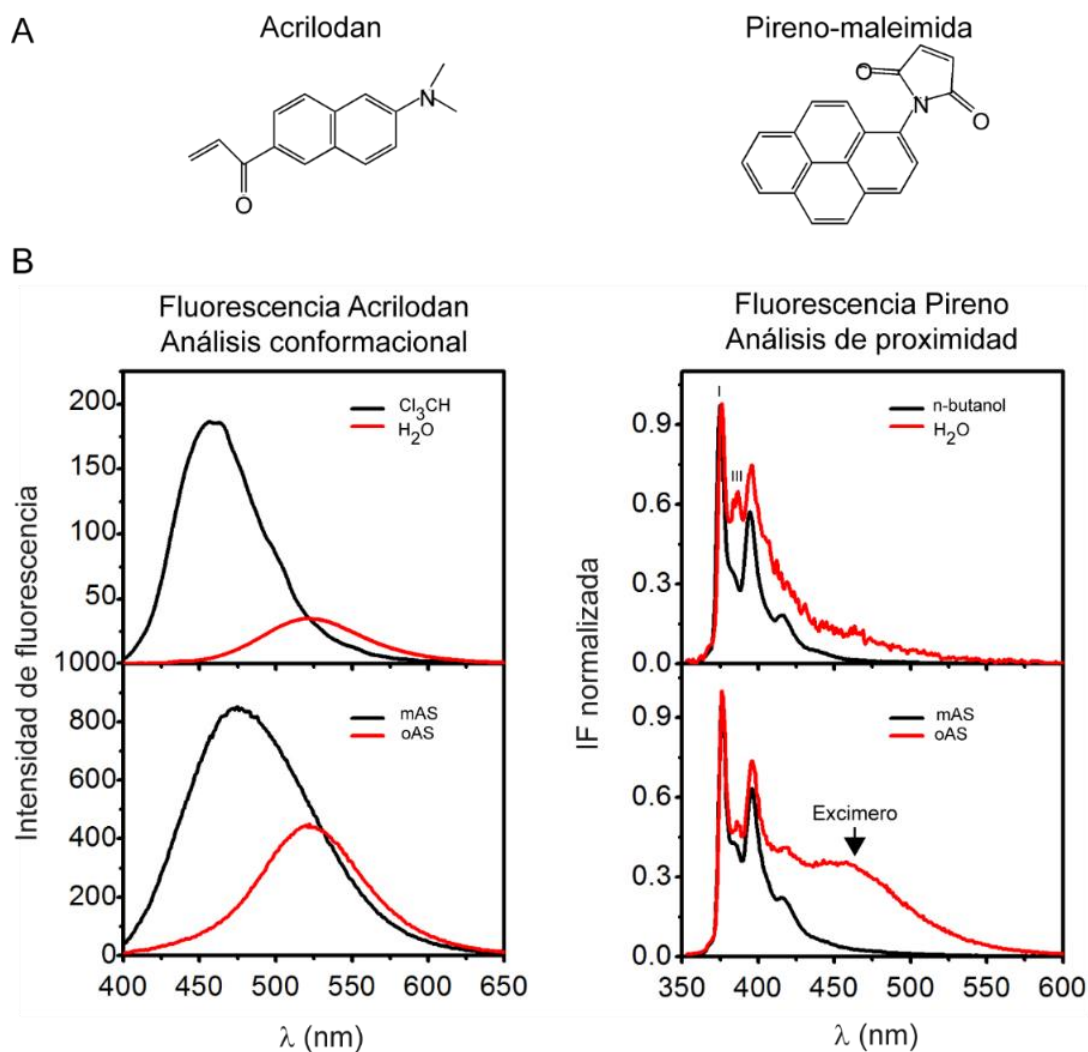


Figura 3.1 Sondas fluorescentes seleccionadas. **A**, estructura química de acrilodan y pireno. **B**, respuesta solvatocrómica de las sondas. Paneles superiores: espectros representativos de GSH marcado con acrilodan (izquierda) o pireno (derecha) en dos solventes de distinta constante dieléctrica. Se señalan los picos I y III de pireno utilizados para obtener el valor Py . Paneles inferiores: AS monomérica (mAS) y oligomérica (oAS) marcada con acrilodan (izquierda) o pireno (derecha) en la posición Ala⁷⁶. Se utilizó la respuesta solvatocrómica de acrilodan y pireno para obtener información conformacional de los diferentes segmentos de AS, mientras que la banda de excímero de pireno se utilizó para reportar sobre proximidades intermoleculares en los oAS.

3.2 Producción de los oligómeros marcados

En el *Capítulo 2* se detallaron los procedimientos experimentales para la producción de los oligómeros marcados con las sondas fluorescentes a partir de la proteína monomérica conjugada a la sonda en posiciones específicas. AS no posee residuos Cys en su secuencia, de manera que se diseñaron racionalmente variantes conteniendo un único residuo Cys en posiciones seleccionadas de la secuencia para su posterior marcaje sitio-selectivo con acrilodan o pireno. Estas posiciones se escogieron de manera de mapear los tres dominios funcionales de AS (Figura 3.2): el dominio anfipático N-terminal, la región central más amiloidogénica y el dominio ácido C-Terminal. Una vez obtenida la proteína marcada se produjeron oligómeros marcados en condiciones sub-estequiométricas, es decir, conteniendo una proporción de 5-25 % de la proteína marcada. Se espera que, debido a la naturaleza estocástica de la agregación, los monómeros marcados se incorporen aleatoriamente en los oligómeros [91, 92]. El protocolo para la producción de los oligómeros está basado en la liofilización de soluciones concentradas de la proteína monomérica [80, 100] obteniéndose una variedad de especies en la solución, entre ellas oligómeros estables de alto peso molecular que pueden ser purificados por filtración.

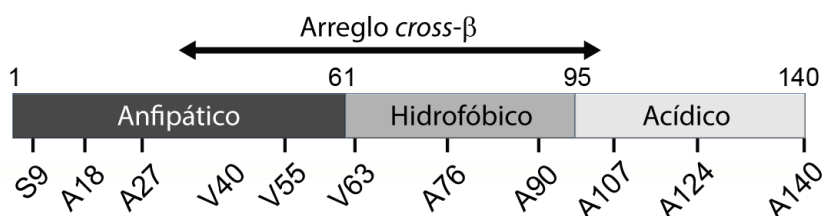


Figura 3.2 Posiciones seleccionadas para la marcaje fluorescente. Se muestran los dominios funcionales de AS donde se destaca la región central de hoja-β amiloide (residuos Leu³⁸-Val⁹⁵) y los aminoácidos que fueron cambiados por Cys en las diferentes variantes para el marcaje sitio-específico con sondas fluorescentes reactivas a tioles.

3.3 Comparación entre los oAS marcados y los oAS de tipo salvaje

A fin de validar que la incorporación de la proteína marcada no alterara las propiedades generales de las especies oligoméricas, primeramente, se realizó una caracterización detallada de estos oligómeros y se comparó con los oAS-WT. En la Figura 3.3 se muestra un ejemplo representativo donde se comparan los resultados obtenidos para la proteína WT y la marcada con acrilodan en la posición Ala⁷⁶, empleando un 5% de la proteína marcada inicial para la producción de los oAS-acri. Tanto los oAS-acri como los oAS-WT muestran la típica banda esparcida en un gel PAGE nativo en gradiente que migra a altas masas moleculares concomitante con la proteína ferritina de 440 KDa utilizada como marcador molecular (Figura 3.3A). La incorporación de la proteína marcada no altera la morfología de los oligómeros como se pudo observar por TEM, en donde ambas especies aparecen como agregados esferoidales y polidispersos (Figura 3.3B). Se constató que los oAS-WT y los oAS-acri no inducen un incremento en la fluorescencia de la sonda sensible a amiloide TioT indicando que ambas especies oligoméricas carecen de la estructura canónica *cross-β* característica de las fibras amiloides (Figura 3.3C). Finalmente, se constató mediante espectroscopia infrarroja que los oAS-acri contienen estructura hoja-β antiparalela, característica distintiva de estas especies [100], como puede inferirse por la presencia concomitante de las bandas centradas a 1625 cm⁻¹ y 1695 cm⁻¹ (Figura 3.3D). En forma comparativa, se incluyen también los espectros de las proteínas monoméricas, cuyos es-

pectros IR están centrados a 1645 cm^{-1} como se espera para las conformaciones mayoritariamente desordenadas y de las fibras amiloides que muestran un máximo prominente a 1627 cm^{-1} , típico de estructura hoja- β paralela (Figura 3.3D). Los mismos ensayos se realizaron para cada población de los oAS producidos empleando diferentes porcentajes iniciales de proteína marcada en las distintas posiciones, tanto con el acrilodan como con el pireno, obteniéndose resultados similares.

Por lo tanto, considerando estos resultados en conjunto, concluimos que los oAS marcados recapitulan las propiedades morfológicas, de polidispersidad, de tinción y de estructura secundaria de los oAS-WT.

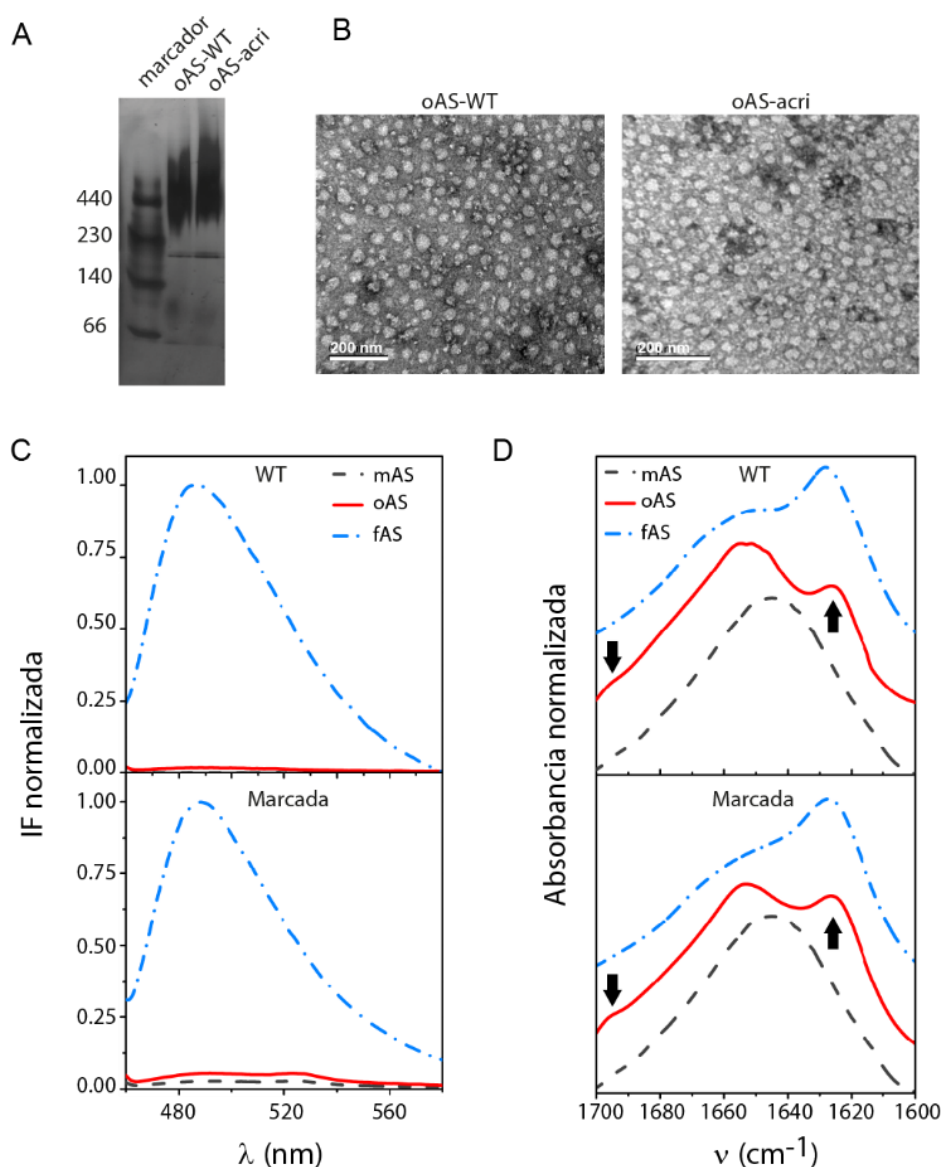


Figura 3.3 Validación de las propiedades generales de los oAS marcados, ejemplificados con la variante Ala⁷⁶ marcada con acrilodan. **A**, electroforesis en gel nativo en gradiente de poliacrilamida (4-15 %). **B**, imagen de microscopía electrónica de transmisión teñida con acetato de uranilo de los oAS-WT y los oAS-acri. **C**, espectro de emisión de fluorescencia de TioT en presencia de oAS-WT (panel superior) y oAS-acri (panel inferior), junto con las señales correspondientes para monómeros (mAS) y fibras (fAS) de AS. **D**, espectro FTIR normalizado en la región amida I de mAS, oAS y fAS WT (panel superior) y marcados (panel inferior). Las flechas señalan las bandas de IR a 1625 cm^{-1} y 1695 cm^{-1} características de la estructura hoja- β antiparalela.

3.4 Polaridad del microambiente con resolución sitio-específica

Posteriormente, se utilizaron las sondas fluorescentes seleccionadas para indagar sobre las propiedades del ambiente proteico en los oAS marcados con resolución sitio-específica. Todas las posiciones ensayadas con la sonda acrilodan mostraron un corrimiento hipsocrómico del espectro de emisión (λ_{\max} 476-491 nm) en oAS-acri en comparación con mAS-acri (λ_{\max} 515-528 nm), indicando que estas posiciones se encuentran escondidas del solvente acuoso en el agregado (Figura 3.4A). Considerando un modelo de medio dieléctrico continuo, la respuesta solvatocrómica del acrilodan abarca un rango de polaridad definido por una constante dieléctrica (ϵ) de ~ 5 -40, estimado de la curva de referencia construida a partir de los espectros de fluorescencia del tripéptido GSH marcado con acrilodan expuesto a solventes puros (Figura 3.4A). El GSH se empleó para brindar un contexto peptídico mínimo en la evaluación del comportamiento solvatocrómico de la sonda en los solventes de referencia. Por lo tanto, basados en las características espectrales de esta sonda, todas las posiciones marcadas en los oAS-acri experimentan microambientes de baja polaridad con ϵ aparentes ~ 10 -20. Estos valores están en el mismo rango que los estimados (10-30) a partir del análisis espectral de los residuos Trp posicionados selectivamente en distintas regiones de la proteína [104]. Estas son sustancialmente más bajas que aquellas encontradas para las mismas posiciones en la forma monomérica ($\epsilon \geq 50$).

En forma complementaria, se empleó la escala P_y de polaridad basada en la respuesta solvatocrómica de pireno. Como se ejemplifica con la curva de referencia obtenida con GSH marcado con pireno disuelto en solventes próticos, cuanto mayor es la polaridad del medio, mayor es el valor de P_y (Figura 3.4B) [131]. Los oAS-pir presentaron menores valores de P_y en comparación a los mAS-pir, indicando un incremento en la hidrofobicidad local que rodea la sonda para todas las posiciones ensayadas, excepto en la posición Ala¹⁴⁰ (Figura 3.4B). Comparando estos resultados con la curva de referencia, las posiciones marcadas en las regiones del N-terminal y central de la proteína, tienen valores de ϵ aparentes ~ 40 en mAS-pir y ~ 30 en los oAS-pir. En ambos casos, las tres posiciones marcadas que se encuentran más hacia el extremo C-terminal exhibieron valores de P_y que se encuentran en el rango de polaridad donde la curva de referencia se aproxima a una meseta, detectando una polaridad del microambiente circundante mucho mayor con valores de ϵ aparentes ≥ 60 . Estos valores elevados de P_y correlacionan con la alta carga neta (-16) y la fuerte hidrofiliidad predicha para esta región (los índices promedios de hidropatía calculados según la escala de Kyte-Doolittle son 0,14 para el dominio N-terminal, 0,80 para la región central y 1,48 para el extremo C-terminal). Los perfiles de polaridad obtenidos para los oAS-pir se asemejan a los reportados para las variantes Trp de AS [104]. Pareciera que los complejos ciclos fotofísicos responsables de la fluorescencia de Trp y pireno están influenciados por la naturaleza química específica de esta región de la proteína, ya que la misma tendencia se observó para las especies monoméricas y oligoméricas. Si bien no se informaron valores de ϵ aparentes en el caso de las variantes de Trp, se pueden estimar valores ~ 50 -65 para dos posiciones marcadas en el dominio C-terminal en los oligómeros, en concordancia con nuestros resultados [104].

Las discrepancias en los valores absolutos de ϵ aparentes estimados a partir de la respuesta espectral de las diferentes sondas solvatocrómicas (acrilodan y pireno en este trabajo y Trp en Ref. [104]) podrían surgir de parámetros adicionales como hidratación, viscosidad e interacciones específicas, que influyen la relajación del microambiente del estado excitado de la sonda [131]. Estos parámetros son difíciles de predecir en el ambiente altamente anisotrópico de una proteína, de manera que es difícil establecer una correlación inequívoca entre la respuesta en estado estacionario del fluoróforo y la polaridad del medio en términos de valores de ϵ macroscópicos. Debido a estas limitaciones experimentales, consideramos los cambios

relativos observados entre la forma monomérica y oligomérica de la proteína más informativos que los valores absolutos *per se*. Por lo tanto, los resultados obtenidos con las diferentes sondas indican que todas las posiciones ensayadas se encuentran en entornos de baja polaridad luego del proceso de oligomerización.

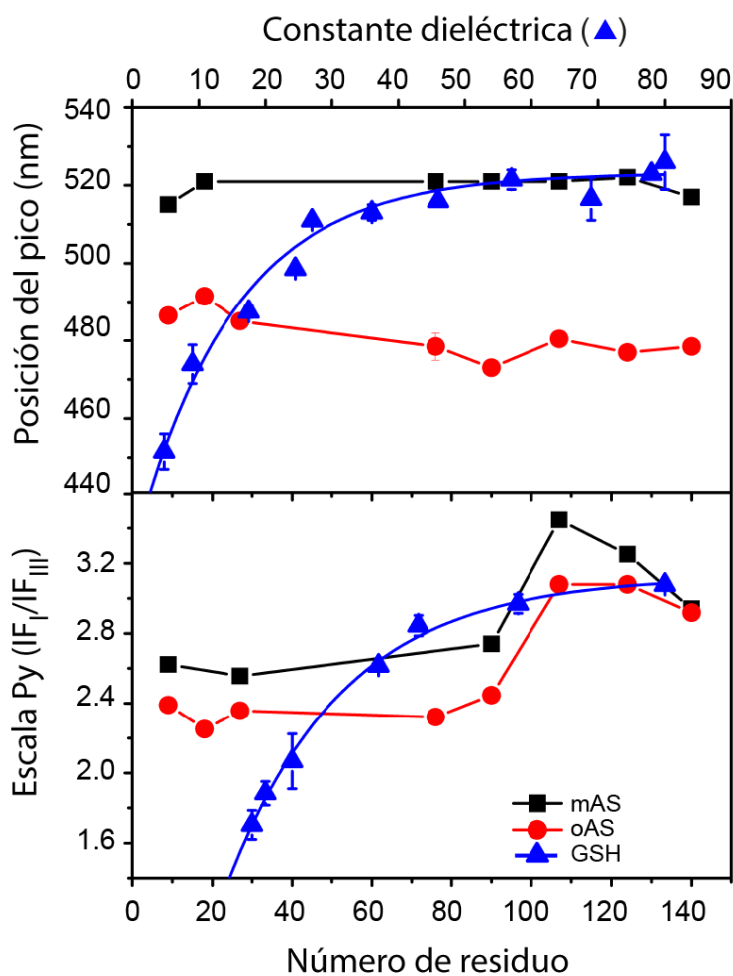


Figura 3.4 Polaridad del microambiente residuo-específica en los oAS. Características espectrales de mAS (■) y oAS (●) marcados con acrilodan (panel superior) y pireno (panel inferior). La longitud de onda de la banda de emisión de acrilodan y la escala Py de pireno, definida como la relación de intensidades de la primer (375 nm) y tercer (385 nm) banda de emisión, se grafican en función de la posición marcada con la sonda fluorescente. La proporción inicial de proteína marcada fue de 5 % en ambos casos. Como referencia se muestra la variación espectral de las sondas conjugadas a GSH en solventes de constantes dieléctricas crecientes (▲). En el caso de acrilodan se utilizaron los siguientes solventes: Cl_3CH , Cl_3CH :etanol (12,5 %), n-butanol, etanol, mezclas de H_2O :dioxano (50, 45, 35, 25, 15 y 5 %) y H_2O , mientras que para pireno se utilizaron los solventes próticos n-butanol, n-propanol, etanol, etilenglicol, glicerina, ácido fórmico y H_2O . La concentración de sonda fue $\sim 1 \mu M$.

3.5 Estabilidad conformacional de los oAS con resolución sitio-específica

Se realizaron experimentos de desnaturalización química inducida por GdmCl en los oAS-acri para reportar sobre la estabilidad conformacional de diferentes segmentos de la proteína en el agregado. Para ello, muestras de los oAS marcados con acrilodan se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente en presencia de concentraciones crecientes del desnaturalizante previamente a la adquisición de los espectros de fluorescencia. Este tiempo fue suficiente para alcanzar el equilibrio ya que la misma respuesta espectral se obtuvo luego de equilibrar las muestras durante 17 h (Anexo Figura A.1A). En la Figura 3.5A se muestran los espectros de emisión de cada población de los oAS-acri a concentraciones crecientes de GdmCl. Para una mejor comparación entre las diferentes variantes, los espectros se escalaron en relación a la intensidad absoluta de los espectros obtenidos a 4 M GdmCl (Anexo Figura A.1B), incluyendo así información sobre los rendimientos relativos entre las diferentes variantes.

Los espectros de emisión de las diversas variantes de los oAS-acri decrecieron en intensidad y se desplazaron hacia el rojo (de 477-485 a 530 nm) con el incremento de la concentración de desnaturalizante (Figura 3.5A). Esto es consistente con la remoción de la sonda de un medio de baja polaridad y su exposición al ambiente acuoso. Dado que la intensidad de fluorescencia está directamente relacionada a la fracción molar de los estados conformacionales en equilibrio [132], se utilizaron los cambios en intensidad de fluorescencia a 480 nm como un parámetro para evaluar la transición conformacional (Figura 3.5B, panel superior). La elección de esta longitud de onda se debe a la mayor sensibilidad de esta región del espectro, pero la misma tendencia se observó analizando los cambios a 510 nm. A modo de comparación se incluyen también los valores de λ_{\max} denotando los desplazamientos batocrómicos durante la desnaturalización (Figura 3.5B, panel inferior).

En ausencia de desnaturalizante, las posiciones localizadas hacia el dominio C-terminal, Ala¹²⁴ y Ala¹⁴⁰, exhibieron mayor rendimiento de fluorescencia que las otras posiciones, lo cual podría reflejar la falta de interacciones que favorezcan el apagamiento de la sonda en esta región (Figura 3.5A). La ausencia de puntos isosbéticos claros en los espectros de emisión de fluorescencia sugiere que el equilibrio de desplegamiento químico de los oAS-acri es más complejo que un simple mecanismo de dos estados. Las transiciones comienzan a la concentración de GdmCl más baja utilizada (0,25 M) y culminan a 1,75 M con puntos medios aparentes de 0,65 M (Figura 3.5B, panel superior). La posición Ala¹⁴⁰ exhibió una estabilidad menor, con un punto medio de desnaturalización de 0,35 M, mientras que la de la posición Ala²⁷ fue mayor, con un punto medio de 1,1 M GdmCl (Figura 3.5B, panel superior). Los corrimientos en λ_{\max} no correlacionaron con los cambios en intensidad, probablemente debido a la naturaleza compleja de la transición de desplegamiento (Figura 3.5B, panel inferior). De todas maneras, se debe tener en cuenta que la posición de la banda de emisión no es, *a priori*, proporcional a la población de los estados y puede conducir a una asignación sesgada hacia el estado con el mayor rendimiento cuántico [132] como en nuestro caso los oAS-acri en ausencia de desnaturalizante.

A modo comparativo, se estimó la transición global de desplegamiento mediante electroforesis en condiciones nativas empleando geles en gradiente para discriminar los mAS, los oAS y cualquier intermediario de disociación que pudiera poblarse a las distintas concentraciones de desnaturalizante (Figura 3.5C). La transición global para los oAS-WT y los oAS-acri fue de ~1 M GdmCl indicando que la marcación no altera significativamente la estabilidad de los oligómeros. Por otro lado, teniendo en cuenta que no se detectaron especies oligoméricas intermedias en el gel y que la estabilidad global estimada es cercana a la observada para la variante Ala²⁷ (Figura 3.5B, panel superior), podemos inferir que el complejo comportamiento de

desnaturalización química observado por fluorescencia podría deberse a cambios locales en el microambiente de la sonda previos al desplegamiento global.

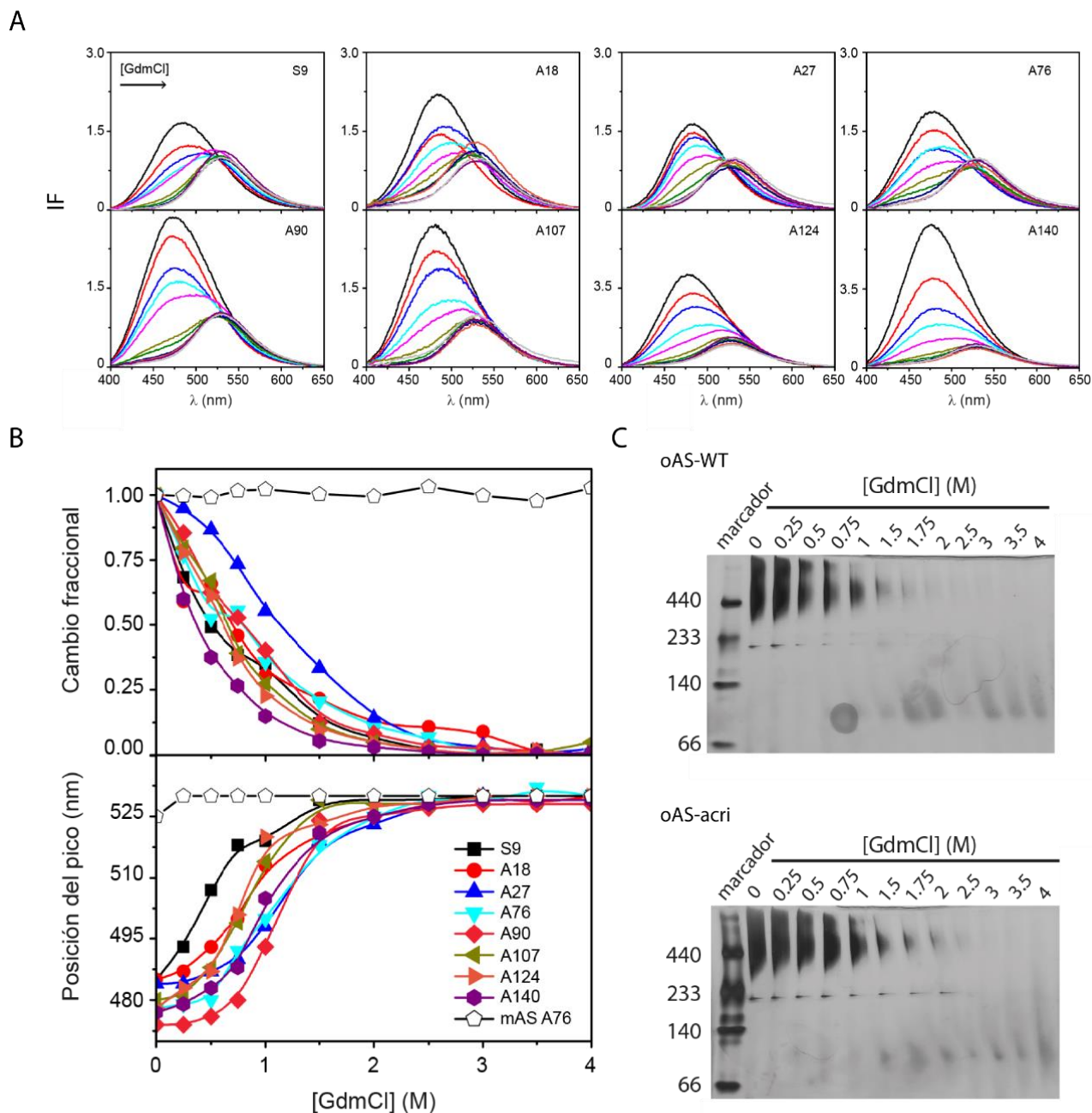


Figura 3.5 Estabilidad conformacional de los oAS-acri. **A**, Espectros de fluorescencia de oligómeros marcados con acrilodan a diferentes posiciones a lo largo de la secuencia de la proteína a concentración crecientes de GdmCl. **B**, Perfiles de desnaturalización química de los oAS-acri inducidos por concentraciones crecientes de GdmCl monitoreados por el cambio fraccional en la intensidad de fluorescencia a 480 nm (panel superior) y la longitud de onda del máximo de emisión (panel inferior) de la sonda. Se muestran a modo de comparación los cambios espectrales del monómero marcado en la posición Ala⁷⁶ (●). **C**, geles nativos en gradiente de poliacrilamida (4-15 %) de los oAS-WT (panel superior) y los oAS-acri (panel inferior) preincubados en concentraciones crecientes de GdmCl. Los geles se sobre-tiñeron para revelar la presencia, en caso de que hubiera, de especies intermedias parcialmente disociadas pobladas en poca cantidad.

3.6 Mapeo de contactos intermoleculares en los oAS

Utilizamos la capacidad que tiene el pireno de formar excímeros (λ_{\max} 460 nm) dependientes de la distancia con el objetivo de mapear proximidades intermoleculares entre monómeros vecinos en el ensamble oligo-

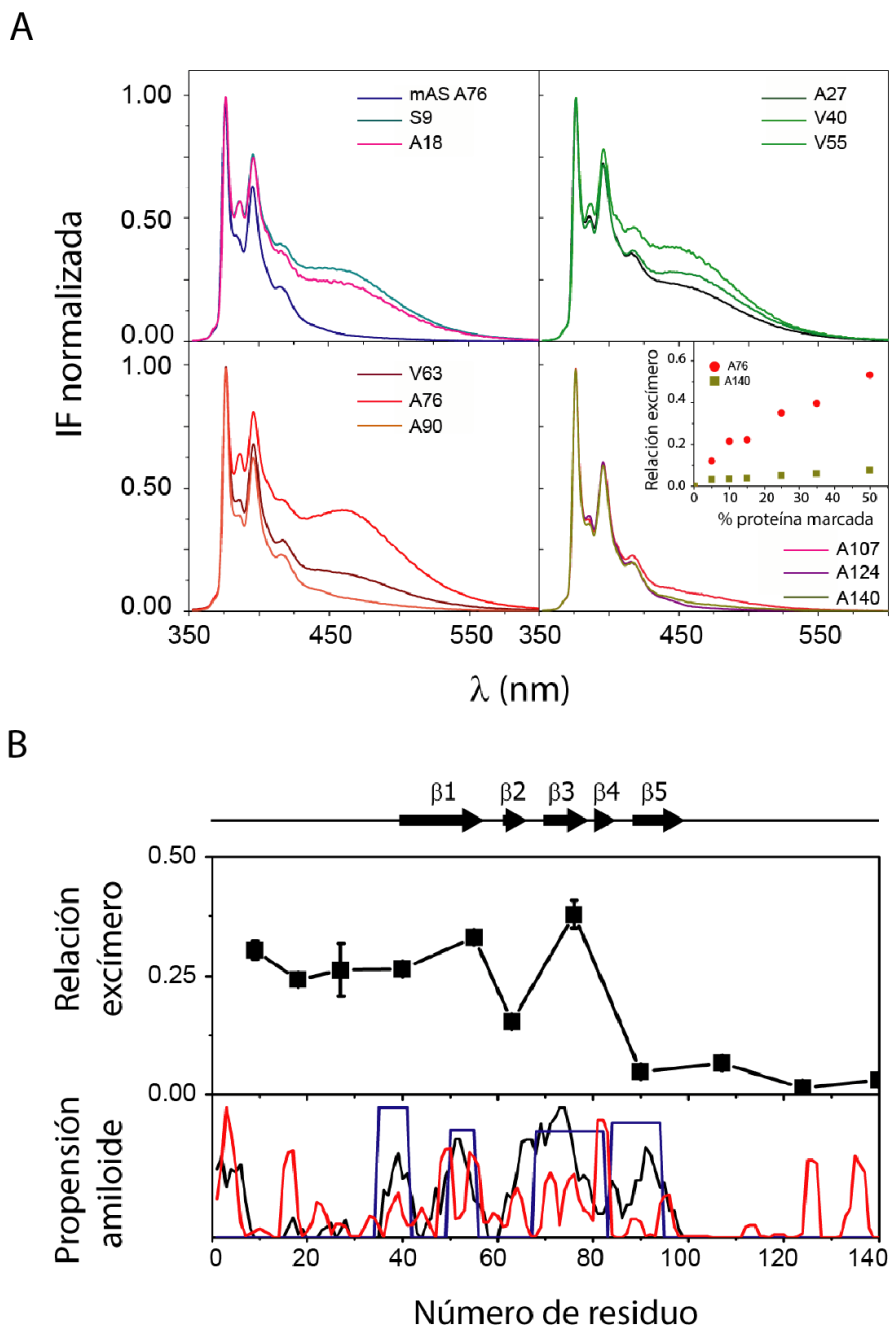


Figura 3.6 Proximidades intermoleculares en los oAS-pir marcados en posiciones únicas. **A**, espectros de emisión de fluorescencia de los oAS marcados con pireno en diferentes posiciones a lo largo de la secuencia de la proteína. Se incluye para comparación el monómero marcado en la posición Ala⁷⁶. Para una mejor visualización, los espectros se normalizaron respecto a la intensidad del pico I (375 nm). En el inserto se muestra la relación de excímero de oAS-pir marcados en la posición Ala⁷⁶ o Ala¹⁴⁰ a diferentes proporciones de proteína monomérica marcada inicial. **B**, análisis de proximidad evaluado por fluorescencia de excímero en los oAS-pir marcados en posiciones individuales (panel superior) junto con la propensión a agregar predicha por el algoritmo Zyaggregator (—) y WALTZ (—) y la propensión a formar hoja- β (—) predicha por TANGO (panel inferior). Las hojas- β definidas dentro del corazón *cross- β* fibrilar según el modelo propuesto por Tuttle y col. (ref. [88], código PDB 2N0A) están representadas por flechas negras y numeradas de 1 a 5.

mérico. Los espectros de fluorescencia de los oAS-pir marcados en un único sitio se muestran en la Figura 3.6A mientras que la relación de excímero, definido como la relación de intensidades de las bandas a 460 y 375 nm, se incluyen en la Figura 3.6B.

La señal de excímero en los oAS-pir marcados en posiciones únicas (25 % mAS-pir, 75 % mAS-WT) mostraron bandas de fluorescencia de excímero dependiente de la posición de la conjugación de la sonda (Figura 3.6A). El hecho que se observaran señales de excímeros débiles en algunas de las posiciones indica que las moléculas de pireno no inducen interacciones intermoleculares artificialmente, sino más bien que informan sobre la disposición espacial de los monómeros de AS en el oligómero. Para una confirmación posterior, se realizaron experimentos adicionales con los oAS-pir marcados en la posición Ala⁷⁶, la variante que exhibió la mayor relación de excímero, variando la proporción inicial de los mAS-pir. La disminución en la señal de excímero con el incremento en la proporción de los mAS-WT (recuadro en Figura 3.6A) demostró que las moléculas de pireno no muestran una asociación/proximidad preferencial entre sí cuando se forma el agregado y que se obtienen intensidades de excímero bajas cuando se reduce la probabilidad de que dos moléculas de pireno estén espacialmente cerca.

El perfil de las relaciones de excímero en función del número de residuo (Figura 3.6B) reveló valores altos para residuos localizados en el extremo N-terminal y la región central de la proteína (desde el extremo N-terminal hasta el residuo Ala⁷⁶, denominados sitios de la cabeza), siendo la posición Ala⁷⁶ la de mayor intensidad de señal. Estos resultados indican que cada una de las posiciones ensayadas se encuentran cercanas (<10 Å) a la misma posición en los monómeros vecinos en los oAS. Por el contrario, las bajas intensidades de excímero en la porción C-terminal de la proteína (desde residuo Ala⁹⁰ hasta el extremo C-terminal denominados sitios de la cola) sugieren que los residuos marcados no estarían próximos entre ellos (>10 Å). Estos resultados revelan la importancia de la región N-terminal en el auto-ensamblado amiloide.

Finalmente, se realizaron mezclas de una serie de monómeros de AS marcados con pireno en diferentes posiciones seleccionadas en todas las combinaciones binarias equimolares posibles para identificar potenciales interacciones intermoleculares que involucren residuos localizados en distintas regiones de la proteína. Los resultados se muestran en la Figura 3.7. En este caso, la cantidad de cada una de las proteínas marcadas se redujo a la mitad (12,5 % cada proteína marcada, 75 % mAS- WT) para disminuir señales de excímero esperadas por interacciones entre las mismas posiciones. En las variantes que exhibieron alta fluorescencia de excímero (sitios de la cabeza en la Figura 3.7), una disminución a la mitad de la cantidad de proteína marcada inicial resultó en una reducción del 50 % de la señal de excímero, equivalente a la tendencia mostrada previamente para la variante Ala⁷⁶ (recuadro, Figura 3.6A). De esta manera, una nueva interacción se evidenciará si la señal de excímero obtenida a partir de las mezclas binarias es superior a la esperada de una combinación de dos soluciones de los oAS-pir marcados en un único sitio. En forma similar a lo observado para los oAS-pir de posiciones únicas, los oAS-pir obtenidos de las mezclas binarias en la región de la cola produjeron una muy baja señal de excímero (Figura 3.7), sugiriendo que estas posiciones no contribuyen a contactos intermoleculares por sí mismas. Las señales más intensas surgieron en los oAS-pir de los sitios de la cabeza, mientras que se obtuvieron valores intermedios en las combinaciones cabeza-cola. Así, las señales de excímero no revelaron nuevas contribuciones en sitios de la cabeza, excepto posiblemente para la combinación Ser⁹-Ala¹⁸ donde la señal fue superior a la esperada si se mezclaran las dos poblaciones de los oAS-pir marcadas en un único sitio, y tampoco las interacciones cabeza-cola entre los sitios ensayados (Figura 3.7).

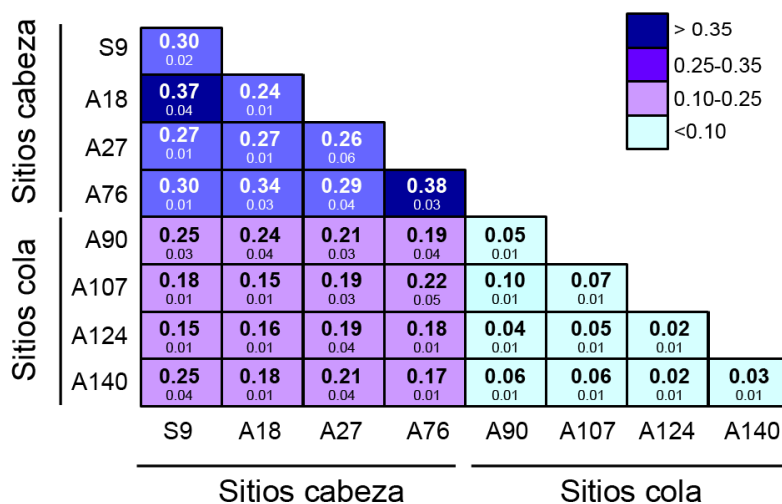


Figura 3.7 Proximidades intermoleculares en los oAS-pir en mezclas binarias. Fluorescencia de excímero de los oAS-pir producidos a partir de mezclas 1:1 de dos variantes de AS marcadas con pireno. Se indican los valores medios de duplicados independientes con sus respectivos errores estándares. Los sitios de la cabeza y de la cola están indicados con líneas.

3.7 Discusión

En este capítulo se abordó uno de los objetivos principales de esta tesis, el de obtener información sobre el arreglo supramolecular de las especies oligoméricas prefibrilares de AS. Como se describió en el *Capítulo 1*, estudios previos demostraron que los oAS contienen una substancial cantidad de estructura hoja- β diferentes a las de las fibras [98, 133] estando organizadas en un arreglo antiparalelo [100]. Además, dentro del núcleo oligomérico que abarca la región comprendida entre los residuos Phe⁴-Ala⁹⁰ [104], los segmentos discretos Phe⁴-Ala¹⁷, Tyr³⁹-Thr⁵⁴ y Val⁷⁰-Ala⁸⁹ exhiben estructuras persistentes estabilizadas por puentes hidrógenos o estructuras protegidas del solvente [105]. En la aproximación presentada en este capítulo, se posicionaron racionalmente etiquetas fluorescentes a lo largo de la secuencia proteica para obtener una representación más detallada de la arquitectura interna de los oAS.

La sensibilidad solvatocrómica de acrilodan y pireno informó de manera sitio-específica sobre cambios del microambiente de la sonda luego de la oligomerización. Todas las posiciones ensayadas se encuentran escondidas del solvente en el oligómero en comparación con el estado monomérico (Figura 3.4). Estos resultados indican una diferencia significativa en el arreglo estructural de las unidades monoméricas en oligómeros comparados con las fibras amiloides ya que en este último caso los dos extremos terminales están excluidos del núcleo fibrilar [82]. La transición de desplegamiento global de los oAS inducida químicamente, reflejando la estabilidad conformacional de estas especies, se estimó en ~ 1 M GdmCl, (Figura 3.6). Este valor es similar al punto medio de transición aparente estimado a partir del comportamiento espectral del acrilodan de la variante Ala²⁷ mientras que es superior al de las otras variantes (Figura 3.6). Estos datos sugieren que las inestabilidades locales en las inmediaciones del fluoróforo dan lugar a intermediarios que preceden el desplegamiento global/disociación de los agregados.

Posteriormente se utilizó la fluorescencia de pireno para determinar proximidades intermoleculares en los oAS. A diferencia de los pares de transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET, por sus siglas en

inglés *Förster Resonance Energy Transfer*) comúnmente utilizados, que permiten la estimación de distancias entre 20 y 80 Å, la fluorescencia de excímero de pireno reporta en un rango más corto de distancia típicamente de 4-10 Å. Esta propiedad se empleó con éxito para obtener detalles estructurales de las fibras amiloides formadas por un prión de levadura [134] y en los oligómeros amiloides tóxicos de una proteína no relacionada a ninguna patología [135], como así también para monitorear la formación de los amiloides de AS [112]. En este trabajo se utilizaron las señales de excímero de los oAS-pir para obtener información sobre las proximidades intermoleculares entre los monómeros dentro del agregado. Si consideramos los segmentos de los que forman las hojas- β en el ensamblado fibrilar de AS propuesto por Tuttle y colaboradores [88] (Figura 1.6C), las posiciones Val⁴⁰, Val⁵⁵ y Ala⁷⁶ exhibieron las mayores relaciones de excímero en los oAS que poseían pirenos en sitios únicos (Figura 3.7). Esto infiere sobre cercanía entre el residuo marcado y el mismo residuo marcado en una o más moléculas vecinas. Notablemente, estos residuos pertenecen a las hojas β 1 y β 3 que se forman en las fibras [88]. Incluso, estas regiones contienen puntos de anclaje críticos (Tyr³⁹) de inhibidores amiloides [136], una mutación (A53T) relacionada al inicio temprano de la EP y a tasas más rápidas de oligomerización y fibrilación *in vitro* [137, 138] y el tramo hidrofóbico (Val⁷¹-Val⁸²) crítico para la formación de las fibras [21]. Por lo tanto, debido a la importancia de estas regiones en la formación amiloide y a las altas relaciones de excímero encontradas, postulamos que contactos mediados por las regiones β 1- β 1 y β 3- β 3 podrían estar involucrados en interacciones oligoméricas tempranas, probablemente formando estructuras hoja- β antiparalelas [100]. A pesar de que no se puede excluir que la señal de excímero podría deberse a hoja- β apiladas, dicha interpretación correlaciona con la alta propensión de estos segmentos de formar estructuras amiloides (Figura 3.7B). Por otro lado, basado en la extrema baja intensidad de excímero de la variante Ala⁹⁰, si la hebra β 5 está formada en los oAS, no estaría involucrada en contactos β 5- β 5 en una manera que favorezca la formación de excímero.

Se determinaron altas señales de excímero para los oAS-pir marcados en sitios de la cabeza que no están involucrados en contactos hoja- β fibrilares [82, 85] (Figura 3.7). Estas evidencias sugieren fuertemente un alto empaquetamiento al menos para la región que abarca los residuos Ser⁹-Ala⁷⁶ y que probablemente reflejan la adopción de una estructura definida. Estos resultados correlacionan con estudios previos que delimitan el núcleo de los oAS entre los residuos Phe⁴-Ala⁹⁰ [104], donde segmentos específicos de la cadena peptídica presentan una dinámica conformacional reducida [105]. Además, los resultados evidencian el importante rol del extremo N-terminal de la proteína en las interacciones oligoméricas tempranas. En este aspecto, resulta interesante mencionar que un gran número de pequeñas moléculas anti-amiloides se unen preferencialmente a las regiones comprendidas entre los residuos Val³-Lys²³ y/o Leu³⁸-Gly⁵¹ [136, 139].

Como se discutió previamente, el perfil de excímero sugiere que las regiones β 5 no se encuentran próximas en los oAS (Figura 3.7). Teniendo en cuenta que la posición Ala⁹⁰ experimenta ambientes de baja polaridad en los oAS (Figura 3.4) y tiene una alta propensión amiloide (Figura 3.7B), se espera que la región que posee la posición Ala⁹⁰ esté estructurada y estableciendo interacciones inter-cadena. A pesar de que no se encontraron indicaciones de proximidades espaciales entre Ala⁹⁰ y los otros sitios de la cabeza y la cola (Figura 3.8), esta podría estar interaccionando con otros residuos en la proteína que no fueron explorados en nuestro estudio. Esta hipótesis correlaciona con el hecho que la región β 5 establece contactos terciarios de largo alcance en la proteína monomérica [28] y que la posición Ala⁹⁰ está escondida del solvente en los oligómeros formados por las variantes Trp [104].

Un comportamiento similar se observó para otros residuos localizados en la región de la cola, es decir que parecen estar espacialmente separados entre ellos (Figura 3.8) y de otros residuos en la región de la cabeza

(Figura 3.8), pero experimentan un ambiente más hidrofóbico si se comparan con la proteína monomérica (Figura 3.4). Basados en estos resultados y teniendo en consideración la habilidad del extremo C-terminal para establecer interacciones terciarias intra- [27, 28, 140, 141] e inter-cadena [142] con los extremos N-/C-terminales así como la sensibilidad de la respuesta de diversos fluoróforos posicionados en ambos extremos de la proteína a estadios tempranos de formación amiloide [112, 143-145], esperamos que los sitios de la cola estén empaquetados con otras regiones de la proteína y probablemente, participando en interacciones y estructuras regulares.

Como se mencionó anteriormente, la formación amiloide de AS demanda una reorganización estructural significativa durante el proceso de amiloidogénesis. Una variedad de contactos terciarios transitorios están presentes en la proteína monomérica soluble que pueden conducir a la formación de especies tempranas propensas a la agregación [28]. Posteriormente, se formarían intermediarios oligoméricos ricos en estructura hoja- β [100], probablemente involucrando interacciones intermoleculares $\beta 1$ - $\beta 1$ y $\beta 3$ - $\beta 3$ (este trabajo). El remodelado de la red de estas interacciones hoja- β tempranas conduce a la formación de fibras amiloides con una estructura de hojas- β paralelas en registro donde cada monómero está plegado formando una estructura con forma de llave griega [88] (Figura 3.8). Esta interpretación requiere demostrar que intermediarios conteniendo estructura hoja- β antiparalela efectivamente se forman en los estadios tempranos de la agregación amiloide, lo cual será abordado en el *Capítulo 4*.

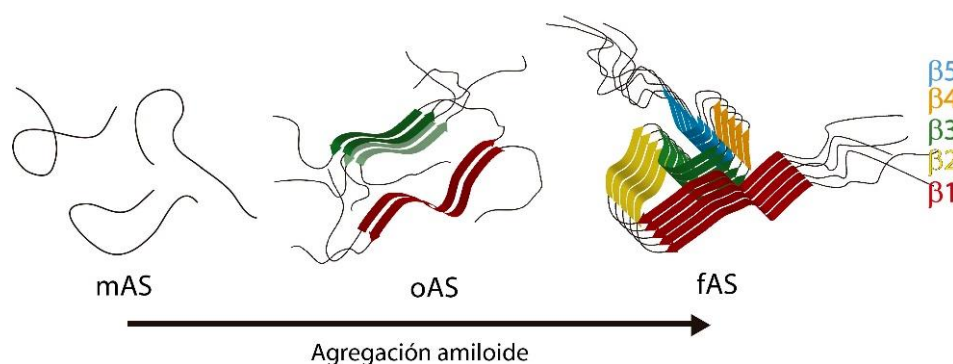


Figura 3.8 Representación esquemática de la reorganización de los segmentos que participan en interacciones hoja- β durante el proceso de amiloidogénesis.

El enfoque basado en fluorescencia sitio-específica presentado en este capítulo en conjunción con estudios estructurales [100, 133], patrones de dinámica conformacional [105] y números de agregación [91, 92] indican que los oAS son ensamblajes de agregados ordenados con distintos tamaños. Los datos reportados proveen restricciones moleculares para el desarrollo de modelos moleculares de los oAS que son cruciales para mejorar el entendimiento de las bases estructurales de la toxicidad inducida por los oligómeros y para el diseño racional de drogas antiamiloidogénicas dirigidas a prevenir las interacciones que favorecen la oligomerización y/o reorganización de las mismas que lleven a la formación de fibras amiloides.

Parte de los resultados presentados en este capítulo se publicaron en **Gallea, J.I.** and M.S. Celej, *Structural insights into amyloid oligomers of the Parkinson disease-related protein α -synuclein*. J Biol Chem, 2014. **289**(39): p. 26733-42.

Capítulo 4 - Resultados



Capítulo 4 Remodelado estructural de AS y AS-Ac durante amiloidogénesis

En el capítulo precedente, demostramos que las especies oligoméricas de AS son agregados ordenados con un patrón definido de contactos intermoleculares. Los mismos están organizados en un arreglo hoja- β antiparalelo distinto al arreglo paralelo de las fibras, indicando que el proceso de conversión de oligómeros a fibras demanda un extenso re-arreglo estructural. Estudios recientes demuestran que este proceso de transformación en sí mismo tiene un rol crucial en la toxicidad celular y neurodegeneración [76-78]. En este capítulo, utilizamos ATR-FTIR para obtener información sobre la transformación estructural durante el proceso de amiloidogénesis de AS y, en forma complementaria, de la forma fisiológica de la proteína AS-Ac.

4.1 Obtención y caracterización de los mAS-Ac

Como se mencionó en el *Capítulo 1*, AS *in vivo* se encuentra acetilada en el extremo N-terminal tanto en condiciones fisiológicas como patológicas [19]. Sin embargo, la gran mayoría de los estudios bioquímicos y biofísicos realizados *in vitro* hasta el momento, se llevaron a cabo empleando la proteína obtenida en forma recombinante en bacterias las cuales carecen de un equivalente al complejo N ^{α} -acetiltransferasa (Nat) de las células eucariotas y por lo tanto no pueden realizar dicha modificación co-traducciona. A fin de validar las características distintivas de los distintos ensamblajes conformacionales y de estudiar la remodelación estructural en la forma fisiológicamente relevante de la proteína, implementamos un sistema recombinante de co-expresión para la obtención de los mAS-Ac. Para ello, nos basamos en la reciente publicación del grupo del Dr. Mulvihill [146], en la cual reportaron un método de co-expresión en *E. coli* del complejo NatB de la levadura *Schizosaccharomyces pombe* y proteínas blanco para la acetilación N-terminal de las proteínas eucariotas.

El plásmido para la expresión del complejo NatB fue cedido gentilmente por el Dr. Mulvihill. Las bacterias co-transformadas con ambos plásmidos se seleccionaron empleando un medio de cultivo suplementado con los antibióticos ampicilina y cloranfenicol. La expresión y purificación se realizó de manera similar a AS, como se detalla en el *Capítulo 2*. Para verificar la modificación co-traducciona, se procedió a analizar las proteínas mediante ESI-TOF-MS (Figura 4.1). Luego de realizar una deconvolución por cargas, la masa molecular obtenida para los mAS fue de 14460 Da, en coincidencia con la masa esperada de 14460 Da, mientras que para los mAS-Ac se obtuvo una masa molecular de 14502 Da (masa esperada de 14502,1 Da) consistente con la adición de un solo grupo acetilo (Figura 4.1A).

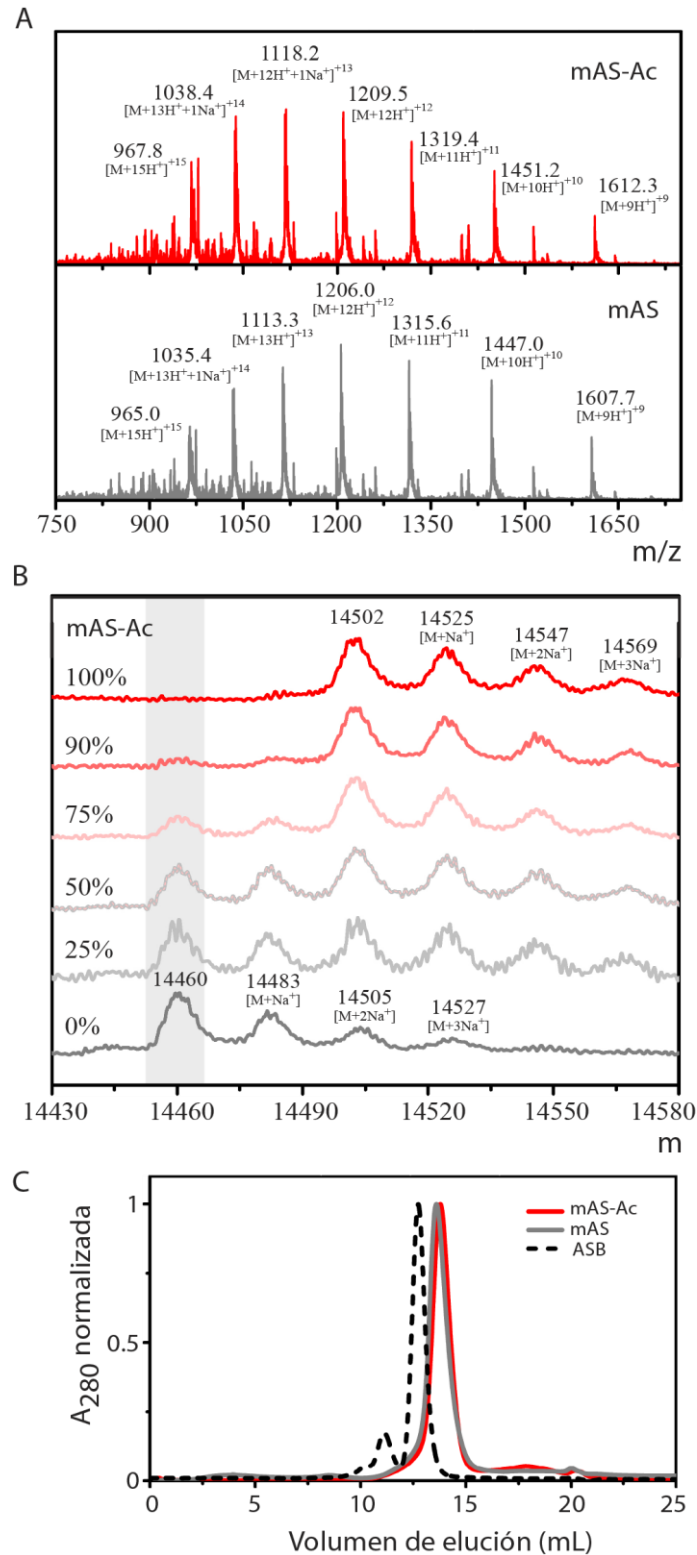


Figura 4.1 Identificación de la acetilación de AS *in vitro*. **A**, Caracterización de mAS-Ac (—) y mAS (—) recombinante mediante ESI-TOF-MS. Los picos están marcados con el estado de carga $[M + xH + xNa]^{x+}$, donde M es la masa molecular de la proteína. **B**, espectro de masa neutro de las mezclas de mAS a concentraciones crecientes de mAS-Ac obtenidos por deconvolución de los datos utilizando el Algoritmo de Máxima Entropía. El rectángulo gris indica la posición del pico de los mAS. Los aductos de sodio se indican en los picos correspondientes. El código de color de las líneas es el mismo que el del panel A. La graduación de colores indica las distintas proporciones empleadas en las mezclas. **C**, Cromatograma de filtración molecular. Se utilizó albumina sérica bovina (ASB, - -) como referencia.

Para determinar la eficiencia de acetilación, se realizaron mezclas de la proteína obtenida del sistema de co-expresión con distintas proporciones de mAS y se analizaron mediante ESI-TOF-MS. Los espectros de masa neutros se incluyen en la Figura 4.1B. A medida que se redujo la proporción de mAS en la mezcla, la intensidad del pico correspondiente a dicha proteína decreció, mientras que el de mAS-Ac aumentó. El pico de los mAS fue incluso detectable en la mezcla que contenía solo un 10 % de mAS, mientras que no fue resuelto en el espectro de la proteína obtenida de la co-expresión. De estos datos se puede concluir que la eficiencia de acetilación es mayor al 90 %.

Finalmente, se evaluó el comportamiento hidrodinámico mediante cromatografía de exclusión molecular, donde ambas proteínas eluyeron como un único pico a 13,5 mL, un volumen de elución comparable al de albumina sérica bovina, una proteína globular de ~66 KDa (Figura 4.1C). Este comportamiento se debe a la naturaleza desordenada del ensamble monomérico nativo [32, 147].

4.2 Propiedades generales de los distintos ensambles conformacionales de AS y AS-Ac

Una vez confirmada la eficiencia del método de acetilación y caracterizados los mAS y mAS-Ac, se indujo la formación de oligómeros y fibras a partir de los mAS (oAS y fAS) y los mAS-Ac (oAS-Ac y fAS-Ac) empleando los protocolos descritos en *Capítulo 2*. Los tres ensambles conformacionales, es decir monómeros, oligómeros y fibras, se caracterizaron mediante técnicas biofísicas complementarias.

Primeramente, se analizó la dispersión y morfología de los tres ensambles mediante electroforesis en condiciones nativas y microscopia electrónica. Consistente con la cromatografía por exclusión por tamaño (Figura 4.1C), mAS y mAS-Ac migraron en un gel nativo en gradiente a una masa molecular aparente ligeramente superior a 66 KDa (Figura 4.2A) y mostraron micrografías desprovistas de agregados de tamaño nanoscópico (Figura 4.2B). Similar a lo mostrado en el capítulo anterior, tanto los oAS como los oAS-Ac migraron como una banda esparcida en un gel PAGE nativo en gradiente a masas moleculares comparables con la proteína ferritina de 440 kDa utilizada como marcador molecular, indicando que ambos ensambles consisten en agregados de distintos tamaños, pero no monómeros. Estos oligómeros se observaron como especies esféricas polidispersas en las imágenes de TEM con diámetros de entre 20 y 60 nm sin diferencias aparentes entre la proteína modificada y la no-modificada (Figura 4.2B). Por otro lado, las fAS y las fAS-Ac no se detectaron en el gel ya que por su gran tamaño no pueden ingresar a la matriz polimérica. Ambas especies se observaron como estructuras fibrilares no ramificadas, de varios micrómetros de largo y con diámetros de 9 - 14 nm (Figura 4.2B).

Posteriormente, se realizaron caracterizaciones estructurales de los tres ensambles conformacionales con la ayuda de sondas fluorescentes con distintas propiedades. A concentraciones equivalentes, las fAS y las fAS-Ac mostraron una intensidad de fluorescencia de TioT de más de diez veces en comparación a los monómeros y oligómeros correspondientes (Figura 4.2C). Estos datos sugieren que la naturaleza de la estructura hoja- β en los oAS-Ac es diferente a las de las fibras, como se mencionó anteriormente para los oAS (*Capítulo 3* y ref. [93, 94, 100, 133]).

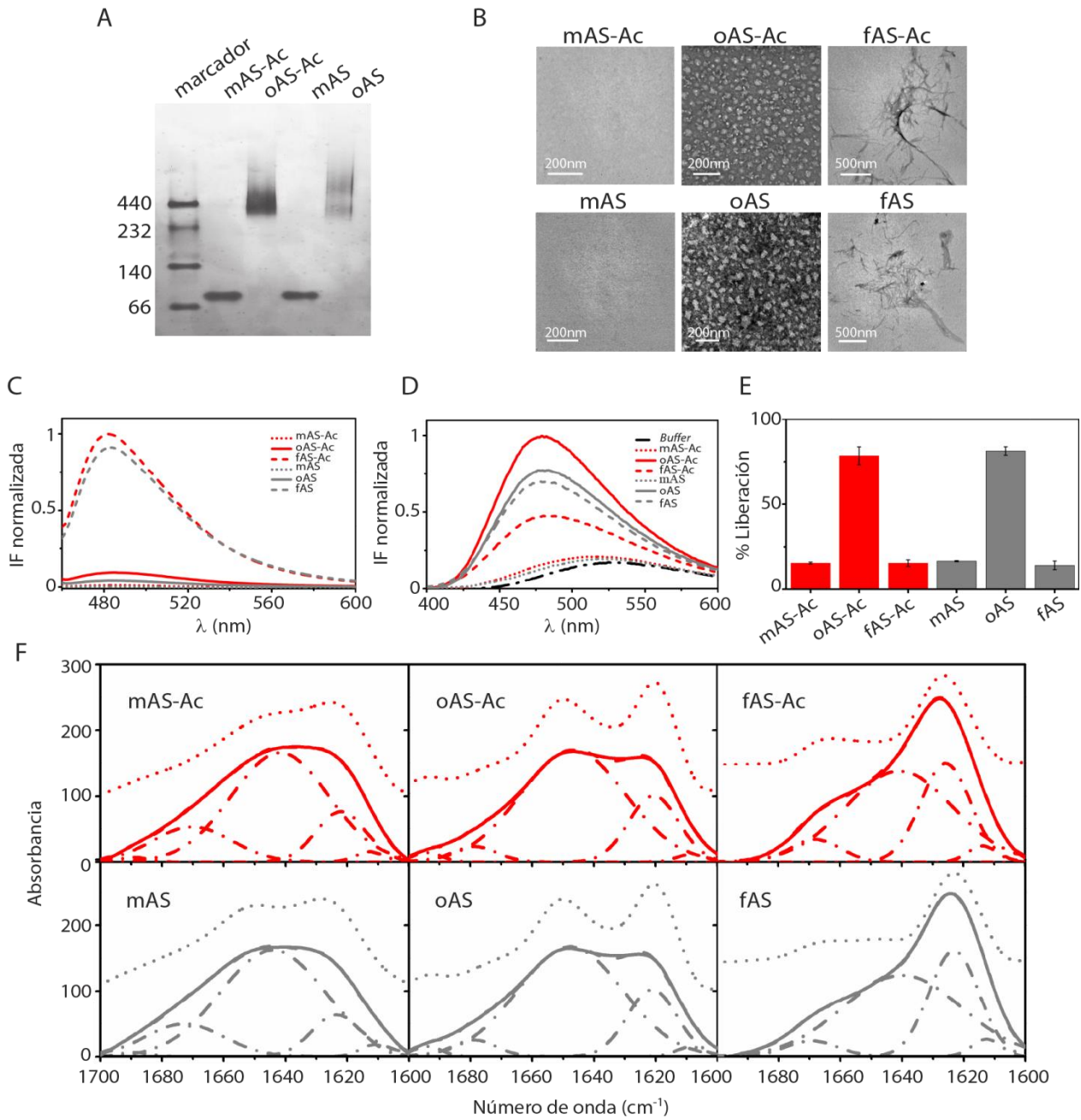


Figura 4.2 Propiedades generales de los ensambles conformacionales de AS-Ac y AS. **A**, gel PAGE nativo con un gradiente de poliacrilamida de 4 a 15 % teñido con AgNO_3 . **B**, Imágenes de microscopía electrónica de transmisión de muestras teñidas con acetato de uranio. **C**, Espectros de emisión de fluorescencia normalizados de TioT. **D**, Espectros de emisión de fluorescencia normalizados de ANS. **E**, Liberación de CF de LUVs compuestas de POPG. **F**, Espectros de absorbancia de FTIR normalizados por el área en la región amida I' de las distintas especies de AS-Ac o AS. En **E** se muestran los valores medios \pm la desviación estándar (σ) de tres experimentos independientes. En **F**, los espectros se ajustaron utilizando cinco componentes espectrales ($\text{---} \bullet \text{---}$) y las resultantes (---) se superponen con los espectros originales. Se incluyen también los espectros auto-deconvolucionados de Fourier ($\bullet \bullet \bullet$) con un factor de aumento de la resolución $K=1,8$, desplazados para una mejor visualización.

En forma complementaria, se utilizó la sonda solvatocrómica 1,8-ANS para evaluar el grado de accesibilidad a parches hidrofóbicos en cada especie. La emisión en estado estacionario de la sonda en la presencia de mAS y mAS-Ac fue baja con un máximo centrado a ~ 515 nm, similar a la fluorescencia observada en *buffer*

(Figura 4.2D). Este resultado indica que la sonda interacciona poco con los monómeros o que se une en un modo expuesto al solvente [113]. En forma similar a otros derivados del ANS, la débil señal del 1,8-ANS en presencia de la forma nativa de la proteína puede deberse a interacciones electrostáticas entre la forma aniónica de la sonda y los residuos cargados positivamente de la proteína y/o interacciones hidrofóbicas entre el grupo naftaleno de la sonda con las superficies hidrofóbicas expuestas al solvente que se forman transitoriamente en el ensamble desordenado de la proteína [113]. Sin embargo, en presencia de las especies agregadas, se observó un incremento de la intensidad de la fluorescencia para AS-Ac de ~ 2 veces en las fibras y ~ 4 veces en los oligómeros y para AS de ~ 3 veces en las fibras y los oligómeros, siendo ligeramente más intenso para los oligómeros (Figura 4.2D). Estos aumentos de intensidad de fluorescencia fueron acompañados con un corrimiento hacia el azul de ~ 35 nm (Figura 4.2D), de acuerdo con los resultados previos reportados para AS [93]. Estos resultados indican que la sonda experimenta microambientes hidrofóbicos en las especies agregadas, siendo ligeramente mayor en los oligómeros.

Posteriormente, se ensayó la capacidad de las distintas especies proteicas de alterar la integridad de las bicapas lipídicas. Para este propósito, se encapsuló una solución 50 mM de la sonda fluorescente CF dentro de LUVs de POPG, concentración a la cual la sonda se encuentra auto-atenuada. De esta manera, las alteraciones en la membrana que promuevan la liberación de la sonda de la vesícula se evidencian por un aumento en la intensidad de la fluorescencia. El grado de liberación de la sonda de los liposomas fue claramente dependiente del estado de agregación de la proteína. A concentraciones de masa equivalente, los oligómeros de ambas proteínas fueron las especies más efectivas en perturbar la permeabilidad de la membrana en comparación con los monómeros y las fibras (Figura 4.2E).

Finalmente, se obtuvieron detalles más finos acerca de la estructura secundaria de los diferentes estados conformacionales de AS mediante ATR-FTIR. Para poder resolver las señales de los distintos elementos estructurales que se solapan dentro de la región amida I', los espectros pueden ser tratados con distintos métodos matemáticos como la derivación y la deconvolución. La resolución de la región amida I' se realizó utilizando la segunda derivada y la FSD ($K= 1,8$) seguido por un ajuste de las curvas de los espectros IR no deconvolucionados ($K= 1$). Se incluyeron algunas restricciones de los parámetros de ajuste dentro de rangos físicamente plausibles (referirse al *Capítulo 2*). A pesar de que la precisión de la determinación de la composición de la estructura secundaria está sujeta a cierta incertidumbre debida a las rutinas de ajuste, este análisis provee información valiosa acerca de los cambios relativos. Los espectros de absorción, FSD y las bandas resueltas de muestras representativas para AS-Ac y AS se muestran en la Figura 4.2F. El análisis del ajuste y las asignaciones se detallan en Tabla 4.1. La banda amida I' de las proteínas monoméricas se centraron a ~ 1643 cm^{-1} , como se espera para proteínas sustancialmente desordenadas (Figura 4.2F). Este resultado coincide con resultados previos que demuestran que la N^α-acetilación de AS no altera significativamente la conformación desordenada del estado nativo de la proteína, incluso cuando dicha modificación incrementa la propensión a formar α -hélices en los primeros ~ 10 residuos [32, 147, 148]. La banda posicionada a 1642 cm^{-1} en mAS-Ac y a 1645 cm^{-1} en mAS representa ~ 65 - 68 % del total de la absorción de la banda amida I' y fue asignada a la estructura desordenada (Figura 4.2F y Tabla 4.1). Sin embargo, esta banda ancha podría contener alguna contribución de la estructura α -hélice (absorbancias observadas en condiciones de deutерación entre 1640 y 1660 cm^{-1} dependiendo de la geometría, simetría o interacciones [119]), que no pudo resolverse inequívocamente en la banda de absorción de la proteína. La banda a ~ 1622 cm^{-1} (~ 14 % de la absorción, Figura 4.2F y Tabla 4.1), tradicionalmente se asigna a la estructura hoja- β aunque puede también contener contribuciones de conformación poliprolina II (PPII) [149, 150]. La presencia de la estructura secundaria PPII en AS fue previamente sugerida por otras técnicas ópticas [151, 152]. Más re-

cientemente, los métodos basados en RMN en solución demostraron que las conformaciones PPII se pueblan transitoriamente en el ensamble conformacional de la proteína monomérica [24-26]. Por otro lado, los espectros IR de los oligómeros mostraron un aumento en la estructura hoja- β a juzgar por la banda más resuelta a $\sim 1620\text{ cm}^{-1}$ para las dos proteínas (Figura 4.2F y Tabla 4.1). Esta banda aparece concomitantemente con una banda de menor intensidad a 1694 cm^{-1} , que se puede apreciar mejor en el espectro FSD mostrado como líneas punteadas en Figura 4.2G. La aparición concomitante de estas dos bandas sugiere una orientación antiparalela de las hojas- β [116, 118, 120], la estructura característica de las especies oligoméricas que nuestro grupo sugirió previamente para los oAS [100]. Los perfiles FTIR indicaron también una contribución significativa de la estructura α -hélice/desordenada (Figura 4.2F), ligeramente superior en los ensamblajes oligoméricos en comparación con los monoméricos (Tabla 4.1). Estudios de dicroísmo circular (DC) del UV-lejano en especies oligoméricas preparadas por métodos comparables mostraron consistentemente que estas estructuras contienen estructura hoja- β [93, 94, 101], probablemente en combinación con conformaciones desordenadas como se puede inferir por la ausencia de los característicos dobles mínimos de las conformaciones α -hélice en un espectro DC. En concordancia con esta interpretación, se describieron oligómeros ricos en estructura hoja- β con un borde exterior de proteínas flexibles [94] o con una estructura cilíndrica hueca con un alto grado de desorden [93]. En comparación a las proteínas monoméricas, se observó un corrimiento del componente α -hélice/desordenado hacia números de onda más altos que pueden reflejar un incremento en las contribuciones α -hélice que no fueron resueltas espectroscópicamente (Figura 4.2F y Tabla 4.1). Finalmente, el perfil IR de las fibras mostraron un máximo prominente a $\sim 1625\text{ cm}^{-1}$ (Figura 4.2G), una región espectral característica de las hebras- β en las fibras amiloides. La ausencia de la banda a alto número de onda indica un arreglo paralelo de las hojas- β [116, 118, 120], como fue reportado para el plegado amiloide para la proteína no acetilada [85, 88].

Tabla 4.1 Análisis de la estructura secundaria de los ensamblajes conformacionales de AS-Ac y AS determinado por FTIR^a. Se indican la asignación de las bandas, la posición (ν in cm^{-1}) y la proporción de área relativa (%) de cada componente espectral.

Asignación bandas	mAS-Ac		oAS-Ac		fAS-Ac	
	ν (cm^{-1})	%	ν (cm^{-1})	%	ν (cm^{-1})	%
Hoja- β	1689	0,8	1694	1,7	-	-
	1622	15,4	1621	20,4	1626	30,3
	1613	1,8	1608	1,4	1614	2,8
α -hélice/desordenada	1642	65,1	1647	72,3	1641	60
Giros	1670	16,9	1679	4,2	1668	6.9

Asignación bandas	mAS		oAS		fAS	
	ν (cm^{-1})	%	ν (cm^{-1})	%	ν (cm^{-1})	%
Hoja- β	1689	0,8	1694	1,8	1688	0,2
	1623	12,8	1621	20,6	1623	32,4
	1611	2,1	1608	1,7	1613	3,1
α -hélice/desordenada	1645	68,6	1648	71,3	1640	59,3
Giros	1673	15,7	1679	4,6	1669	5,0

^a Valores promedio de tres experimentos independientes. $\sigma \nu \pm 1\text{ cm}^{-1}$; área $\pm 0.1\text{--}2.0\%$.

Analizando estos resultados en conjunto, concluimos que los distintos ensamblajes conformacionales de AS-Ac son similares, en términos de las propiedades hidrodinámicas, morfológicas, de tinción, estructurales y de ruptura de membrana a aquellos formados por AS. Aún más importante, se estableció que en forma similar a los oAS, las especies oligoméricas formadas por la proteína acetilada con capacidad de permeabilizar membranas, poseen una estructura distintiva rica en hebras- β antiparalelas en combinación con estructuras α -hélices/desordenadas y exhiben un alto grado de superficies hidrofóbicas accesibles.

4.3 Evolución de la estructura secundaria de AS y AS-Ac durante amiloidogénesis

Luego de establecer que los oAS-Ac purificados poseen la estructura hoja- β antiparalela distintiva, se quiso determinar si esta característica estructural está presente en los intermediarios pre-fibrilares poblados transitoriamente durante el proceso de amiloidogénesis. Para estudiar la evolución estructural a lo largo de la vía de agregación proteica, se empleó espectroscopia ATR-FTIR para monitorear las transiciones estructurales y la fluorescencia de la sonda TioT para determinar la cinética de formación amiloide.

La Figura 4.3 muestra los perfiles FSD-IR en la región amida I' a diferentes tiempos, representando cualitativamente la evolución estructural que tiene lugar a lo largo de la agregación. En las primeras 9 h de la agregación de AS-Ac y 12 h de AS, los espectros infrarrojos mostraron la aparición concomitante de las bandas de alta y baja frecuencia característicos de las hojas- β antiparalelas (Figura 4.3). Interesantemente para AS-Ac, a las 12 h estas dos bandas decrecen drásticamente y la banda amida se vuelve llana en la región 1650-1620 cm^{-1} con un máximo a $\sim 1645 \text{ cm}^{-1}$, indicativo de una mayoría de estructuras α -hélices/desordenadas. Este comportamiento no se pudo observar para AS ya que no se tomaron muestras entre las 12 h y 24 h, probablemente la ventana temporal donde podrían observarse estos cambios. A mayores tiempos de agregación, se observó una banda pronunciada localizada a $\sim 1627 \text{ cm}^{-1}$ en ambas proteínas lo cual, en ausencia de un segundo pico a alta frecuencia ($\sim 1695 \text{ cm}^{-1}$), se atribuye a la conformación hoja- β paralela de protofilamentos y fibras maduras (Figura 4.3).

A partir de los espectros FSD se calculó el “Índice de organización de hojas- β (Índice- β)”, definido como la relación entre los componentes de alta y baja frecuencia de las hojas- β , para monitorear la reorganización de hojas- β en el tiempo [153]. El perfil de Índice- β junto con la curva de la cinética de agregación medida por TioT están presentados en la Figura 4.4, paneles superiores. Las agregaciones de AS-Ac y AS exhibieron el clásico perfil de agregación sigmoideo esperado para un mecanismo de nucleación-polimerización. El análisis de las curvas cinéticas de TioT (Ecuación 1- *Capítulo 2*) indicaron que AS-Ac y AS forman fibras con una fase de latencia de 12 h y 19 h, un tiempo de agregación medio $t_{1/2}$ de $\sim 23 \text{ h}$ y $\sim 34 \text{ h}$ y una constante aparente de crecimiento k_{ap} $\sim 0,17 \text{ h}^{-1}$ y $\sim 0,13 \text{ h}^{-1}$, respectivamente. A pesar de que la agregación de AS fue ligeramente más lenta en nuestras condiciones experimentales, no se observaron diferencias drásticas en relación a AS-Ac y estos valores están dentro de los reportados para la proteína acetilada [148]. Esta transición de monómero a fibras fue acompañada por un incremento inicial del Índice- β durante la fase de latencia y una posterior disminución a tiempos más largos evidenciando la formación y subsecuente desaparición de las especies hoja- β antiparalelas. En un estudio previo donde se empleó FTIR para estudiar la agregación de una variante marcada fluorescentemente de AS, se reportó la formación de oligómeros transito-

rios ricos en estructura hoja- β durante la fase de latencia [143], aunque en dicho trabajo no hubo identificación de la disposición espacial de las hebras- β .

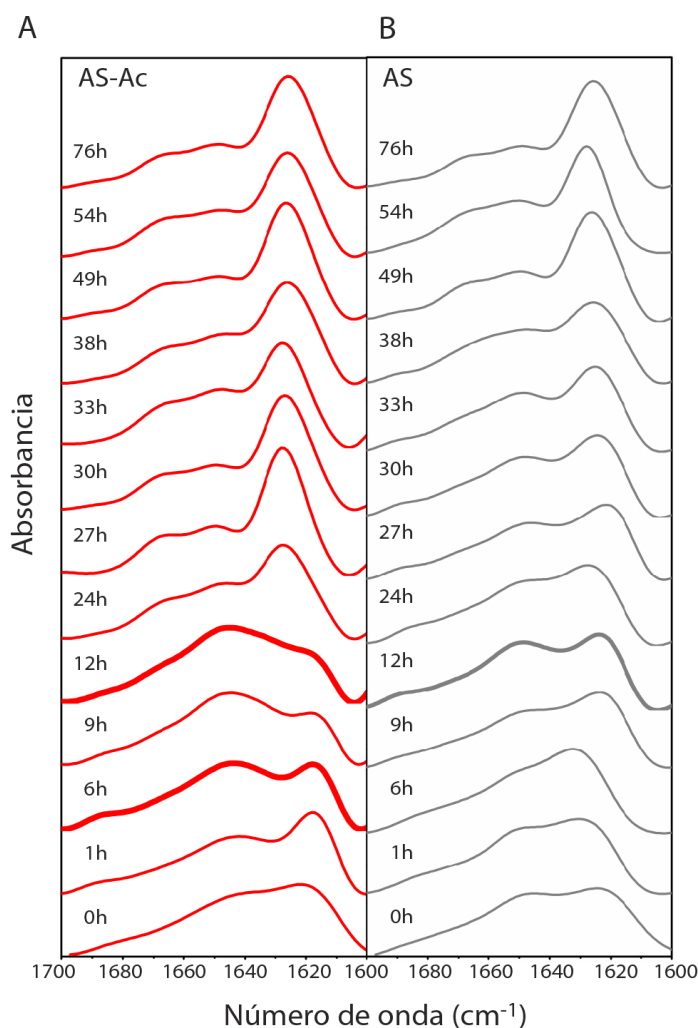


Figura 4.3 Cinética de agregación de **A**, AS-Ac y **B**, AS. Espectros FTIR con auto-deconvolución de Fourier ($K= 1,8$) en la región amida I' a diferentes tiempos durante amiloidogénesis

Finalmente, se realizó un análisis cuantitativo de la banda amida I' a lo largo del proceso de auto-agregación para obtener más información de la reorganización estructural durante el proceso de amiloidogénesis. Los resultados obtenidos del ajuste de las curvas están incluidos en la Figura 4.4, paneles inferiores. Al comienzo de la agregación, el contenido total de hoja- β aumentó (Figura 4.4, paneles inferiores) con una notable contribución del componente de hoja- β de alta frecuencia denotando la formación de especies ricas en la estructura hoja- β antiparalela en los estadios tempranos de la agregación amiloide. En el caso de AS-Ac, se observó al comienzo de la fase de elongación una disminución del contenido total de hoja- β así como de la contribución del componente hoja- β de alta frecuencia, con el aumento concomitante de la contribución de la estructura α -hélice/desordenada (Figura 4.4A). Recientemente, se demostró la aparición de intermediarios ricos en la estructura α -hélice desde el comienzo y hasta la mitad de la fase de elongación en las distintas variantes de AS [154] en concordancia con esta observación.

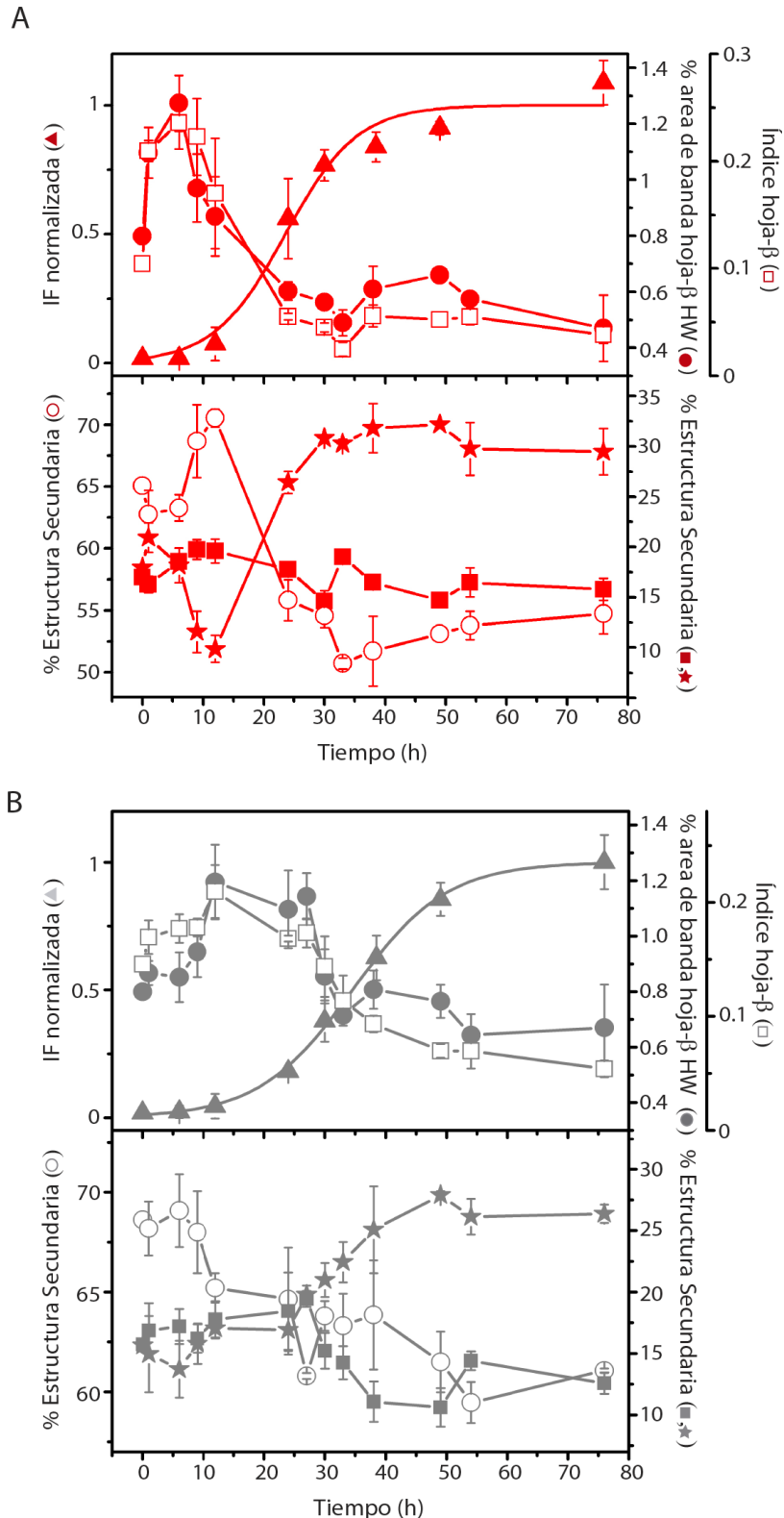


Figura 4.4 Remodelado de hoja- β y cambios estructurales durante el proceso de amiloidogénesis de **A**, AS-Ac y **B**, AS. En los paneles superiores se muestran las cinéticas de formación amiloide monitoreado por fluorescencia de la sonda TioT (\blacktriangle) junto con la progresión del Índice- β (\square) y el porcentaje del área de la banda correspondiente a hoja- β de alto número de onda o HW (\bullet). En los paneles inferiores se grafica la evolución del contenido de las estructuras hoja- β (\star), α -hélice/desordenada (\circ) y giros- β (\blacksquare). Los componentes espectrales fueron resueltos luego del ajuste de curvas del espectro FTIR $K=1$. Cada punto representa la media $\pm \sigma$ de tres experimentos independientes.

En el caso de AS no pudo constatar el mismo comportamiento, debido probablemente a la falta de datos durante esa ventana temporal. En el punto medio de la agregación, la contribución de hoja- β fue superior en los dos casos ($\sim 25\%$ para AS-Ac y $\sim 22\%$ para AS) que al inicio de la fase de crecimiento ($\sim 9\%$ para AS-Ac y $\sim 14\%$ para AS) y aumentó a más del 25% al final de la fase estacionaria (Figura 4.4, paneles inferiores). Esta contribución se debe principalmente al componente hoja- β de baja frecuencia correspondiente a las hebras- β acomodadas en una conformación paralela, mostrando directamente el remodelado de las hojas- β (Figura 4.4). Este aumento de hoja- β paralela acompaña los cambios en la fluorescencia de la TioT monitoreando la estructura *cross*- β de las fibras. El aumento en el contenido de la estructura hoja- β fue acompañado por un decaimiento concomitante de la contribución de la estructura α -hélice/desordenada, de $\sim 70\%$ a $\sim 55\%$ en ambas proteínas, mientras que el contenido de giros fue $\sim 15\%$ durante todo el proceso (Figura 4.4, paneles inferiores).

A partir de estos resultados, se demostró que la transición de monómeros a fibras involucra una sustancial reorganización estructural demandando una reorientación espacial de las hebras- β a nivel de intermedios pre-fibrilares formados en los estadios tempranos de la agregación.

4.4 Discusión

Como se demostró anteriormente, los oAS poseen una cantidad sustancial de estructura hoja- β antiparalela con un patrón definido de interacciones intermoleculares (Capítulo 3 y ref. [100]). En particular, se postuló que contactos similares a los fibrilares $\beta 1$ - $\beta 1$ y $\beta 3$ - $\beta 3$ (segmentos Leu³⁸-Val⁵⁵ y Val⁷⁰-Ala⁷⁸, respectivamente) podrían estar involucrados en las interacciones tempranas oligoméricas formando justamente estas hojas- β antiparalelas (Capítulo 3). Estas observaciones, junto a numerosos estudios que reportan sobre las propiedades conformacionales de los ensamblajes monoméricos [23, 27, 28, 32, 147, 148], oligoméricos (Capítulo 3 y ref. [93, 94, 100, 133]) y fibrilares [82, 84, 85, 88], sugieren que se requiere un re-arreglo de los contactos hojas- β para la formación de las fibras amiloides de AS. Este capítulo se centró en el estudio de los cambios conformacionales que ocurren a lo largo de la vía de fibrilación de AS y su forma fisiológicamente relevante AS-Ac, con especial atención en las especies pre-fibrilares que se pueblan durante este proceso con el fin de poder revelar el remodelado de las hojas- β .

Recientemente se demostró que AS *in vivo* está sujeta a N^α-acetilación [19]. A pesar de ser la modificación más abundante en las proteínas eucariotas, su función biológica no es clara. Una posibilidad es que esta modificación esté vinculada con la “Regla de la N” que relaciona la regulación del tiempo de vida medio de las proteínas con la identidad del residuo N-terminal en donde la N^α-acetilación constituye una marca de direccionamiento para la degradación dependiente de ubiquitina [155]. A pesar del consenso general en relación a que la adición del grupo acetilo incrementa ligeramente la helicidad de la región N-terminal de la proteína monomérica [32, 147, 148], existe mucha controversia sobre el rol de esta modificación en la localización subcelular/membrana de la proteína [32, 156], su unión a vesículas [32, 147] y la propensión a la agregación [32, 148, 157]. En este capítulo demostramos, por primera vez, que la N^α-acetilación no tiene un efecto prominente en las propiedades biofísicas de los distintos ensamblajes conformacionales de la proteína (Figura 4.2). La consecuencia práctica inmediata de estos resultados es la posibilidad de extrapolar el conocimiento adquirido, a lo largo de los años, sobre las propiedades biofísicas de AS a un sistema que más se asemeja al estado natural de la proteína *in vivo*.

Se demostró que los oAS-Ac al igual que los oAS exhiben las características espectrales en FTIR atribuidas a la estructura hoja- β antiparalela, además de poseer un alto contenido de la estructura helicoidal.

dal/desordenada y superficies hidrofóbicas accesibles (Figura 4.2F y Tabla 4.1). Estas observaciones concuerdan con las características generales reportadas para una variedad de subgrupos de los oAS generados a partir de protocolos experimentales comparables. Estas poblaciones, a pesar de exhibir diferentes morfologías, poseen características estructurales comunes como ser el carácter hidrofóbico de las superficies accesibles y estructura hoja- β antiparalela en combinación con una gran proporción de estructuras desordenadas (*Capítulo 3* y ref. [93, 94, 100]). Además, estos ensamblajes oligoméricos producidos a partir de soluciones de la proteína liofilizada se asemejan a los intermediarios denominados “fuzzy balls” reportados por Jovin y colaboradores, nanoesferas detectadas en estadios tempranos de la agregación de AS con alta tendencia para reclutar material en sus periferias [90].

En comparación con las proteínas monoméricas, los resultados de FTIR sugieren un incremento de la contribución helicoidal relativa a la estructura desordenada en los oAS-Ac y los oAS (Tabla 4.1). La región N-terminal de la proteína (residuos Met¹-Lys⁶⁰) contiene repeticiones degeneradas de segmentos de 11 residuos típicos de los dominios de interacción con lípidos de las α -hélices anfipáticas de las apolipoproteínas [20] y tras interactuar con vesículas ácidas, esta región adopta una conformación α -hélice extendida con un giro similar al de las hélices enrolladas (*coiled-coil*) dextrógiras [36]. A partir de los estudios realizados en los oAS empleando la fluorescencia intrínseca de variantes Trp, se determinó que el núcleo oligomérico abarca los residuos Phe⁴-Ala⁹⁰ [104]. Posteriormente, se determinó mediante mediciones de cinética de intercambio H/D monitoreado por espectrometría de masa, que los segmentos específicos discretos dentro de dicha región poseen una dinámica conformacional restringida denotando la presencia de estructuras persistentes estabilizadas por puentes hidrogeno [105]. Llamativamente, el segmento comprendido entre los residuos Phe⁴-Ala¹⁷ está protegido del intercambio isotópico indicando una estructuración de la región distal N-terminal [105]. En concordancia con estos resultados, en el *Capítulo 3* se mostró que los oAS-pir exhiben intensas señales de excímero en las posiciones ensayadas del extremo N-terminal (Figura 3.6 y 3.7) mostrando un alto grado de empaquetamiento de esta región y la existencia de una red específica de contactos intermoleculares. Estos resultados hablan a favor de la adquisición de estructuras regulares en la región N-terminal (*Capítulo 3*). En base a estos antecedentes calculamos, mediante herramientas bioinformáticas (*Capítulo 2*), la propensión de la proteína de adoptar una conformación de tipo *coiled-coil*. El cálculo arrojó una probabilidad de $\sim 2\%$ de formar este tipo de motivo estructural para los primeros 21 residuos de la proteína. Por lo tanto, postulamos que la contribución helicoidal en oAS-Ac y oAS podría estar mediada por la estructuración de la porción N-terminal en un arreglo de tipo *coiled-coil*. Si bien esta hipótesis debe ser probada experimentalmente, estos antecedentes destacan la importancia de esta región en el establecimiento de las interacciones oligoméricas tempranas.

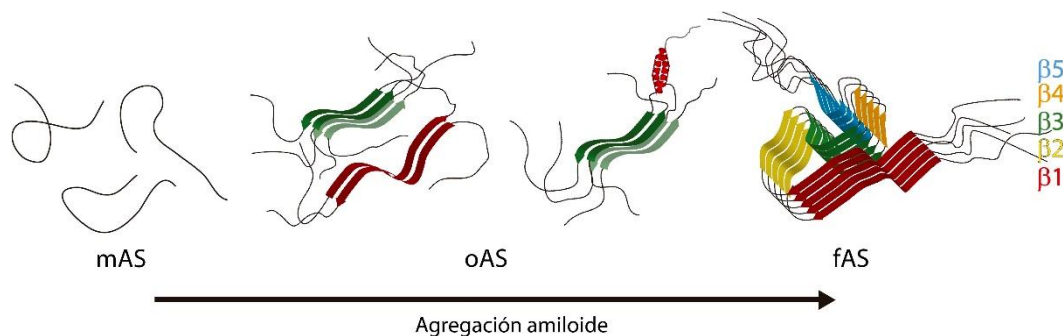


Figura 4.5 Representación esquemática de la reorganización de los segmentos que participan en las interacciones hoja- β durante el proceso de amiloidogénesis.

A lo largo de la agregación de las dos proteínas, las señales espectroscópicas que reportan sobre la estructura hoja- β antiparalela (Índice- β y componente de hoja- β de alta frecuencia) crecieron, alcanzaron un máximo y luego disminuyeron antes de la máxima respuesta de TioT, revelando la formación y la posterior consumición de los intermediarios tempranos en los cuales las moléculas de la proteína adoptan una geometría hoja- β distinta de aquella obtenida en el producto fibrilar (Figura 4.4, panel superior). Interesantemente, estas diferencias en la organización de las hojas- β , desde una geometría antiparalela en especies intermediarias a una organización paralela en la forma fibrilar, fueron reportadas previamente para otras proteínas amiloidogénicas como el péptido A β [158, 159], un péptido priónico [160], β 2-microglobulina [161], lisozima [162] y el dominio Josephin de ataxina-3 [163]. A partir de estas observaciones se sugirió que esta organización de las hojas- β podría representar un motivo estructural común en los oligómeros amiloides subyacente a sus propiedades patogénicas de ruptura de biomembranas [100, 158, 159]. El remodelado de las hojas- β en AS-Ac ocurre a través de las especies ricas en estructuras helicoidales/desordenadas (Figuras 4.3, 4.4 y 4.5). Si bien no se pudo observar para AS debido a los tiempos de muestreo, postulamos que esto también ocurriría en la proteína no modificada. Estos descubrimientos correlacionan con trabajos previos describiendo intermediarios ricos en la estructura α -hélice durante la agregación de AS bajo algunas condiciones [154, 164]. Interesantemente, la región N-terminal mostró ser especialmente sensible a la formación de estos intermediarios [154] apoyando nuestra propuesta sobre el rol clave de esta porción de la proteína en el auto ensamblado amiloide. En concordancia con estas observaciones experimentales, un estudio realizado *in silico* sobre los estadios tempranos de la oligomerización de la región amiloidogénica de AS mostró que los dímeros y los trímeros contienen regiones con ambos tipos de estructuras, α -hélice y hojas- β , donde las hojas- β si bien se forman por una diversidad de contactos, adquieren exclusivamente una orientación antiparalela [165]. Es importante notar que los intermediarios ricos en la estructura α -hélice se describieron en la vía de agregación de otras proteínas amiloidogénicas, como en la del péptido A β característico de las placas amiloides de la enfermedad de Alzheimer y la amilina de la diabetes de tipo II, conduciendo a la hipótesis que los intermediarios helicoidales mediarían la oligomerización temprana de los polipéptidos nativamente desestructurados [166]. Es importante resaltar que las características estructurales principales de los intermediarios transitorios detectadas por ATR-FTIR, es decir la estructura hoja- β antiparalela combinada con las estructuras helicoidales/desordenadas, son similares a aquellas encontradas para diversas poblaciones de oAS atrapados cinéticamente [93, 94, 100] y se asemejan a los oAS compactos, estructurados y altamente tóxicos identificados por medio de la técnica de FRET a nivel de molécula única [76].

Recientemente se propuso un mecanismo estructural para el ensamblado del péptido amiloide A β (1-40) en el cual, una rotación concertada de 90° en los oligómeros poblados transitoriamente formados por el apilado hidrofóbico de las horquillas- β , formarían una semilla fibrilar con las hojas- β paralelas en registro [167]. Basados en las evidencias discutidas en los párrafos anteriores, la fibrillogénesis de AS-Ac y AS no se podría explicar solamente por una reorientación de 90° de las hojas- β debido a que algunas de las interacciones hojas- β tempranas necesitan adoptar otra clase de estructura secundaria (hélice/desordenada) previamente a la elongación de las fibras. Teniendo en cuenta que, según las predicciones informáticas la región β 3 tiene una alta propensión de formar hoja- β y agregar, que está involucrada en contactos intermoleculares oligoméricos (Capítulo 3) y se encuentra hacia el centro del núcleo fibrilar (Figura 1.6, [88]), postulamos que esta región permanecería estructurada como hoja- β durante la agregación. Así, una rotación alrededor del eje longitudinal de β 3 junto a una reestructuración de las regiones β localizadas hacia la porción N-terminal

podría permitir el remodelado de la red de interacciones de las hojas- β para desencadenar la elongación de fibras (Figura 4.6).

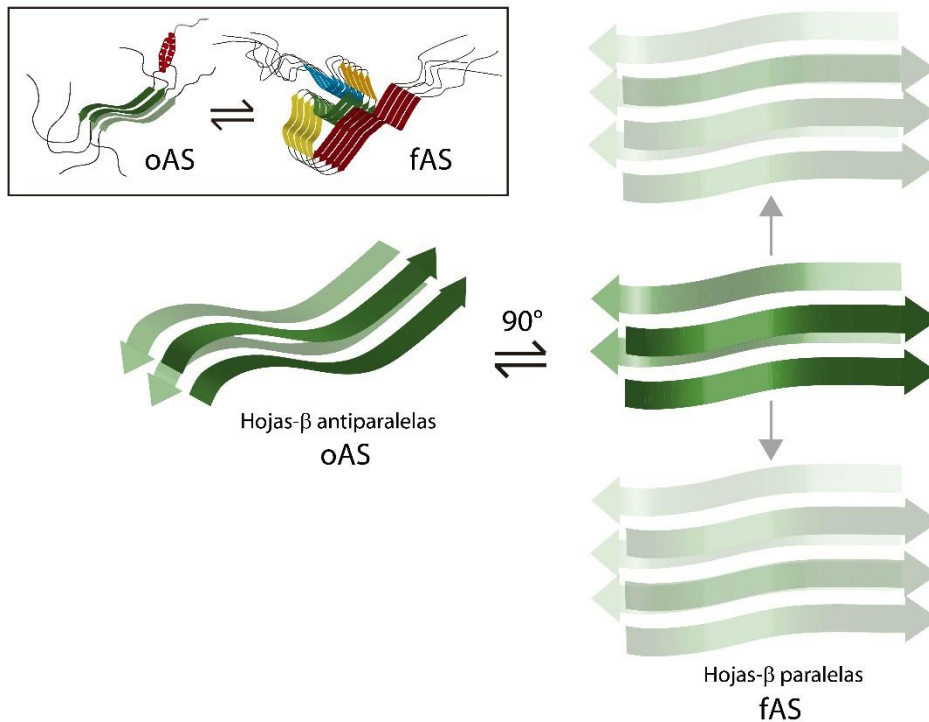


Figura 4.6 Representación de la conversión de hojas- β antiparalelas a paralelas propuesta para la región $\beta 3$ de AS en agregados amiloides. Una rotación concertada de 90° en oAS de las hojas- β de la región $\beta 3$ darían lugar a una semilla con la estructura características de fAS que luego desencadenaría la formación de las fibras.

Como se mencionó en el *Capítulo 1*, la formación amiloide es un proceso complejo que involucra distintos intermediarios que varían en tamaño, estructura y morfología. La complejidad de este proceso puede racionalizarse en el contexto de la teoría de paisaje energético del plegamiento/agregación proteica (Figura 1.1). En analogía con el plegamiento proteico, donde las interacciones intramoleculares conducen a la multitud de conformeros hacia el ensamble nativo, los contactos intermoleculares conducen a la cadena polipeptídica a estados auto-ensamblados culminando en la formación de agregados supramoleculares amiloides altamente estables [6]. El estado nativo de AS es un ensamble de conformeros altamente dinámicos que pueblan transitoriamente todas las regiones favorables del gráfico de Ramachandran, incluyendo las regiones alfa, beta y PPII [24-26]. Estas estructuras secundarias dinámicas, junto con las interacciones terciarias de largo alcance que involucran las regiones que residen afuera del núcleo de las fibras [27, 28], modulan la cinética de fibrilación. Las conformaciones favorecidas propensas a agregar direccionan el ensamble desordenado hacia el mínimo del embudo energético de agregación. La rugosidad de este embudo y la multiplicidad de las vías de agregación conducen a la posibilidad que los oligómeros metaestables distinguibles puedan ser atrapados cinéticamente en mínimos energéticos locales. Esto tiene un impacto biológico inmediato ya que el mal plegamiento y la agregación de la proteína en la célula podría generar múltiples especies que varían en tamaño, estructura secundaria, terciaria y cuaternaria y, más importante, diferentes roles patológicos. De esta manera, los intermediarios desordenados que exponen superficies hidrofóbicas flexibles podrían participar en interacciones aberrantes con proteínas, oligómeros ricos en la

estructura hoja- β antiparalela podrían actuar como toxinas alterando la homeostasis de los iones, los intermediarios helicoidales podrían promover la formación de fibras mediante el incremento de la concentración local de secuencias amiloidogénicas, etc. Además, ya que la forma exacta del embudo de agregación depende de las condiciones ambientales, el balance entre los distintos estados conformacionales podría cambiar dinámicamente dependiendo de los distintos escenarios fisiológicos/patológicos. En este capítulo presentamos evidencias sobre una de estas vías de agregación, la cual involucra la reorientación espacial de las hebras- β a nivel de los intermediarios pre-fibrilares, brindando información estructural valiosa sobre los complejos cambios conformacionales que ocurren en el transcurso de la formación amiloide *in vivo* de AS y su forma fisiológica AS-Ac.

Parte de los resultados presentados en este capítulo se publicaron en **Gallea, J.I.**, et al., *Structural remodeling during amyloidogenesis of physiological N^α-acetylated α -synuclein*. *Biochim Biophys Acta*, 2016. **1864**(5): p. 501-10.

Capítulo 5 - Resultados

Capítulo 5 Efecto de la oligomerización en la interacción de AS con biomembranas

El rol fisiológico de AS estaría relacionado al tráfico de las vesículas sinápticas y a la neurotransmisión de la dopamina [61, 168]. Diversos trabajos indican que la interacción de los mAS con membranas es crucial para su función [168] y se ha mostrado que la proteína tiene mayor afinidad por membranas aniónicas de alta curvatura como es el caso de las vesículas sinápticas [20]. La oligomerización amiloide de AS está involucrada en la muerte de las neuronas dopaminérgicas y en el desarrollo de la enfermedad de Parkinson. Diferentes mecanismos de toxicidad se vinculan a los oAS, entre los que se encuentra el daño a diferentes tipos de membranas celulares [61]. En este capítulo, se evaluó el impacto que tiene la oligomerización de AS en su capacidad de interacción con biomembranas, con especial interés en su sensibilidad a curvatura. Para llevar a cabo este objetivo se utilizó la técnica de FCS, estudiando cuantitativamente la interacción de los mAS y los oAS con biomembranas de distinta composición y curvatura.

5.1 Medidas de interacción lípido-proteína mediante FCS

La técnica de FCS ha sido ampliamente utilizada para estudiar las interacciones entre biomoléculas tanto *in vitro* como en células [169, 170] y ha demostrado ser una herramienta muy poderosa para determinar las propiedades de unión de polipéptidos, incluida AS, a biomembranas [37, 38, 171]. Como parte de esta tesis, nos propusimos implementar esta técnica por primera vez en nuestro laboratorio para evaluar el impacto de la oligomerización en las propiedades de interacción de AS con membranas lipídicas.

El principio de FCS se resume brevemente en el Anexo A.2. El análisis temporal de las fluctuaciones de la intensidad de la fluorescencia de moléculas individuales difundiendo a través de un pequeño volumen de observación permite obtener curvas de autocorrelación que contienen información sobre el tiempo de difusión característico de las especies. En estudios de interacciones entre moléculas cuando solo una de las especies es fluorescente, la unión podrá evidenciarse si se produce un cambio en el tamaño molecular aparente de la especie fluorescente que pueda ser detectado como un incremento en el tiempo de difusión. En nuestro caso, las especies distinguibles serán sólo dos: la proteína marcada fluorescentemente libre en solución y unida a las vesículas. Para ello se utilizó AS marcada en el residuo 140 con la sonda fluorescente Alexa488 (mAS-A488). Esta posición se seleccionó para prevenir cualquier efecto que pudiera causar la sonda hidrofóbica en la unión de AS a las membranas ya que dicha interacción está mediada principalmente por el extremo N-terminal de la proteína ya sea en la forma monomérica [20] como oligomérica [104]. En el contexto de este capítulo los términos interacción y unión deben interpretarse como una partición de la proteína entre dos fases fluidas inmiscibles: la solución acuosa y la bicapa [123].

En la Figura 5.1 se muestran las curvas de autocorrelación representativas de los mAS-A488 y los oAS-A488 en ausencia y presencia de un exceso de SUVs. El tiempo de difusión característico de los mAS-A488 fue $\sim 150 \mu\text{s}$, mientras que para los oAS-A488 fue de $\sim 570 \mu\text{s}$, consistente con el mayor tamaño de estas especies en comparación al monómero (Tabla A.1 y Figura A.4). En presencia de lípidos, ambas curvas se desplazan hacia mayores tiempos de decaimiento (Figura 5.1). La condición de saturación se evidencia por la superposición de las curvas de autocorrelación con el agregado de concentraciones mayores de lípidos. Las diferencias en los tiempos de difusión en ambas condiciones permiten cuantificar F_{AS}^u a distintas concentraciones de lípidos según la Ecuación 2 (Capítulo 2) y construir las curvas de unión. Finalmente, estas se ajustan con la Ecuación 4 (Capítulo 2) para obtener los parámetros termodinámicos de partición K_p y ΔG_p^o o, alternativamente, con la Ecuación 5 (Capítulo 2) para obtener K_d^{ap} . Cabe recordar que estos parámetros representan el acoplamiento de los equilibrios de partición y plegamiento, conteniendo tanto contribuciones electrostáticas como hidrofóbicas [123].

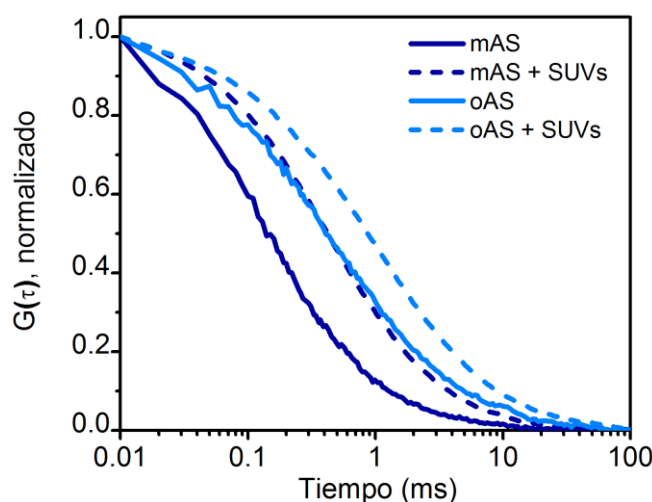


Figura 5.1 Curvas de autocorrelación normalizadas de mAS-A488 y oAS-A488 en solución (—) y unidas a SUVs de POPG (---).

5.2 Sistemas modelo de biomembranas

Para evaluar el impacto de la oligomerización en las propiedades de interacción de la proteína con biomembranas se utilizaron sistemas modelos simples que permitieran inferir sobre la respuesta a ciertos parámetros físicos de la membrana.

Para analizar la sensibilidad a la curvatura se emplearon vesículas unilamelares obtenidas por sonicación o extruidas a través de una membrana de 100 nm de poro. En ambos casos, el tamaño de los liposomas se determinó mediante DLS obteniéndose diámetros de entre 16-35 nm para las SUVs y 74-84 para las LUVs, dependiendo de la composición. La curvatura promedio de estas bicapas ($1/r$) cambia por un factor de ~ 3 entre estas vesículas. El tamaño promedio de las SUVs las convierte en un buen modelo de vesículas sinápticas cuyo diámetro es de ~ 40 nm [172].

Para la composición de las vesículas se seleccionaron lípidos con cadenas hidrocarbonadas palmitoil-oleoil (PO) para emular la asimetría y monoinsaturación de lípidos fisiológicos. POPC se seleccionó por ser uno de

los fosfolípidos zwitteriónicos más abundantes de las membranas *in vivo* [173]. Considerando que los mAS interactúan preferencialmente con las membranas cargadas negativamente [37, 38], se emplearon los fosfolípidos aniónicos POPG y POPS, este último de mayor relevancia fisiológica ya que es el lípido aniónico mayoritario en las membranas celulares eucariotas [173]. Dado que las membranas biológicas no contienen grandes proporciones de lípidos aniónicos [173], se moduló el contenido de

carga de la interfase con la mezcla binaria POPC:POPS 70:30. Finalmente, se empleó una mezcla compleja (denominada SV-m) de POPC:POPS:POPE:Col 40:10:25:25 la cual puede equipararse tanto en composición como en contenido aniónico (~15 %) a las vesículas sinápticas [172].

5.3 Interacción de los mAS con biomembranas modelo

Para obtener los parámetros de interacción de los mAS-A488 con liposomas de diferente tamaño y composición, se realizaron titulaciones de una solución de proteína 100 nM con concentraciones crecientes de lípidos en un rango de $[L]_{ac}$ entre 0 y 400 μM . A mayores concentraciones de lípido las curvas de autocorrelación presentaron anomalías debido probablemente a un efecto de dispersión [174].

En primer lugar, se analizó la interacción de los mAS-A488 con las SUVs formadas por los lípidos puros POPG, POPS y POPC. En los 3 casos, las curvas se desplazaron a mayores tiempos de decaimiento con el agregado de concentraciones crecientes de los lípidos indicando interacción con las vesículas (Figura 5.2). Los tiempos de difusión característicos de los mAS-A488 fueron $\tau_{AS} \sim 150 \mu\text{s}$ mientras que en condiciones de saturación fue $\tau_{AS}^u \sim 400\text{-}600 \mu\text{s}$ (Tabla A.1 y Figura A.4). La forma hiperbólica de las curvas de unión (Figura 5.3) es consistente con una interacción no-cooperativa. Por otro lado, los experimentos control realizados adicionando la proteína no marcada a una suspensión de SUVs indicaron que los mAS-A488 no causan agregación entre las vesículas o alguna otra alteración que modifique su difusión (Figura A.5). Las curvas de titulación indican una mayor afinidad de los mAS-A488 por las vesículas cargadas negativamente que por las membranas zwitteriónicas (Figura 5.3) con constantes de partición $K_p \sim 2 \times 10^8$ para POPG, POPS y $\sim 2 \times 10^6$ para POPC (Figura 5.4 y Tabla 5.1). En correlación con esos resultados, una reducción del contenido de lípido cargado a un 30 % en la mezcla binaria POPC:POPS redundó en una drástica disminución de la afinidad evidenciándose por un decrecimiento de $K_p \sim 100$ veces en comparación a POPS pura (Figura 5.4 y Tabla 5.1). En el caso de SV-m (10 % de lípido cargado), la afinidad se vio aún más reducida con un valor de $K_p \sim 7 \times 10^5$.

En forma análoga, se evaluó la interacción de los mAS-A488 con las LUVs (Figura 5.2). En este caso los valores de τ_{AS}^u fueron entre 1,22 y 2,05 ms (Tabla A1). Al igual que para las SUVs, la tendencia de afinidad siguió el orden POPG~POPS>POPC ($K_p \sim 3 \times 10^7$, $1,5 \times 10^7$ y 9×10^5 , respectivamente) y disminuyó ~ 100 veces en la mezcla POPC:POPS en comparación con POPS pura (Figura 5.4 y Tabla 5.1). Llamativamente, si bien se pudo detectar una interacción entre los mAS-A488 y las SV-m en las curvas de autocorrelación (Figura 5.2) no fue posible estimar un valor de K_p debido a que no se llegó a definir una condición de saturación en el rango de concentración lipídica accesible por esta técnica.

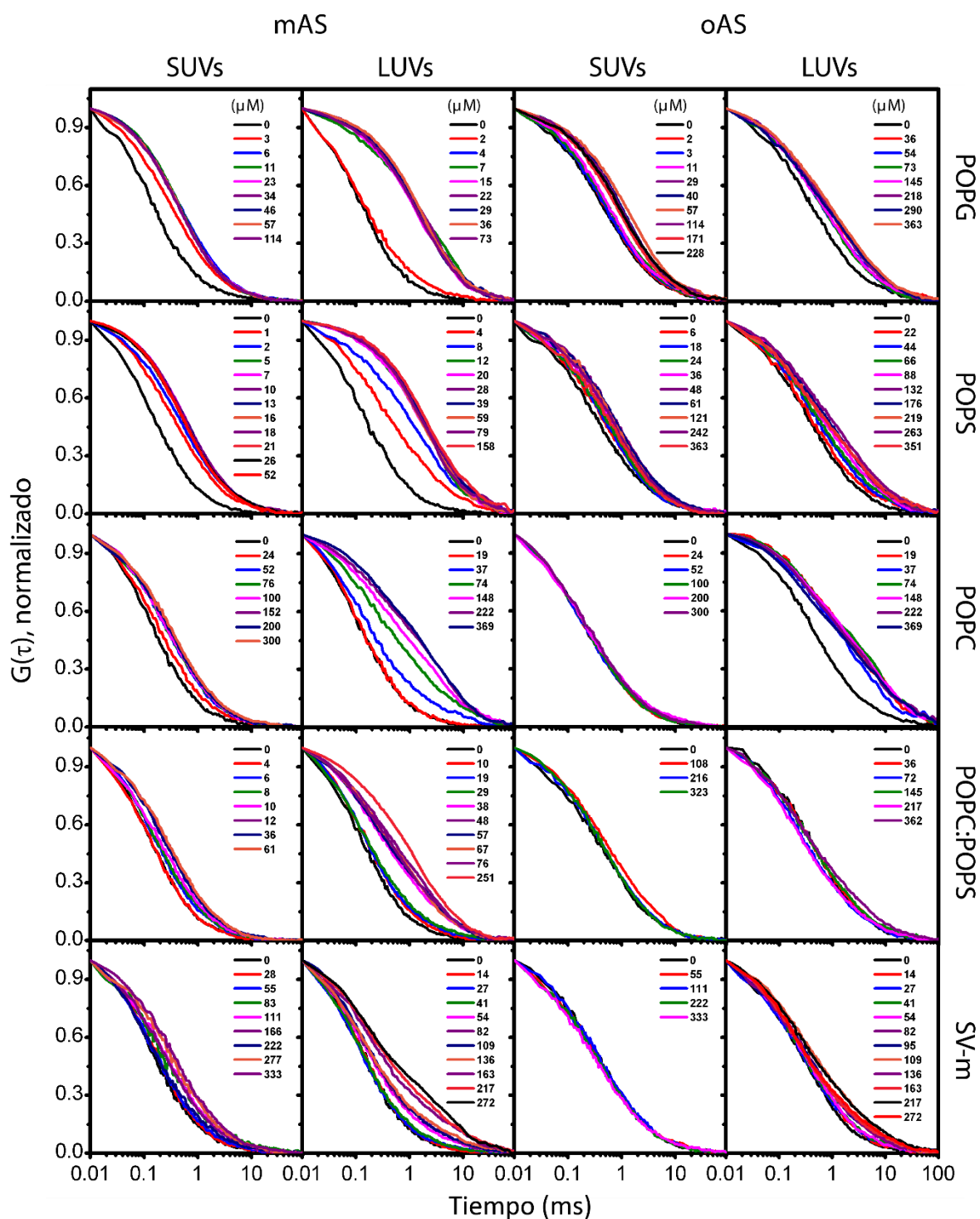


Figura 5.2 Curvas de autocorrelación normalizadas de mAS-A488 y oAS-A488 a concentraciones crecientes de lípido accesible (μM) para las distintas composiciones. Los experimentos se realizaron con vesículas puras de POPG, POPS y POPC y de las mezclas POPC:POPS 70:30 y SV-m (POPC:POPS:POPE:Col 40:10:25:25).

En conjunto, estos resultados indican que independientemente de la curvatura de las membranas, la presencia de lípidos aniónicos favorece la interacción con las vesículas [37, 38] y que, en nuestras condiciones experimentales, los mAS-A488 no tienen especificidad por las cabezas polares de POPS o POPG [38]. Por

otro lado, los valores significativos de ΔG_p^o , determinados para POPC (~-8 Kcal/mol, Tabla 5.1), indican que además de la contribución electrostática, otros factores influyen la interacción de la proteína con membranas.

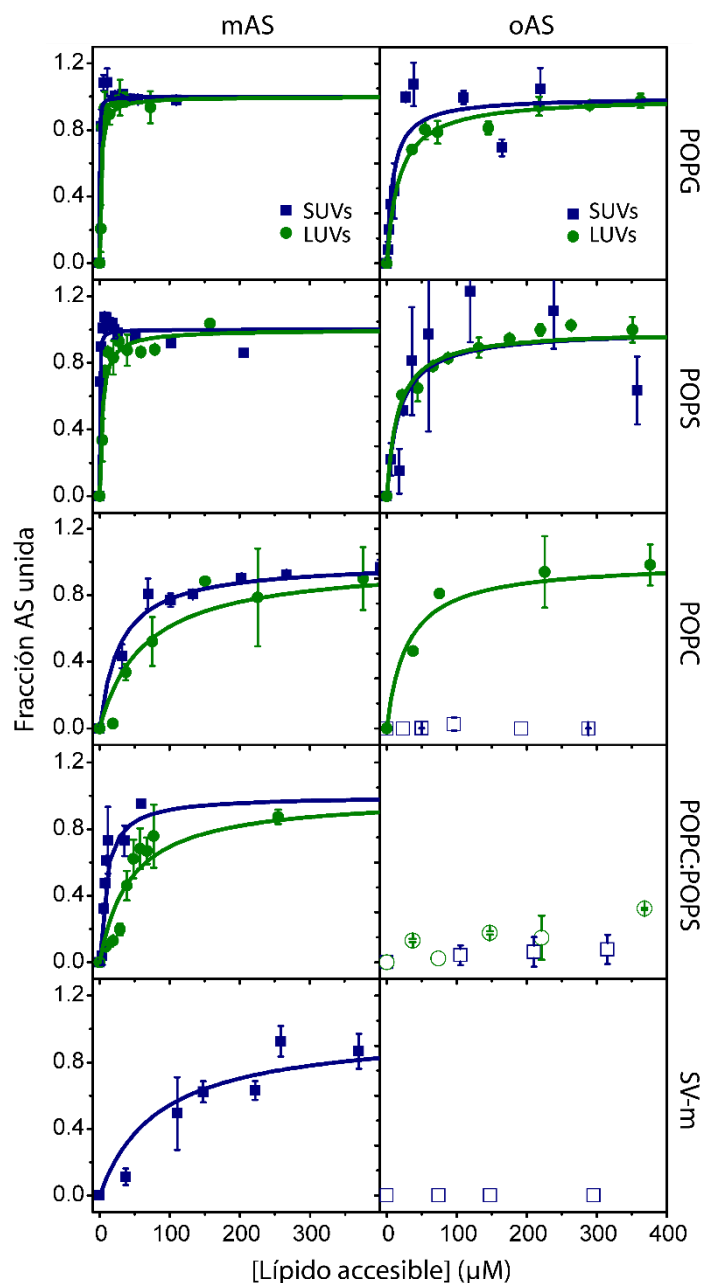


Figura 5.3 Curvas de unión de mAS-A488 y oAS-A488 a SUVs (■) y LUVs (●) de distinta composición derivadas del análisis de las curvas de FCS utilizando la Ecuación 2 (Capítulo 2). El ajuste (—) se realizó con la Ecuación 4 (Capítulo 2). Los símbolos abiertos (○, □) indican valores de F_{AS}^u asumiendo un valor teórico de τ_{AS}^u (ver texto para mayores detalles) y se muestran solo a fines comparativos.

Comparando los resultados en relación al cambio de curvatura, los valores de K_p de los mAS-A488 por las SUVs fueron mayores a los determinados para las LUVs (Figura 5.4 y Tabla 5.1) en coincidencia con los nu-

merosos trabajos que reportan la mayor afinidad de la proteína por las membranas de alta curvatura [20, 35, 38, 175-178]. Esta sensibilidad a curvatura fue dependiente de la composición de las vesículas ya que disminuyó ~ 3 veces en la mezcla POPC:POPS y ~ 7 veces en vesículas de POPC en comparación a POPS pura (Tabla 5.1). Estos resultados sugerirían que una reducción de la contribución electrostática en la interacción proteína-membrana amortigua la dependencia con la curvatura, en contraposición con los resultados reportados anteriormente [40, 179]. Interesantemente, la afinidad de los mAS-A488 por las SUVs de la composición que simula la de las vesículas sinápticas fue mayor a la de vesículas de baja curvatura.

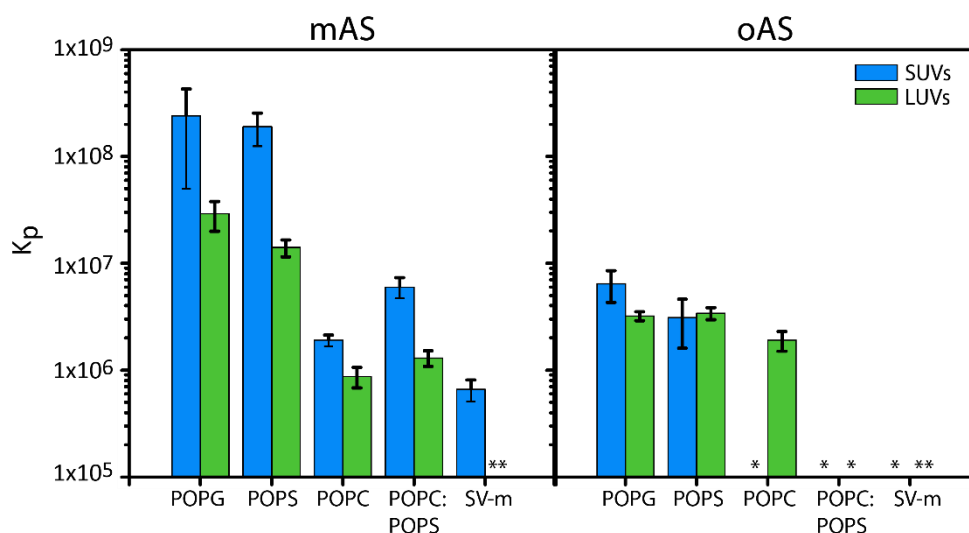


Figura 5.4 Constante de partición de mAS-A488 y oAS-A488 a SUVs (■) y LUVs (■) de distinta composición. En algunos casos no fue posible determinar los valores de K_p (*) o los de τ_{AS}^u (**).

5.4 Interacción de los oAS con biomembranas modelo

En forma paralela, se evaluó la interacción de los oAS-A488 con las vesículas de igual tamaño y composición a las empleadas en los experimentos detallados en la sección anterior. El hecho de usar las mismas poblaciones en ambos casos evita introducir diferencias originadas por las pequeñas heterogeneidades entre diferentes preparaciones.

Los ensayos de titulación se realizaron a una concentración fija de oligómeros (1000 nM determinado en unidades de proteína monomérica, 140 nM de proteína marcada inicial) y concentraciones crecientes de lípidos.

Con el agregado de las SUVs o las LUVs de POPG o POPS, las curvas de autocorrelación se desplazaron a mayores tiempos de decaimiento alcanzando valores de $\tau_{AS}^u \sim 0,8-2,9$ ms (Tabla A.1). Los valores de K_p calculados para las membranas cargadas negativamente fueron similares en el orden $\sim 3 \times 10^6$ (Figura 5.4 y Tabla 5.1), indicando que los oAS-A488 tampoco muestran especificidad por el grupo polar de estos dos lípidos aniónicos, y más importante, que no son sensibles en estos casos a los cambios de curvatura. La afinidad de esta interacción se redujo drásticamente cuando se disminuyó el contenido de lípido cargado negativamente en las mezclas POPC:POPS o SV-m, observándose solo una débil interacción con las SV-m de baja curvatura aunque no pudo determinarse el valor de K_p (Figura 5.2). Sorprendentemente, la adición de las

SUVs de POPC no produjo corrimientos en las curvas de autocorrelación (Figura 5.2) mientras que se determinó una K_p de $\sim 2 \times 10^6$ para las LUVs (Figura 5.4 y Tabla 5.1), en contraposición a lo observado para la proteína monomérica.

Estos resultados demuestran que la oligomerización impacta profundamente en las propiedades de unión de AS a las biomembranas, perdiéndose en algunos casos la capacidad de interacción y cambiando drásticamente la sensibilidad a curvatura. Mientras que disminuye la interacción preferencial hacia las vesículas de alta curvatura con alto contenido de cargas, incrementa la afinidad por las membranas zwitteriónicas de baja curvatura, en claro contraste al comportamiento exhibido por los mAS-A488.

Tabla 5.1 Constante de disociación aparente (K_d^{ap}), coeficiente de partición molar (K_p) y energía libre de partición (ΔG_p^o) de mAS-A488 y oAS-A488 a vesículas de distinta composición y curvatura.

Lípidos	mAS					
	SUVs			LUVs		
	K_d^{ap} (μM)	K_p	ΔG_p^o (Kcal/mol)	K_d^{ap} (μM)	K_p	ΔG_p^o (Kcal/mol)
POPG	0,2 ± 0,1	(2 ± 2) × 10 ⁸	-11,4 ± 0,5	1,9 ± 0,6	(2,9 ± 0,9) × 10 ⁷	-10,1 ± 0,2
POPS	0,3 ± 0,1	(1,9 ± 0,6) × 10 ⁸	-11,2 ± 0,2	4,0 ± 0,7	(1,4 ± 0,2) × 10 ⁷	-9,7 ± 0,1
POPC	28 ± 3	(1,9 ± 0,2) × 10 ⁶	-8,5 ± 0,1	63 ± 14	(9 ± 2) × 10 ⁵	-8,1 ± 0,1
POPC:POPS	9 ± 2	(6 ± 1) × 10 ⁶	-9,2 ± 0,1	44 ± 8	(1,3 ± 0,2) × 10 ⁶	-8,3 ± 0,1
SV-m	84 ± 19	(7 ± 1) × 10 ⁵	-7,8 ± 0,2	**	**	**

Lípidos	oAS					
	SUVs			LUVs		
	K_d^{ap} (μM)	K_p	ΔG_p^o (Kcal/mol)	K_d^{ap} (μM)	K_p	ΔG_p^o (Kcal/mol)
POPG	9 ± 3	(6 ± 2) × 10 ⁶	-9,2 ± 0,2	17 ± 2	(3,2 ± 0,3) × 10 ⁶	-8,8 ± 0,1
POPS	18 ± 8	(3 ± 1) × 10 ⁶	-9,0 ± 0,4	16 ± 2	(3,4 ± 0,4) × 10 ⁶	-8,9 ± 0,1
POPC	*	*	*	29 ± 6	(1,9 ± 0,4) × 10 ⁶	-8,5 ± 0,1
POPC:POPS	*	*	*	*	*	*
SV-m	*	*	*	**	**	**

*No determinado

**No fue posible determinar el valor de τ_{AS}^u

Resultó llamativo que los valores de τ_{AS}^u obtenidos a partir del análisis de las curvas de autocorrelación de los oAS-A488 en presencia de un exceso de las LUVs de POPG y POPS fueran inferiores a los determinados para los mAS-A488 en las mismas condiciones (Figura 5.2 y Tabla A.1). Una explicación plausible sería la presencia de una fracción de oligómeros que contribuyen a la señal medida como una especie difusible que no participa del equilibrio de partición resultando así en menores tiempos de correlación. Se ha reportado que la agregación de AS en membranas involucra la extracción de lípidos de la bicapa y el agrupamiento de

los mismos entorno a agregados proteicos [180-182]. Dado que las especies prefibrilares reconocidas por el anticuerpo A11 se identificaron en los agregados formados sobre membranas soportadas, Reynolds y colaboradores sugirieron que la adición de oligómeros preformados a membranas podría resultar en la extracción de una pequeña cantidad de lípidos [180]. Teniendo en cuenta estos antecedentes y considerando que los oAS induce permeación de vesículas de POPG (Figura 4.2E) postulamos que se formarían especies oligoméricas conteniendo lípidos que no pueden reasociarse a las vesículas. Aproximando a las dos especies interactuantes, oligómeros y vesículas, como esferas rígidas en un complejo 1:1, su tiempo de correlación correspondería a la sumatoria de los tiempos de correlación de los oAS-A488 libre y los mAS-A488 en condición de saturación. Considerando esta aproximación, se recalcularon las curvas de titulación de POPG y POPS alcanzándose en ambos casos un *plateau* el cual, considerándolo como el 100 % de saturación, permitió estimar valores de K_p que fueron similares a los obtenidos anteriormente.

5.5 Interacción de los mAS y los oAS con vesículas sinápticas

Si bien numerosos trabajos señalan a AS como una proteína presináptica asociada a SVs [41-44] a la fecha no existen reportes cuantitativos sobre dicha interacción. Es por ello que empleamos FCS para evaluar la interacción de mAS-A488 y oAS-A488 con SVs y los resultados obtenidos se incluyen en la Figura 5.5.

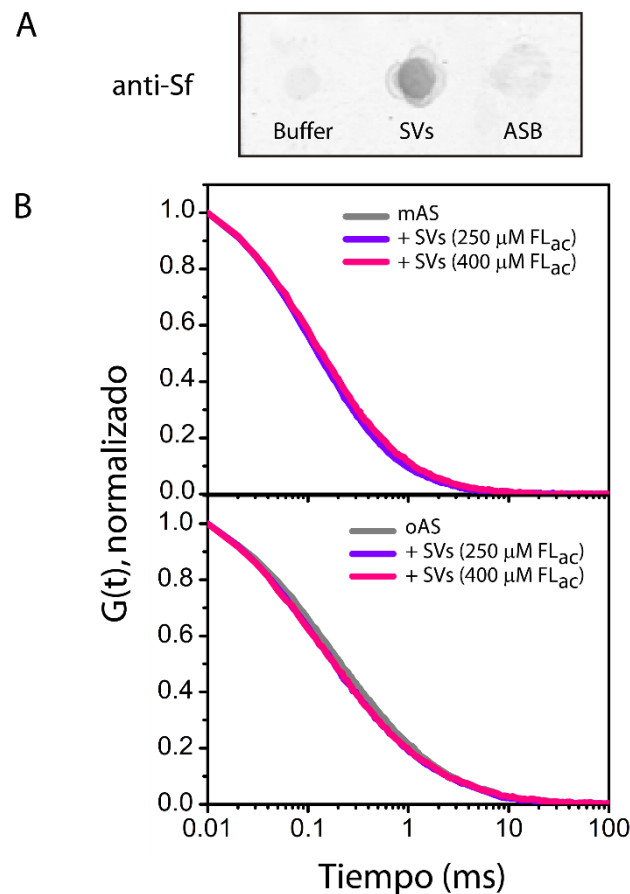


Figura 5.5 A, Identificación de SVs mediante la técnica de *dot blot* empleando el anticuerpo anti-sinaptofisina (anti-Sf) como marcador específico. Se utilizaron como controles negativos el mismo *buffer* utilizado para suspender las SVs y una solución de albumina sérica bovina (ASB). **B**, Curvas de autocorrelación normalizadas de mAS-A488 y oAS-A488 en presencia de SVs a dos concentraciones de fosfolípidos accesibles (FL_{ac}).

Se empleó el protocolo descrito recientemente por Ahmed y colaboradores [115] que permite el aislamiento de las SVs con un alto grado de pureza y rendimiento. Se consideró la posibilidad de que las vesículas obtenidas se encontraran saturadas con AS endógena ya que no contamos con un modelo de ratón *knock-out* para la proteína. Por ello, se realizó un tratamiento con una solución alcalina (Capítulo 2) a fin de disociar las proteínas periféricas. Las vesículas de ~ 34 nm de diámetro fueron inmunorreactivas para la glicoproteína integral de membrana sinaptofisina confirmando que la población purificada corresponde a SVs (Figura 5.5A). La adición de SVs a los mAS-A488 o los oAS-A488 no indujo cambios en las curvas de autocorrelación (Figura 5.5B) en el rango de concentración lipídica accesible utilizado. Estos resultados sugieren una baja afinidad de AS por las SVs.

5.6 Discusión

El estudio de la interacción de AS con membranas ha atraído considerable atención ya que parece ocupar un rol central tanto en la fisiología como en la patología vinculada a esta proteína. Si bien la función biológica de AS aún no se estableció fehacientemente, existe un consenso en que estaría involucrada en la mantención del reservorio distal de las SVs y en la regulación de la fusión de estas vesículas [61, 168]. En este sentido, muchas evidencias sustentan que AS es una proteína sensora de curvatura que interacciona preferencialmente con vesículas aniónicas de tamaños similares a las SVs [20, 40]. Por otro lado, se conoce que el daño a diferentes membranas celulares es uno de los mecanismos de toxicidad asociado a la agregación amiloide de AS [61, 168], aunque la naturaleza de la especie patogénica es materia de debate. La ausencia de una correlación directa entre el desarrollo de la enfermedad de Parkinson con la cantidad de inclusiones de AS o cuerpos de Lewy [183] llevó a postular que los oligómeros prefibrilares serían las especies más neurotóxicas. Es por ello que un gran número de grupos de investigación se enfocaron en dilucidar las bases fisicoquímicas de la asociación de los mAS a membranas, así como los mecanismos de daño a membranas inducidos por los oAS. Con la hipótesis de que la oligomerización podría acarrear una pérdida de función en adición a la ya documentada ganancia de toxicidad de los oAS, en este capítulo abordamos el estudio de la interacción de los oAS con biomembranas, con especial interés en la sensibilidad a curvatura.

Estudios recientes mostraron que la acetilación N-terminal de AS tiene un muy bajo impacto en las propiedades de unión a biomembranas [184]. Por este motivo y a fines comparativos con trabajos ya publicados, se utilizó AS no acetilada. Por otro lado, si bien la comparación exacta de los parámetros termodinámicos de interacción determinados en este trabajo con los publicados por los distintos grupos no es posible debido a las diferentes condiciones experimentales empleadas (composición, tamaño de vesículas, fuerza iónica, etc.), los resultados se discutirán referidos a cambios relativos en cada caso.

Se determinó que los mAS-A488 se une a las SUVs y LUVs compuestas de POPG o POPS con afinidades similares (Figura 5.4 y Tabla 5.1) indicando que la proteína no tiene una especificidad particular por las cabezas polares de estos lípidos, en concordancia con datos reportados anteriormente [38, 185]. Asimismo, se comprobó que la interacción es favorecida por el aumento de la densidad de carga negativa y de la curvatura de las membranas en correlación con estudios previos [20, 37, 38, 40]. La sensibilidad dual de AS hacia los lípidos cargados y curvatura fue racionalizada en términos de las características químicas particulares de la hélice anfipática extendida que se forma en el extremo N-terminal de la proteína (residuos Met¹-Ala⁹⁰) [36] al interactuar con membranas [39, 40]. La hélice anfipática de AS se encuentra desbalanceada ya que su cara hidrofóbica es poco desarrollada por estar formada mayoritariamente por residuos poco volumino-

tos como Val, Ala y Thr y su cara hidrofílica posee una distribución equitativa de residuos Lys en sus dos extremos (Figura 1.4B). Pranke y colaboradores propusieron que la curvatura de la membrana facilitaría la inserción de la hélice anfipática en la región interfacial y la mínima contribución de la cara hidrofóbica a la interacción sería compensada por las interacciones electrostáticas [40]. Sin embargo, los valores derivados de ΔG_p^o (Tabla 5.1), los cuales incluyen tanto la contribución electrostática como la hidrofóbica, indican que esta última no debe ser subestimada. Asumiendo que la contribución hidrofóbica es similar en las vesículas formadas por POPG, POPS, POPC y POPC:POPS, los valores de ΔG_p^o (Tabla 5.1) sugieren que la inserción de los residuos hidrofóbicos e incluso de las cadenas laterales hidrocarbonadas de los residuos Lys [186] en la bicapa contribuyen significativamente a la interacción. Notablemente, esta contribución es mayor en vesículas de alta curvatura a juzgar por los valores de ΔG_p^o determinados para las SUVs y LUVs de dichas composiciones (Tabla 5.1). En base a estos resultados, proponemos que la contribución hidrofóbica proporciona la fuerza termodinámica impulsora para la asociación de AS a las membranas, posiblemente para compensar defectos de empaquetamiento especialmente exacerbados en las vesículas pequeñas [39, 176].

Existen reportes contradictorios en relación a la interacción de AS con membranas zwitteriónicas. Mientras algunos autores señalan que AS es incapaz de unirse a membranas de POPC [20] o de PC:POPE:colesterol excepto a las de muy alta curvatura [40], otros han reportado unión a vesículas de POPC con diferentes afinidades (este trabajo y ref. [37, 38, 184, 187]). Estas diferencias podrían provenir de las distintas condiciones experimentales, diferencias en los tamaños de los liposomas empleados o la composición de los mismos. En este sentido, en un estudio reciente se demostró que el agregado de colesterol a las membranas de POPC abole completamente la unión de AS [184], lo cual podría explicarse por el ordenamiento de los lípidos promovido por el colesterol y la reducida afinidad de AS por la fase líquido ordenada [188, 189]. Este efecto podría conciliar lo encontrado en el caso de la mezcla PC:POPE:colesterol [40]. Es interesante notar que AS fue capaz de unirse a vesículas conteniendo 25 % de colesterol y solo un 10 % de lípidos aniónicos en la mezcla lipídica que asemeja la composición y curvatura de las vesículas sinápticas (Figura 5.4 y Tabla 5.1), consistente con su función fisiológica propuesta [61, 168]. Por otro lado, los resultados obtenidos en presencia de SVs (Figura 5.5) sugieren una K_d^{ap} en el orden mM, en correlación con estudios de localización subcelular de AS en los que se sugiere que la asociación con las SVs es débil y que la mayor parte de la proteína se encontraría soluble en el terminal presináptico [190, 191].

Los diferentes estados agregados de AS son capaces de asociarse a membranas lipídicas [98, 102, 192]. Se ha mostrado que ensamblajes de los oAS obtenidos a partir de protocolos experimentales similares a los empleados en esta tesis, comparten algunas de las propiedades de unión de los mAS teniendo mayor selectividad por membranas aniónicas en fase desordenada [101]. Además, esta interacción también está mediada por el extremo N-terminal de la proteína al menos hasta la posición Ala⁹⁰ [104]. En esta tesis mostramos cuantitativamente que, al igual que la proteína monomérica, los oAS no presentan selectividad por las cabezas polares de POPG o POPS (Figura 5.4 y Tabla 5.1).

Sin embargo, nuestros resultados muestran que la oligomerización afecta marcadamente la interacción de AS con membranas (Figura 5.4 y Tabla 5.1). Por un lado, la afinidad disminuye al punto que en algunos casos la asociación es abolida completamente. Resulta de especial interés destacar que en la mezcla que más se asemeja en composición a la de la membrana blanco de AS *in vivo*, no se observó unión de los oAS a vesículas de alta curvatura y solo una débil interacción con las de baja curvatura (Figura 5.2). Además, los oligómeros fueron insensibles a curvatura en las membranas compuestas 100% de lípidos aniónicos e in-

teraccionaron con LUVS de POPC. Estos cambios drásticos en la sensibilidad a curvatura podrían resultar de restricciones conformacionales impuestas a la proteína en el agregado oligomérico.

Como se mencionó anteriormente, el extremo N-terminal de la proteína está involucrado en la unión de los oAS a membranas [104]. Estudios realizados mediante DC, indican que no hay cambios conformacionales significativos en los oAS tras interactuar con membranas aniónicas [98, 102], lo cual podría indicar una falta de estructuración de la hélice anfipática N-terminal. Por otro lado, en el *Capítulo 3* sugerimos que la región N-terminal de la proteína en los oAS estaría formando estructuras regulares y en el *Capítulo 4* postulamos que las mismas podrían corresponder a conformaciones de tipo *coiled-coil*. De esta manera, al menos una proporción de los residuos hidrofóbicos de la región N-terminal estarían ocultos en el interior de la hélice enrollada, mientras que los cargados, particularmente las Lys, estarían hacia el exterior. En este escenario, parches básicos en la superficie de los oAS podrían mediar la interacción con vesículas de lípidos aniónicos puros, aunque serían insensibles a los cambios de curvatura. Por otro lado, en el *Capítulo 4* mostramos que los oAS tendrían superficies hidrofóbicas expuestas, las cuales podrían ser determinantes en la asociación a membranas zwitteriónicas de baja curvatura, e incluso a membranas planas [133, 193].

En neuronas sanas, interacciones de AS con las SVs asistirían en la estabilización de estas vesículas relajando tensiones de curvatura evitando así eventos de fusión prematuros y manteniéndolas en un reservorio alejado del sitio de la sinapsis [168]. La pérdida de AS originaría una depleción de este reservorio ya que estas vesículas serían degradadas o se fusionarían muy eficientemente con sus membranas blanco [168]. Los resultados expuestos en este capítulo presentan evidencias que la oligomerización amiloide de AS podría resultar en detrimento de la viabilidad celular por un mecanismo de pérdida de función, no solo por disminuir la cantidad de proteína soluble funcional sino también por no reconocer a su membrana blanco.

Conclusiones



Conclusiones

Dada la importancia y el rol crucial en la EP y en otras enfermedades neurodegenerativas, el presente trabajo de tesis doctoral se centró en el estudio de las especies oligoméricas amiloides de AS. En términos generales, se caracterizó la organización supramolecular de estas especies, definiendo regiones próximas espacialmente dentro de los agregados. Además, se evidenció el rearrreglo conformacional involucrado en la amiloidogénesis. A su vez se evaluaron las propiedades de unión de estos oligómeros a vesículas lipídicas de distinta composición y curvatura. Del análisis minucioso de los resultados presentados en los distintos capítulos surgen las conclusiones que se detallan a continuación:

- Las posiciones específicas que incluyen las regiones NAC, N- y C-terminal de AS se encuentran escondidas del solvente en el ensamble oligomérico. Esto contrasta con la conformación fibrilar donde los dos terminales están expuestos al solvente.
- Las posiciones Val⁴⁰, Val⁵⁵ y Ala⁷⁶ que se localizan en regiones que en el arreglo fibrilar forman las hojas $\beta 1$ y $\beta 3$ están próximas en las moléculas vecinas en el agregado oligomérico. Proponemos que estas regiones estarían involucradas en las interacciones β tempranas en estos agregados.
- Los sitios de la región N-terminal de la proteína que no están involucrados en contactos hoja- β fibrilares se encuentran próximos en los oAS sugiriendo un alto empaquetamiento y la adopción de una estructura definida.
- Los sitios específicos de la región C-terminal se encuentran espacialmente separados entre ellos y también de los residuos testeados en la región N-terminal. Probablemente estos sitios se encuentren estructurados y participando de interacciones con otros residuos no testeados.
- La N^α-acetilación de AS no tiene un efecto prominente en diversas propiedades biofísicas (propiedades hidrodinámicas, morfológicas, de tinción, estructurales y de ruptura de membrana) de los distintos ensamblajes conformacionales, monómero, oligómero y fibras, de la proteína.
- Comparados con el monómero, los oAS y los oAS-Ac muestran un incremento de la contribución helicoidal relativa a la estructura desordenada. Postulamos que ésta podría provenir de la estructuración de la porción N-terminal en un arreglo de tipo *coiled-coil*.
- El proceso de amiloidogénesis de los mAS y los mAS-Ac demanda un fuerte re-arreglo conformacional de la proteína. En éste, la red de interacciones hoja- β tempranas antiparalelas se modifica para adoptar la conformación paralela del estado amiloide. Proponemos que la región $\beta 3$ permanecería estructurada como hoja- β a lo largo de esta conversión estructural y que el re-arreglo ocurre a través de especies ricas en estructuras helicoidales/desordenadas.

- Los mAS no tienen especificidad particular por las cabezas polares de los lípidos POPG o POPS en condiciones fisiológicas. La unión de los mAS a las membranas es favorecida por el aumento de la densidad de carga negativa y de la curvatura de las mismas.
- Los oAS tampoco presentan selectividad por las cabezas polares de POPG o POPS.
- La oligomerización de AS afecta marcadamente la interacción de la proteína con las membranas, disminuyendo la afinidad y llegando, incluso, a abolir completamente la asociación como en el caso de la mezcla lipídica que más se asemeja a la composición de las SVs.
- La oligomerización de AS afecta marcadamente la sensibilidad a la curvatura. Los oAS son insensibles a curvatura en membranas 100% aniónicas e interaccionan preferencialmente con membranas neutras de baja curvatura.
- La asociación de AS a su membrana blanco natural (SVs) sería de baja afinidad, posiblemente del orden mM.

Anexo

A.1 Estabilidad conformacional de los oAS

En el *Capítulo 3* se presentan los resultados de experimentos de desnaturalización de los oAS inducida químicamente. A fin de asegurar una condición de equilibrio se comparó la respuesta espectral de muestras incubadas en presencia del desnaturalizante a diferentes tiempos. En la Figura A.1A se incluye un ejemplo representativo para los oAS-acri marcados en la posición Ala⁷⁶ donde se observa esencialmente el mismo corrimiento desde los 20 min hasta las 17 h de incubación indicando que se alcanzó el equilibrio conformacional.

Por otro lado, soluciones de mAS-acri a igual concentración incubadas en 4 M GdmCl exhibieron la misma intensidad de fluorescencia independientemente de la posición de la sonda, como se muestra en la Figura A.1B para las variantes Ser⁹, Ala⁷⁶ y Ala¹²⁴ como casos representativos para proteínas marcadas en la región N-terminal, central y C-terminal, respectivamente. De esta manera, luego de la sustracción de la curva blanco respectiva, los espectros mostrados en la Figura 3.5 se escalaron en relación a la intensidad absoluta medida a 4 M GdmCl para incluir información sobre los rendimientos relativos entre las diferentes variantes.

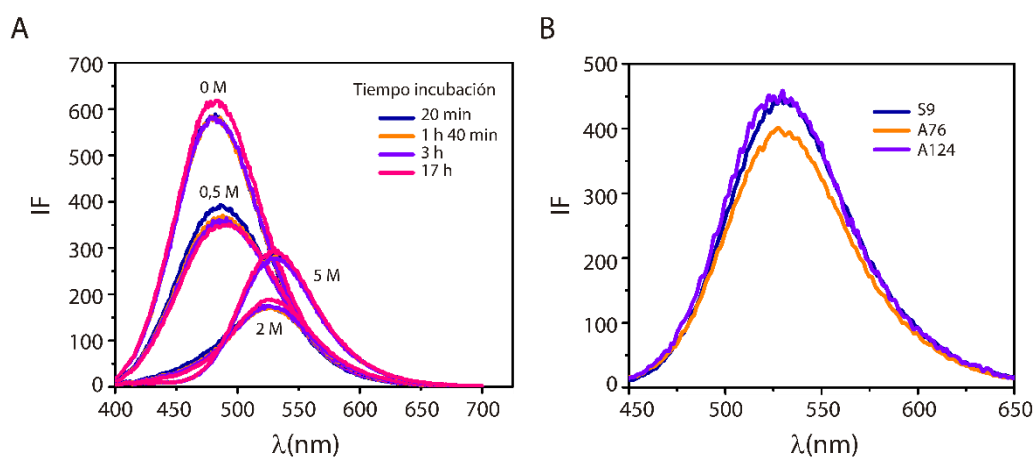


Figura A.1 A, Espectros de acrilodan de oAS-acri marcados en la posición Ala⁷⁶ incubadas durante diferentes tiempos en distintas concentraciones de GdmCl. **B**, Espectros de acrilodan de mAS-acri marcadas en distintas posiciones en soluciones de GdmCl 4 M.

A.2 Espectroscopia de Correlación de Fluorescencia

La técnica [169, 170] se basa en el análisis de la correlación temporal de las fluctuaciones de la intensidad de la fluorescencia (Figura A.1B) de un pequeño número de moléculas difundiendo a través del volumen focal definido por un láser de excitación, típicamente de 1fL (Figura A.1A). El análisis de auto-similaridad de la señal a diferentes intervalos de tiempos se realiza según la función de autocorrelación G_{τ} :

$$G(\tau) = \frac{\langle \delta F(t) \cdot \delta F(t+\tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} \quad \text{Ecuación A1}$$

donde $\langle F(t) \rangle$ es la intensidad de fluorescencia promedio, $\delta F(t)$ y $\delta F(t+\tau)$ las variaciones del promedio al tiempo t y al tiempo posterior $t + \tau$, respectivamente (Figura A.1B). El cálculo se realiza sobre muchos valores de τ obteniéndose la curva de autocorrelación (Figura A.1C) la cual se analiza posteriormente con una función matemática apropiada dependiendo de las características del sistema en estudio.

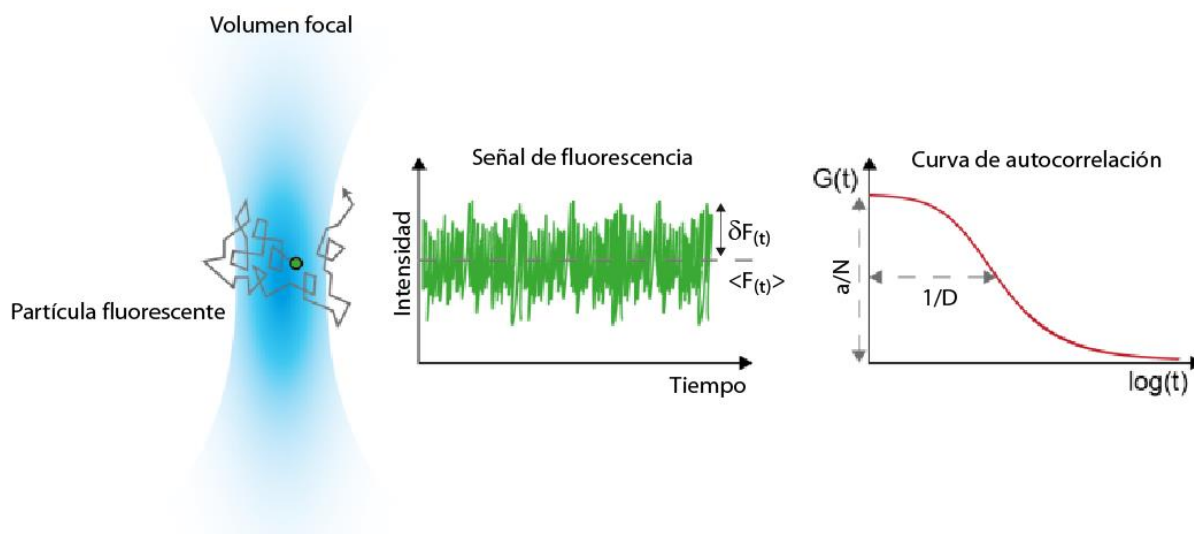


Figura A.2 Esquema que representa los principios de la técnica de FCS. Las moléculas fluorescentes que difunden a través de un volumen focal determinado por el límite de difracción resulta en una señal de fluorescencia fluctuante. El análisis de estas fluctuaciones genera las curvas de autocorrelación a partir de las cuales se puede obtener el coeficiente de difusión de las moléculas que es inversamente proporcional al ancho de la curva y el número de partículas que es la recíproca de la amplitud.

En el caso más simple donde las fluctuaciones se originan por una única especie fluorescente difundiéndose a través de un volumen de excitación tridimensional de forma Gaussiana, la expresión para $G(\tau)$ toma la forma de la Ecuación 3 presentada en el *Capítulo 2*:

$$G(\tau) = \frac{1}{N} \left[\frac{1}{1 + \frac{\tau}{\tau_D}} \left(\frac{1}{1 + \frac{s^2 \tau}{\tau_D}} \right)^{\frac{1}{2}} \right] \quad \text{Ecuación A2}$$

El tiempo de difusión característico de la especie fluorescente τ_D se relaciona con el coeficiente de difusión D según:

$$\tau_D = \frac{\omega^2}{4D} \quad \text{Ecuación A3}$$

donde ω es el radio axial del volumen de observación. De esta manera, τ_D provee información sobre el tamaño de la molécula a través de la ecuación de Stokes-Einstein-Sutherland:

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta r} \quad \text{Ecuación A4}$$

donde k es la constante de Boltzmann, T la temperatura absoluta, η la viscosidad del medio y r el radio de Stokes de la partícula.

Además, $G(\tau)$ se relaciona inversamente con la concentración absoluta de partículas ya que:

$$G(0) = \frac{1}{N} \quad \text{Ecuación A5}$$

Por lo tanto, este método permite obtener información sobre el tamaño de la especie fluorescente ($\tau_D \propto 1/D$) y, si las dimensiones del volumen confocal es conocido, la concentración de la misma ($G(0) \propto 1/N$).

Como prueba de concepto, en la Figura A.3 se muestran las curvas de autocorrelación obtenidas para vesículas unilamelares de diferentes tamaños, donde se observa un desplazamiento hacia mayores tiempos de correlación a medida que incrementa el diámetro de las vesículas (Ecuaciones A3 y A4). Este comportamiento es fácilmente entendible considerando que, al difundir más lentamente, las partículas residen más tiempo en el volumen focal y por consiguiente la señal está más correlacionada. Los valores de τ_D obtenidos a partir del ajuste de las curvas con la Ecuación A2 varían linealmente con los diámetros de vesículas lipídicas determinados independientemente mediante DLS (inserto en Figura A.3). La conversión de los valores de τ_D a diámetros, utilizando nanopartículas fluorescentes TetraSpeck de tamaño conocido para la determinación del volumen focal, correlacionaron con los obtenidos por DLS indicando que la técnica provee medidas precisas de difusión.

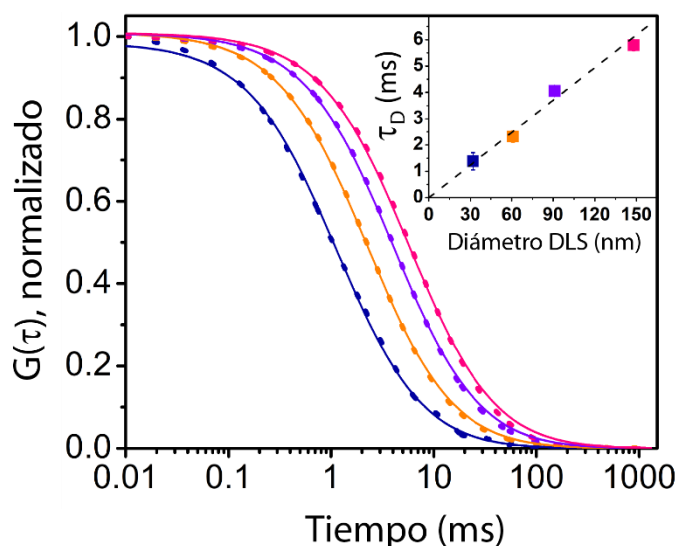


Figura A.3 Determinación de τ_D a partir de medidas de FCS. Curvas de autocorrelación de vesículas de POPG de ~32 nm (●), ~61 nm (●), ~91 nm (●), ~148 nm (●) de diámetro. Las curvas se ajustaron con la Ecuación A2 (*Anexo*) para determinar τ_D (líneas continuas con el mismo código de color). Los valores de τ_D se graficaron en función del diámetro de las vesículas determinado por DLS (recuadro), dando una relación lineal. Las vesículas contienen 0,005% de Rodamina-PE de huevo para su observación.

Para los experimentos de titulación se determinaron los tiempos de difusión característicos de las especies monoméricas y oligoméricas libres (τ_{AS}) y unidas a las vesículas (τ_{AS}^u) los cuales se indican en la Tabla A.1 y en forma gráfica en la Figura A.4.

Tabla A.1 Tiempos de correlación característicos para mAS-A488 y oAS-A488 libres en solución (τ_{AS}) y en condición de saturación (τ_{AS}^u)

Lípidos	mAS				oAS			
	SUVs		LUVs		SUVs		LUVs	
	τ_{AS} (ms)	τ_{AS}^u (ms)	τ_{AS} (ms)	τ_{AS}^u (ms)	τ_{AS} (ms)	τ_{AS}^u (ms)	τ_{AS} (ms)	τ_{AS}^u (ms)
POPG	0,16	0,48	0,15	1,66	0,59	1,12	0,63	1,34
POPS	0,16	0,59	0,16	2,03	0,55	0,81	0,51	1,49
POPC	0,16	0,39	0,15	2,05	0,42	*	0,62	2,93
POPC:POPS	0,14	0,36	0,16	1,22	0,59	*	0,54	*
SV-m	0,17	0,46	0,15	**	0,57	*	0,50	**

*No determinado

**No fue posible determinar el valor de τ_{AS}^u

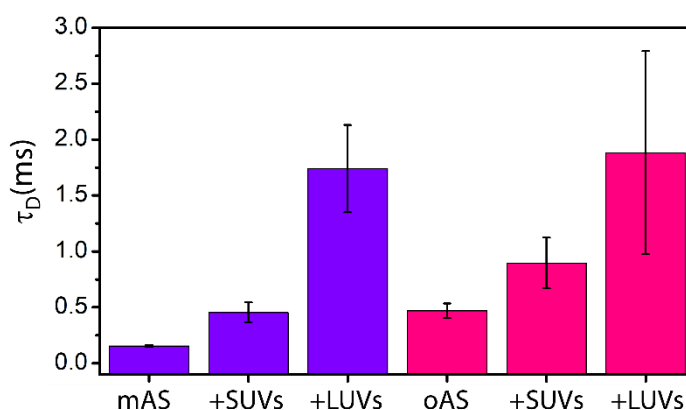


Figura A.4 Tiempos de correlación característicos de mAS-A488 (■) y oAS-A488 (■) libres en solución y en condición de saturación con SUVs y LUVs.

Para evaluar la estabilidad de las vesículas en presencia de la proteína se incubó una suspensión de SUVs de POPG (marcadas con 0,005% de Rodamina-PE de huevo) con mAS 100 nM sin marcar durante 24 h. No se observaron cambios en la curva de autocorrelación que pudieran indicar agregación u otra alteración en la difusión de la vesícula (Figura A.5).

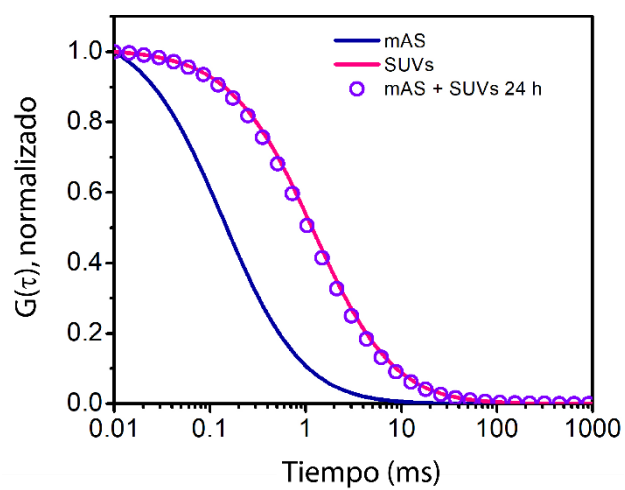


Figura A.5 Curvas de autocorrelación de SUVs de POPG marcadas con Rodamina-PE de huevo en ausencia (—) y presencia (○) de mAS a una relación molar $[L]_{ac}/[P] \sim 6000$. La curva correspondiente a mAS-A488(—) se muestra en forma comparativa.

Referencias

Referencias

1. Finkelstein AV, *Protein physics : a course of lectures*. 2002, Amsterdam ; London: Academic.
2. Anfinsen CB, *Principles that govern the folding of protein chains*. Science, 1973. **181**(4096): p. 223-30.
3. Levinthal C, *Are there pathways for protein folding?* 1968: Journal de Chimie Physique. p. 44.
4. Onuchic JN; Luthey-Schulten Z and Wolynes PG, *Theory of protein folding: the energy landscape perspective*. Annu Rev Phys Chem, 1997. **48**: p. 545-600.
5. Dill KA; Ozkan SB; Shell MS and Weikl TR, *The protein folding problem*. Annu Rev Biophys, 2008. **37**: p. 289-316.
6. Turoverov KK; Kuznetsova IM and Uversky VN, *The protein kingdom extended: ordered and intrinsically disordered proteins, their folding, supramolecular complex formation, and aggregation*. Prog Biophys Mol Biol, 2010. **102**(2-3): p. 73-84.
7. Chiti F and Dobson CM, *Protein Misfolding, Amyloid Formation, and Human Disease: A Summary of Progress Over the Last Decade*. Annu Rev Biochem, 2017. **86**: p. 27-68.
8. Guijarro JI; Sunde M; Jones JA; Campbell ID and Dobson CM, *Amyloid fibril formation by an SH3 domain*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(8): p. 4224-8.
9. Gazit E, *The "Correctly Folded" state of proteins: is it a metastable state?* Angew Chem Int Ed Engl, 2002. **41**(2): p. 257-9.
10. Baldwin AJ; Knowles TP; Tartaglia GG; Fitzpatrick AW; Devlin GL; Shammas SL; Waudby CA; Mossuto MF; Meehan S; Gras SL; Christodoulou J; Anthony-Cahill SJ; Barker PD; Vendruscolo M and Dobson CM, *Metastability of native proteins and the phenomenon of amyloid formation*. J Am Chem Soc, 2011. **133**(36): p. 14160-3.
11. Uversky VN, *Intrinsically disordered proteins from A to Z*. Int J Biochem Cell Biol, 2011. **43**(8): p. 1090-103.
12. Dyson HJ and Wright PE, *Elucidation of the protein folding landscape by NMR*. Methods Enzymol, 2005. **394**: p. 299-321.
13. Uversky VN; Oldfield CJ and Dunker AK, *Intrinsically disordered proteins in human diseases: introducing the D2 concept*. Annu Rev Biophys, 2008. **37**: p. 215-46.
14. Arosio P; Knowles TP and Linse S, *On the lag phase in amyloid fibril formation*. Phys Chem Chem Phys, 2015. **17**(12): p. 7606-18.
15. Ferrone F, *Analysis of protein aggregation kinetics*. Methods Enzymol, 1999. **309**: p. 256-74.
16. Naiki H and Gejyo F, *Kinetic analysis of amyloid fibril formation*. Methods Enzymol, 1999. **309**: p. 305-18.
17. Wilson M, *Potential roles of abundant extracellular chaperones in the control of amyloid formation and toxicity*. 2008, Mol. BioSyst. p. 42-52.

18. Iwai A; Masliah E; Yoshimoto M; Ge N; Flanagan L; de Silva HA; Kittel A and Saitoh T, *The precursor protein of non-A beta component of Alzheimer's disease amyloid is a presynaptic protein of the central nervous system*. *Neuron*, 1995. **14**(2): p. 467-75.
19. Anderson JP; Walker DE; Goldstein JM; de Laat R; Banducci K; Caccavello RJ; Barbour R; Huang J; Kling K; Lee M; Diep L; Keim PS; Shen X; Chataway T; Schlossmacher MG; Seubert P; Schenk D; Sinha S; Gai WP and Chilcote TJ, *Phosphorylation of Ser-129 is the dominant pathological modification of alpha-synuclein in familial and sporadic Lewy body disease*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(40): p. 29739-52.
20. Davidson WS; Jonas A; Clayton DF and George JM, *Stabilization of alpha-synuclein secondary structure upon binding to synthetic membranes*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(16): p. 9443-9.
21. Giasson BI; Murray IV; Trojanowski JQ and Lee VM, *A hydrophobic stretch of 12 amino acid residues in the middle of alpha-synuclein is essential for filament assembly*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(4): p. 2380-6.
22. Weinreb PH; Zhen W; Poon AW; Conway KA and Lansbury PT, *NACP, a protein implicated in Alzheimer's disease and learning, is natively unfolded*. *Biochemistry*, 1996. **35**(43): p. 13709-15.
23. Eliezer D; Kutluay E; Bussell R and Browne G, *Conformational properties of alpha-synuclein in its free and lipid-associated states*. *J Mol Biol*, 2001. **307**(4): p. 1061-73.
24. Camilloni C; De Simone A; Vranken WF and Vendruscolo M, *Determination of secondary structure populations in disordered states of proteins using nuclear magnetic resonance chemical shifts*. *Biochemistry*, 2012. **51**(11): p. 2224-31.
25. Roche J; Ying J; Maltsev AS and Bax A, *Impact of hydrostatic pressure on an intrinsically disordered protein: a high-pressure NMR study of alpha-synuclein*. *Chembiochem*, 2013. **14**(14): p. 1754-61.
26. Schwalbe M; Ozenne V; Bibow S; Jaremko M; Jaremko L; Gajda M; Jensen MR; Biernat J; Becker S; Mandelkow E; Zweckstetter M and Blackledge M, *Predictive atomic resolution descriptions of intrinsically disordered hTau40 and alpha-synuclein in solution from NMR and small angle scattering*. *Structure*, 2014. **22**(2): p. 238-49.
27. Bertocini CW; Jung YS; Fernandez CO; Hoyer W; Griesinger C; Jovin TM and Zweckstetter M, *Release of long-range tertiary interactions potentiates aggregation of natively unstructured alpha-synuclein*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(5): p. 1430-5.
28. Esteban-Martín S; Silvestre-Ryan J; Bertocini CW and Salvatella X, *Identification of fibril-like tertiary contacts in soluble monomeric alpha-synuclein*. *Biophys J*, 2013. **105**(5): p. 1192-8.
29. Bartels T; Choi JG and Selkoe DJ, *alpha-Synuclein occurs physiologically as a helically folded tetramer that resists aggregation*. *Nature*, 2011. **477**(7362): p. 107-10.
30. Binolfi A; Theillet FX and Selenko P, *Bacterial in-cell NMR of human alpha-synuclein: a disordered monomer by nature?* *Biochem Soc Trans*, 2012. **40**(5): p. 950-4.
31. Burré J; Vivona S; Diao J; Sharma M; Brunker AT and Südhof TC, *Properties of native brain alpha-synuclein*. *Nature*, 2013. **498**(7453): p. E4-6; discussion E6-7.
32. Fauvet B; Mbefo MK; Fares MB; Desobry C; Michael S; Ardah MT; Tsika E; Coune P; Prudent M; Lion N; Eliezer D; Moore DJ; Schneider B; Aebischer P; El-Agnaf OM; Masliah E and Lashuel HA, *alpha-Synuclein in central nervous system and from erythrocytes, mammalian cells, and Escherichia coli exists predominantly as disordered monomer*. *J Biol Chem*, 2012. **287**(19): p. 15345-64.
33. Theillet FX; Binolfi A; Bekei B; Martorana A; Rose HM; Stuiver M; Verzini S; Lorenz D; van Rossum M; Goldfarb D and Selenko P, *Structural disorder of monomeric alpha-synuclein persists in mammalian cells*. *Nature*, 2016. **530**(7588): p. 45-50.

34. Fusco G; De Simone A; Gopinath T; Vostrikov V; Vendruscolo M; Dobson CM and Veglia G, *Direct observation of the three regions in α -synuclein that determine its membrane-bound behaviour*. Nat Commun, 2014. **5**: p. 3827.
35. Ulmer TS; Bax A; Cole NB and Nussbaum RL, *Structure and dynamics of micelle-bound human alpha-synuclein*. J Biol Chem, 2005. **280**(10): p. 9595-603.
36. Jao CC; Hegde BG; Chen J; Haworth IS and Langen R, *Structure of membrane-bound alpha-synuclein from site-directed spin labeling and computational refinement*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(50): p. 19666-71.
37. Rhoades E; Ramlall TF; Webb WW and Eliezer D, *Quantification of alpha-synuclein binding to lipid vesicles using fluorescence correlation spectroscopy*. Biophys J, 2006. **90**(12): p. 4692-700.
38. Middleton ER and Rhoades E, *Effects of curvature and composition on α -synuclein binding to lipid vesicles*. Biophys J, 2010. **99**(7): p. 2279-88.
39. Antony B, *Mechanisms of membrane curvature sensing*. Annu Rev Biochem, 2011. **80**: p. 101-23.
40. Pranke IM; Morello V; Bigay J; Gibson K; Verbavatz JM; Antony B and Jackson CL, *α -Synuclein and ALPS motifs are membrane curvature sensors whose contrasting chemistry mediates selective vesicle binding*. J Cell Biol, 2011. **194**(1): p. 89-103.
41. Maroteaux L; Campanelli JT and Scheller RH, *Synuclein: a neuron-specific protein localized to the nucleus and presynaptic nerve terminal*. J Neurosci, 1988. **8**(8): p. 2804-15.
42. Murphy DD; Rueter SM; Trojanowski JQ and Lee VM, *Synucleins are developmentally expressed, and alpha-synuclein regulates the size of the presynaptic vesicular pool in primary hippocampal neurons*. J Neurosci, 2000. **20**(9): p. 3214-20.
43. Cabin DE; Shimazu K; Murphy D; Cole NB; Gottschalk W; McIlwain KL; Orrison B; Chen A; Ellis CE; Paylor R; Lu B and Nussbaum RL, *Synaptic vesicle depletion correlates with attenuated synaptic responses to prolonged repetitive stimulation in mice lacking alpha-synuclein*. J Neurosci, 2002. **22**(20): p. 8797-807.
44. Larsen KE; Schmitz Y; Troyer MD; Mosharov E; Dietrich P; Quazi AZ; Savalle M; Nemani V; Chaudhry FA; Edwards RH; Stefanis L and Sulzer D, *Alpha-synuclein overexpression in PC12 and chromaffin cells impairs catecholamine release by interfering with a late step in exocytosis*. J Neurosci, 2006. **26**(46): p. 11915-22.
45. Chandra S; Fornai F; Kwon HB; Yazdani U; Atasoy D; Liu X; Hammer RE; Battaglia G; German DC; Castillo PE and Südhof TC, *Double-knockout mice for alpha- and beta-synucleins: effect on synaptic functions*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(41): p. 14966-71.
46. Nemani VM; Lu W; Berge V; Nakamura K; Onoa B; Lee MK; Chaudhry FA; Nicoll RA and Edwards RH, *Increased expression of alpha-synuclein reduces neurotransmitter release by inhibiting synaptic vesicle re-clustering after endocytosis*. Neuron, 2010. **65**(1): p. 66-79.
47. Chandra S; Gallardo G; Fernández-Chacón R; Schlüter OM and Südhof TC, *Alpha-synuclein cooperates with CSP α in preventing neurodegeneration*. Cell, 2005. **123**(3): p. 383-96.
48. Burré J; Sharma M; Tsetsenis T; Buchman V; Etherton MR and Südhof TC, *Alpha-synuclein promotes SNARE-complex assembly in vivo and in vitro*. Science, 2010. **329**(5999): p. 1663-7.
49. Diao J; Burré J; Vivona S; Cipriano DJ; Sharma M; Kyoung M; Südhof TC and Brunger AT, *Native α -synuclein induces clustering of synaptic-vesicle mimics via binding to phospholipids and synaptobrevin-2/VAMP2*. Elife, 2013. **2**: p. e00592.
50. DeWitt DC and Rhoades E, *α -Synuclein can inhibit SNARE-mediated vesicle fusion through direct interactions with lipid bilayers*. Biochemistry, 2013. **52**(14): p. 2385-7.

51. Lai Y; Kim S; Varkey J; Lou X; Song JK; Diao J; Langen R and Shin YK, *Nonaggregated α -synuclein influences SNARE-dependent vesicle docking via membrane binding*. *Biochemistry*, 2014. **53**(24): p. 3889-96.
52. Uéda K; Fukushima H; Masliah E; Xia Y; Iwai A; Yoshimoto M; Otero DA; Kondo J; Ihara Y and Saitoh T, *Molecular cloning of cDNA encoding an unrecognized component of amyloid in Alzheimer disease*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. **90**(23): p. 11282-6.
53. Spillantini MG; Schmidt ML; Lee VM; Trojanowski JQ; Jakes R and Goedert M, *Alpha-synuclein in Lewy bodies*. *Nature*, 1997. **388**(6645): p. 839-40.
54. Dauer W and Przedborski S, *Parkinson's disease: mechanisms and models*. *Neuron*, 2003. **39**(6): p. 889-909.
55. Bradbury J, *Alpha-synuclein gene triplication discovered in Parkinson's disease*. *Lancet Neurol*, 2003. **2**(12): p. 715.
56. Polymeropoulos MH; Lavedan C; Leroy E; Ide SE; Dehejia A; Dutra A; Pike B; Root H; Rubenstein J; Boyer R; Stenroos ES; Chandrasekharappa S; Athanassiadou A; Papapetropoulos T; Johnson WG; Lazzarini AM; Duvoisin RC; Di Iorio G; Golbe LI and Nussbaum RL, *Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease*. *Science*, 1997. **276**(5321): p. 2045-7.
57. Zarranz JJ; Alegre J; Gómez-Esteban JC; Lezcano E; Ros R; Ampuero I; Vidal L; Hoenicka J; Rodriguez O; Atarés B; Llorens V; Gomez Tortosa E; del Ser T; Muñoz DG and de Yebenes JG, *The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia*. *Ann Neurol*, 2004. **55**(2): p. 164-73.
58. Krüger R; Kuhn W; Müller T; Woitalla D; Graeber M; Kösel S; Przuntek H; Epplen JT; Schöls L and Riess O, *Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease*. *Nat Genet*, 1998. **18**(2): p. 106-8.
59. 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 and Farrer MJ, *Alpha-synuclein p.H50Q, a novel pathogenic mutation for Parkinson's disease*. *Mov Disord*, 2013. **28**(6): p. 811-3.
60. Lesage S; Anheim M; Letournel F; Bousset L; Honoré A; Rozas N; Pieri L; Madiona K; Dürr A; Melki R; Verny C; Brice A and Group FPsDGS, *G51D α -synuclein mutation causes a novel parkinsonian-pyramidal syndrome*. *Ann Neurol*, 2013. **73**(4): p. 459-71.
61. Lashuel HA; Overk CR; Oueslati A and Masliah E, *The many faces of α -synuclein: from structure and toxicity to therapeutic target*. *Nat Rev Neurosci*, 2013. **14**(1): p. 38-48.
62. Bousset L; Pieri L; Ruiz-Arlandis G; Gath J; Jensen PH; Habenstein B; Madiona K; Olieric V; Böckmann A; Meier BH and Melki R, *Structural and functional characterization of two alpha-synuclein strains*. *Nat Commun*, 2013. **4**: p. 2575.
63. Gustot A; Gallea JI; Sarroukh R; Celej MS; Ruysschaert JM and Raussens V, *Amyloid fibrils are the molecular trigger of inflammation in Parkinson's disease*. *Biochem J*, 2015. **471**(3): p. 323-33.
64. Bussi C; Peralta Ramos JM; Arroyo DS; Gaviglio EA; Gallea JI; Wang JM; Celej MS and Iribarren P, *Autophagy down regulates pro-inflammatory mediators in BV2 microglial cells and rescues both LPS and alpha-synuclein induced neuronal cell death*. *Sci Rep*, 2017. **7**: p. 43153.
65. Sharon R; Bar-Joseph I; Frosch MP; Walsh DM; Hamilton JA and Selkoe DJ, *The formation of highly soluble oligomers of alpha-synuclein is regulated by fatty acids and enhanced in Parkinson's disease*. *Neuron*, 2003. **37**(4): p. 583-95.

66. Tofaris GK; Razaq A; Ghetti B; Lilley KS and Spillantini MG, *Ubiquitination of alpha-synuclein in Lewy bodies is a pathological event not associated with impairment of proteasome function*. J Biol Chem, 2003. **278**(45): p. 44405-11.
67. Tsigelny IF; Crews L; Desplats P; Shaked GM; Sharikov Y; Mizuno H; Spencer B; Rockenstein E; Trejo M; Platoshyn O; Yuan JX and Masliah E, *Mechanisms of hybrid oligomer formation in the pathogenesis of combined Alzheimer's and Parkinson's diseases*. PLoS One, 2008. **3**(9): p. e3135.
68. Kahle PJ; Neumann M; Ozmen L; Müller V; Odoj S; Okamoto N; Jacobsen H; Iwatsubo T; Trojanowski JQ; Takahashi H; Wakabayashi K; Bogdanovic N; Riederer P; Kretschmar HA and Haass C, *Selective insolubility of alpha-synuclein in human Lewy body diseases is recapitulated in a transgenic mouse model*. Am J Pathol, 2001. **159**(6): p. 2215-25.
69. Park MJ; Cheon SM; Bae HR; Kim SH and Kim JW, *Elevated levels of alpha-synuclein oligomer in the cerebrospinal fluid of drug-naïve patients with Parkinson's disease*. J Clin Neurol, 2011. **7**(4): p. 215-22.
70. Parnetti L; Chiasserini D; Persichetti E; Eusebi P; Varghese S; Qureshi MM; Dardis A; Deganuto M; De Carlo C; Castrioto A; Balducci C; Paciotti S; Tambasco N; Bembi B; Bonanni L; Onofri M; Rossi A; Beccari T; El-Agnaf O and Calabresi P, *Cerebrospinal fluid lysosomal enzymes and alpha-synuclein in Parkinson's disease*. Mov Disord, 2014. **29**(8): p. 1019-27.
71. Giasson BI; Duda JE; Quinn SM; Zhang B; Trojanowski JQ and Lee VM, *Neuronal alpha-synucleinopathy with severe movement disorder in mice expressing A53T human alpha-synuclein*. Neuron, 2002. **34**(4): p. 521-33.
72. Janezic S; Threlfell S; Dodson PD; Dowie MJ; Taylor TN; Potgieter D; Parkkinen L; Senior SL; Anwar S; Ryan B; Deltheil T; Kosillo P; Cioroch M; Wagner K; Ansorge O; Bannerman DM; Bolam JP; Magill PJ; Cragg SJ and Wade-Martins R, *Deficits in dopaminergic transmission precede neuron loss and dysfunction in a new Parkinson model*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(42): p. E4016-25.
73. Chen L; Jin J; Davis J; Zhou Y; Wang Y; Liu J; Lockhart PJ and Zhang J, *Oligomeric alpha-synuclein inhibits tubulin polymerization*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. **356**(3): p. 548-53.
74. Danzer KM; Haasen D; Karow AR; Moussaud S; Habeck M; Giese A; Kretschmar H; Hengerer B and Kostka M, *Different species of alpha-synuclein oligomers induce calcium influx and seeding*. J Neurosci, 2007. **27**(34): p. 9220-32.
75. Karpinar DP; Balija MB; Kügler S; Opazo F; Rezaei-Ghaleh N; Wender N; Kim HY; Taschenberger G; Falkenburger BH; Heise H; Kumar A; Riedel D; Fichtner L; Voigt A; Braus GH; Giller K; Becker S; Herzig A; Baldus M; Jäckle H; Eimer S; Schulz JB; Griesinger C and Zweckstetter M, *Pre-fibrillar alpha-synuclein variants with impaired beta-structure increase neurotoxicity in Parkinson's disease models*. EMBO J, 2009. **28**(20): p. 3256-68.
76. Cremades N; Cohen SI; Deas E; Abramov AY; Chen AY; Orte A; Sandal M; Clarke RW; Dunne P; Aprile FA; Bertocini CW; Wood NW; Knowles TP; Dobson CM and Klenerman D, *Direct observation of the interconversion of normal and toxic forms of alpha-synuclein*. Cell, 2012. **149**(5): p. 1048-59.
77. Mahul-Mellier AL; Vercruyse F; Maco B; Ait-Bouziad N; De Roo M; Muller D and Lashuel HA, *Fibril growth and seeding capacity play key roles in alpha-synuclein-mediated apoptotic cell death*. Cell Death Differ, 2015. **22**(12): p. 2107-22.
78. Taschenberger G; Garrido M; Tereshchenko Y; Bähr M; Zweckstetter M and Kügler S, *Aggregation of alphaSynuclein promotes progressive in vivo neurotoxicity in adult rat dopaminergic neurons*. Acta Neuropathol, 2012. **123**(5): p. 671-83.
79. Ingelsson M, *Alpha-Synuclein Oligomers-Neurotoxic Molecules in Parkinson's Disease and Other Lewy Body Disorders*. Front Neurosci, 2016. **10**: p. 408.

80. Cremades N; Chen SW and Dobson CM, *Structural Characteristics of α -Synuclein Oligomers*. Int Rev Cell Mol Biol, 2017. **329**: p. 79-143.
81. Miake H; Mizusawa H; Iwatsubo T and Hasegawa M, *Biochemical characterization of the core structure of alpha-synuclein filaments*. J Biol Chem, 2002. **277**(21): p. 19213-9.
82. Heise H; Hoyer W; Becker S; Andronesi OC; Riedel D and Baldus M, *Molecular-level secondary structure, polymorphism, and dynamics of full-length alpha-synuclein fibrils studied by solid-state NMR*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(44): p. 15871-6.
83. Der-Sarkissian A; Jao CC; Chen J and Langen R, *Structural organization of alpha-synuclein fibrils studied by site-directed spin labeling*. J Biol Chem, 2003. **278**(39): p. 37530-5.
84. Chen M; Margittai M; Chen J and Langen R, *Investigation of alpha-synuclein fibril structure by site-directed spin labeling*. J Biol Chem, 2007. **282**(34): p. 24970-9.
85. Vilar M; Chou HT; Lührs T; Maji SK; Riek-Loher D; Verel R; Manning G; Stahlberg H and Riek R, *The fold of alpha-synuclein fibrils*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(25): p. 8637-42.
86. Rodriguez JA; Ivanova MI; Sawaya MR; Cascio D; Reyes FE; Shi D; Sangwan S; Guenther EL; Johnson LM; Zhang M; Jiang L; Arbing MA; Nannenga BL; Hattne J; Whitelegge J; Brewster AS; Messerschmidt M; Boutet S; Sauter NK; Gonen T and Eisenberg DS, *Structure of the toxic core of α -synuclein from invisible crystals*. Nature, 2015. **525**(7570): p. 486-90.
87. Riek R and Eisenberg DS, *The activities of amyloids from a structural perspective*. Nature, 2016. **539**(7628): p. 227-235.
88. 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 VM; George JM and Rienstra CM, *Solid-state NMR structure of a pathogenic fibril of full-length human α -synuclein*. Nat Struct Mol Biol, 2016. **23**(5): p. 409-15.
89. Lashuel HA; Petre BM; Wall J; Simon M; Nowak RJ; Walz T and Lansbury PT, *Alpha-synuclein, especially the Parkinson's disease-associated mutants, forms pore-like annular and tubular protofibrils*. J Mol Biol, 2002. **322**(5): p. 1089-102.
90. Fauerbach JA; Yushchenko DA; Shahmoradian SH; Chiu W; Jovin TM and Jares-Erijman EA, *Supramolecular non-amyloid intermediates in the early stages of α -synuclein aggregation*. Biophys J, 2012. **102**(5): p. 1127-36.
91. Zijlstra N; Blum C; Segers-Nolten IM; Claessens MM and Subramaniam V, *Molecular composition of sub-stoichiometrically labeled α -synuclein oligomers determined by single-molecule photobleaching*. Angew Chem Int Ed Engl, 2012. **51**(35): p. 8821-4.
92. Zijlstra N; Claessens MM; Blum C and Subramaniam V, *Elucidating the aggregation number of dopamine-induced α -synuclein oligomeric assemblies*. Biophys J, 2014. **106**(2): p. 440-6.
93. Chen SW; Drakulic S; Deas E; Ouberai M; Aprile FA; Arranz R; Ness S; Roodveldt C; Guilliams T; De-Genst EJ; Klenerman D; Wood NW; Knowles TP; Alfonso C; Rivas G; Abramov AY; Valpuesta JM; Dobson CM and Cremades N, *Structural characterization of toxic oligomers that are kinetically trapped during α -synuclein fibril formation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015. **112**(16): p. E1994-2003.
94. Lorenzen N; Nielsen SB; Buell AK; Kaspersen JD; Arosio P; Vad BS; Paslawski W; Christiansen G; Valnickova-Hansen Z; Andreasen M; Enghild JJ; Pedersen JS; Dobson CM; Knowles TP and Otzen DE, *The role of stable α -synuclein oligomers in the molecular events underlying amyloid formation*. J Am Chem Soc, 2014. **136**(10): p. 3859-68.

95. Fusco G; Chen SW; Williamson PTF; Cascella R; Perni M; Jarvis JA; Cecchi C; Vendruscolo M; Chiti F; Cremades N; Ying L; Dobson CM and De Simone A, *Structural basis of membrane disruption and cellular toxicity by α -synuclein oligomers*. Science, 2017. **358**(6369): p. 1440-1443.
96. Bucciantini M; Calloni G; Chiti F; Formigli L; Nosi D; Dobson CM and Stefani M, *Prefibrillar amyloid protein aggregates share common features of cytotoxicity*. J Biol Chem, 2004. **279**(30): p. 31374-82.
97. Kaye R; Head E; Thompson JL; McIntire TM; Milton SC; Cotman CW and Glabe CG, *Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis*. Science, 2003. **300**(5618): p. 486-9.
98. Volles MJ; Lee SJ; Rochet JC; Shtilerman MD; Ding TT; Kessler JC and Lansbury PT, *Vesicle permeabilization by protofibrillar α -synuclein: implications for the pathogenesis and treatment of Parkinson's disease*. Biochemistry, 2001. **40**(26): p. 7812-9.
99. Ding TT; Lee SJ; Rochet JC and Lansbury PT, *Annular α -synuclein protofibrils are produced when spherical protofibrils are incubated in solution or bound to brain-derived membranes*. Biochemistry, 2002. **41**(32): p. 10209-17.
100. Celej MS; Sarroukh R; Goormaghtigh E; Fidelio GD; Ruysschaert JM and Raussens V, *Toxic prefibrillar α -synuclein amyloid oligomers adopt a distinctive antiparallel β -sheet structure*. Biochem J, 2012. **443**(3): p. 719-26.
101. van Rooijen BD; Claessens MM and Subramaniam V, *Membrane binding of oligomeric α -synuclein depends on bilayer charge and packing*. FEBS Lett, 2008. **582**(27): p. 3788-92.
102. van Rooijen BD; Claessens MM and Subramaniam V, *Lipid bilayer disruption by oligomeric α -synuclein depends on bilayer charge and accessibility of the hydrophobic core*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1788**(6): p. 1271-8.
103. Paslawski W; Mysling S; Thomsen K; Jørgensen TJ and Otzen DE, *Co-existence of two different α -synuclein oligomers with different core structures determined by hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry*. Angew Chem Int Ed Engl, 2014. **53**(29): p. 7560-3.
104. van Rooijen BD; van Leijenhorst-Groener KA; Claessens MM and Subramaniam V, *Tryptophan fluorescence reveals structural features of α -synuclein oligomers*. J Mol Biol, 2009. **394**(5): p. 826-33.
105. Mysling S; Betzer C; Jensen PH and Jørgensen TJ, *Characterizing the dynamics of α -synuclein oligomers using hydrogen/deuterium exchange monitored by mass spectrometry*. Biochemistry, 2013. **52**(51): p. 9097-103.
106. 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 and Abramov AY, *α -Synuclein Oligomers Interact with Metal Ions to Induce Oxidative Stress and Neuronal Death in Parkinson's Disease*. Antioxid Redox Signal, 2016. **24**(7): p. 376-91.
107. Masuda M; Dohmae N; Nonaka T; Oikawa T; Hisanaga S; Goedert M and Hasegawa M, *Cysteine misincorporation in bacterially expressed human α -synuclein*. FEBS Lett, 2006. **580**(7): p. 1775-9.
108. Wu CW and Yarbrough LR, *N-(1-pyrene)maleimide: a fluorescent cross-linking reagent*. Biochemistry, 1976. **15**(13): p. 2863-8.
109. LOWRY OH; ROSEBROUGH NJ; FARR AL and RANDALL RJ, *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. J Biol Chem, 1951. **193**(1): p. 265-75.

110. Prendergast FG; Meyer M; Carlson GL; Iida S and Potter JD, *Synthesis, spectral properties, and use of 6-acryloyl-2-dimethylaminonaphthalene (Acrylodan). A thiol-selective, polarity-sensitive fluorescent probe.* J Biol Chem, 1983. **258**(12): p. 7541-4.
111. Haugland RP and Spence MTZ, *The handbook : a guide to fluorescent probes and labeling technologies.* 10th edition ed. 2005, [United States?]: Invitrogen.
112. Thirunavukkuarasu S; Jares-Erijman EA and Jovin TM, *Multiparametric fluorescence detection of early stages in the amyloid protein aggregation of pyrene-labeled alpha-synuclein.* J Mol Biol, 2008. **378**(5): p. 1064-73.
113. Celej MS; Jares-Erijman EA and Jovin TM, *Fluorescent N-arylamino-naphthalene sulfonate probes for amyloid aggregation of alpha-synuclein.* Biophys J, 2008. **94**(12): p. 4867-79.
114. Fiske CH, *The Colorimetric Determination of Phosphorus,* in *Journal of Biological Chemistry*, Y. Subbarow, Editor. 1925. p. 375-400.
115. Ahmed S; Holt M; Riedel D and Jahn R, *Small-scale isolation of synaptic vesicles from mammalian brain.* Nat Protoc, 2013. **8**(5): p. 998-1009.
116. Chirgadze YN and Nevskaya NA, *Infrared spectra and resonance interaction of amide-I vibration of the antiparallel-chain pleated sheet.* Biopolymers, 1976. **15**(4): p. 607-25.
117. Byler DM and Susi H, *Examination of the secondary structure of proteins by deconvolved FTIR spectra.* Biopolymers, 1986. **25**(3): p. 469-87.
118. Goormaghtigh E; Cabiaux V and Ruyschaert JM, *Determination of soluble and membrane protein structure by Fourier transform infrared spectroscopy. I. Assignments and model compounds.* Subcell Biochem, 1994. **23**: p. 329-62.
119. Goormaghtigh E; Cabiaux V and Ruyschaert JM, *Determination of soluble and membrane protein structure by Fourier transform infrared spectroscopy. III. Secondary structures.* Subcell Biochem, 1994. **23**: p. 405-50.
120. Barth A and Zscherp C, *What vibrations tell us about proteins.* Q Rev Biophys, 2002. **35**(4): p. 369-430.
121. Uversky VN; Li J and Fink AL, *Evidence for a partially folded intermediate in alpha-synuclein fibril formation.* J Biol Chem, 2001. **276**(14): p. 10737-44.
122. Thompson NL, *Fluorescence correlation spectroscopy.* 1991, Lakowicz, J. R.: Topics in Fluorescence Microscopy. p. 337-378.
123. White SH; Wimley WC; Ladokhin AS and Hristova K, *Protein folding in membranes: determining energetics of peptide-bilayer interactions.* Methods Enzymol, 1998. **295**: p. 62-87.
124. Dickey A and Faller R, *Examining the contributions of lipid shape and headgroup charge on bilayer behavior.* Biophys J, 2008. **95**(6): p. 2636-46.
125. Fernandez-Escamilla AM; Rousseau F; Schymkowitz J and Serrano L, *Prediction of sequence-dependent and mutational effects on the aggregation of peptides and proteins.* Nat Biotechnol, 2004. **22**(10): p. 1302-6.
126. Maurer-Stroh S; Debulpaep M; Kuemmerer N; Lopez de la Paz M; Martins IC; Reumers J; Morris KL; Copland A; Serpell L; Serrano L; Schymkowitz JW and Rousseau F, *Exploring the sequence determinants of amyloid structure using position-specific scoring matrices.* Nat Methods, 2010. **7**(3): p. 237-42.
127. Tartaglia GG and Vendruscolo M, *The Zyggregator method for predicting protein aggregation propensities.* Chem Soc Rev, 2008. **37**(7): p. 1395-401.

128. Kyte J and Doolittle RF, *A simple method for displaying the hydropathic character of a protein*. J Mol Biol, 1982. **157**(1): p. 105-32.
129. Lupas A; Van Dyke M and Stock J, *Predicting coiled coils from protein sequences*. Science, 1991. **252**(5009): p. 1162-4.
130. Bains G; Patel AB and Narayanaswami V, *Pyrene: a probe to study protein conformation and conformational changes*. Molecules, 2011. **16**(9): p. 7909-35.
131. Valeur B, *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*. 2001, Wiley-VCH: Weinheim, Germany. p. 200-225.
132. Eftink MR, *The use of fluorescence methods to monitor unfolding transitions in proteins*. Biophys J, 1994. **66**(2 Pt 1): p. 482-501.
133. Kim HY; Cho MK; Kumar A; Maier E; Siebenhaar C; Becker S; Fernandez CO; Lashuel HA; Benz R; Lange A and Zweckstetter M, *Structural properties of pore-forming oligomers of alpha-synuclein*. J Am Chem Soc, 2009. **131**(47): p. 17482-9.
134. Krishnan R and Lindquist SL, *Structural insights into a yeast prion illuminate nucleation and strain diversity*. Nature, 2005. **435**(7043): p. 765-72.
135. Campioni S; Mannini B; Zampagni M; Pensalfini A; Parrini C; Evangelisti E; Relini A; Stefani M; Dobson CM; Cecchi C and Chiti F, *A causative link between the structure of aberrant protein oligomers and their toxicity*. Nat Chem Biol, 2010. **6**(2): p. 140-7.
136. Lamberto GR; Binolfi A; Orcellet ML; Bertoncini CW; Zweckstetter M; Griesinger C and Fernández CO, *Structural and mechanistic basis behind the inhibitory interaction of PcTS on alpha-synuclein amyloid fibril formation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(50): p. 21057-62.
137. Conway KA; Harper JD and Lansbury PT, *Accelerated in vitro fibril formation by a mutant alpha-synuclein linked to early-onset Parkinson disease*. Nat Med, 1998. **4**(11): p. 1318-20.
138. Conway KA; Lee SJ; Rochet JC; Ding TT; Williamson RE and Lansbury 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*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(2): p. 571-6.
139. Rao JN; Dua V and Ulmer TS, *Characterization of alpha-synuclein interactions with selected aggregation-inhibiting small molecules*. Biochemistry, 2008. **47**(16): p. 4651-6.
140. Dedmon MM; Lindorff-Larsen K; Christodoulou J; Vendruscolo M and Dobson CM, *Mapping long-range interactions in alpha-synuclein using spin-label NMR and ensemble molecular dynamics simulations*. J Am Chem Soc, 2005. **127**(2): p. 476-7.
141. Lee JC; Gray HB and Winkler JR, *Tertiary contact formation in alpha-synuclein probed by electron transfer*. J Am Chem Soc, 2005. **127**(47): p. 16388-9.
142. Wu KP and Baum J, *Detection of transient interchain interactions in the intrinsically disordered protein alpha-synuclein by NMR paramagnetic relaxation enhancement*. J Am Chem Soc, 2010. **132**(16): p. 5546-7.
143. Kaylor J; Bodner N; Edridge S; Yamin G; Hong DP and Fink AL, *Characterization of oligomeric intermediates in alpha-synuclein fibrillation: FRET studies of Y125W/Y133F/Y136F alpha-synuclein*. J Mol Biol, 2005. **353**(2): p. 357-72.
144. Yushchenko DA; Fauerbach JA; Thirunavukkuarasu S; Jares-Erijman EA and Jovin TM, *Fluorescent ratiometric MFC probe sensitive to early stages of alpha-synuclein aggregation*. J Am Chem Soc, 2010. **132**(23): p. 7860-1.

145. Yap TL; Pfefferkorn CM and Lee JC, *Residue-specific fluorescent probes of α -synuclein: detection of early events at the N- and C-termini during fibril assembly*. *Biochemistry*, 2011. **50**(12): p. 1963-5.
146. Johnson M; Coulton AT; Geeves MA and Mulvihill DP, *Targeted amino-terminal acetylation of recombinant proteins in E. coli*. *PLoS One*, 2010. **5**(12): p. e15801.
147. Maltsev AS; Ying J and Bax A, *Impact of N-terminal acetylation of α -synuclein on its random coil and lipid binding properties*. *Biochemistry*, 2012. **51**(25): p. 5004-13.
148. Kang L; Moriarty GM; Woods LA; Ashcroft AE; Radford SE and Baum J, *N-terminal acetylation of α -synuclein induces increased transient helical propensity and decreased aggregation rates in the intrinsically disordered monomer*. *Protein Sci*, 2012. **21**(7): p. 911-7.
149. Lazarev YA; Grishkovsky BA and Khromova TB, *Amide I band of IR spectrum and structure of collagen and related polypeptides*. *Biopolymers*, 1985. **24**(8): p. 1449-78.
150. Viguera AR; Arrondo JL; Musacchio A; Saraste M and Serrano L, *Characterization of the interaction of natural proline-rich peptides with five different SH3 domains*. *Biochemistry*, 1994. **33**(36): p. 10925-33.
151. Syme CD; Blanch EW; Holt C; Jakes R; Goedert M; Hecht L and Barron LD, *A Raman optical activity study of rheomorphism in caseins, synucleins and tau. New insight into the structure and behaviour of natively unfolded proteins*. *Eur J Biochem*, 2002. **269**(1): p. 148-56.
152. Anderson VL; Webb WW and Eliezer D, *Interplay between desolvation and secondary structure in mediating cosolvent and temperature induced alpha-synuclein aggregation*. *Phys Biol*, 2012. **9**(5): p. 056005.
153. Sarroukh R; Goormaghtigh E; Ruysschaert JM and Raussens V, *ATR-FTIR: a "rejuvenated" tool to investigate amyloid proteins*. *Biochim Biophys Acta*, 2013. **1828**(10): p. 2328-38.
154. Ghosh D; Singh PK; Sahay S; Jha NN; Jacob RS; Sen S; Kumar A; Riek R and Maji SK, *Structure based aggregation studies reveal the presence of helix-rich intermediate during α -Synuclein aggregation*. *Sci Rep*, 2015. **5**: p. 9228.
155. Varshavsky A, *The N-end rule pathway and regulation by proteolysis*. *Protein Sci*, 2011. **20**(8): p. 1298-345.
156. Zabrocki P; Bastiaens I; Delay C; Bammens T; Ghillebert R; Pellens K; De Virgilio C; Van Leuven F and Winderickx J, *Phosphorylation, lipid raft interaction and traffic of alpha-synuclein in a yeast model for Parkinson*. *Biochim Biophys Acta*, 2008. **1783**(10): p. 1767-80.
157. Kang L; Janowska MK; Moriarty GM and Baum J, *Mechanistic insight into the relationship between N-terminal acetylation of α -synuclein and fibril formation rates by NMR and fluorescence*. *PLoS One*, 2013. **8**(9): p. e75018.
158. Cerf E; Sarroukh R; Tamamizu-Kato S; Breydo L; Derclaye S; Dufrêne YF; Narayanaswami V; Goormaghtigh E; Ruysschaert JM and Raussens V, *Antiparallel beta-sheet: a signature structure of the oligomeric amyloid beta-peptide*. *Biochem J*, 2009. **421**(3): p. 415-23.
159. Sarroukh R; Cerf E; Derclaye S; Dufrêne YF; Goormaghtigh E; Ruysschaert JM and Raussens V, *Transformation of amyloid β (1-40) oligomers into fibrils is characterized by a major change in secondary structure*. *Cell Mol Life Sci*, 2011. **68**(8): p. 1429-38.
160. Natalello A; Prokorov VV; Tagliavini F; Morbin M; Forloni G; Beeg M; Manzoni C; Colombo L; Gobbi M; Salmona M and Doglia SM, *Conformational plasticity of the Gerstmann-Sträussler-Scheinker disease peptide as indicated by its multiple aggregation pathways*. *J Mol Biol*, 2008. **381**(5): p. 1349-61.

161. Fabian H; Gast K; Laue M; Misselwitz R; Uchanska-Ziegler B; Ziegler A and Naumann D, *Early stages of misfolding and association of beta2-microglobulin: insights from infrared spectroscopy and dynamic light scattering*. *Biochemistry*, 2008. **47**(26): p. 6895-906.
162. Zou Y; Li Y; Hao W; Hu X and Ma G, *Parallel β -sheet fibril and antiparallel β -sheet oligomer: new insights into amyloid formation of hen egg white lysozyme under heat and acidic condition from FTIR spectroscopy*. *J Phys Chem B*, 2013. **117**(15): p. 4003-13.
163. Ruggeri FS; Longo G; Faggiano S; Lipiec E; Pastore A and Dietler G, *Infrared nanospectroscopy characterization of oligomeric and fibrillar aggregates during amyloid formation*. *Nat Commun*, 2015. **6**: p. 7831.
164. Apetri MM; Maiti NC; Zagorski MG; Carey PR and Anderson VE, *Secondary structure of alpha-synuclein oligomers: characterization by raman and atomic force microscopy*. *J Mol Biol*, 2006. **355**(1): p. 63-71.
165. Eugene C; Laghaei R and Mousseau N, *Early oligomerization stages for the non-amyloid component of α -synuclein amyloid*. *J Chem Phys*, 2014. **141**(13): p. 135103.
166. Abedini A and Raleigh DP, *A role for helical intermediates in amyloid formation by natively unfolded polypeptides?* *Phys Biol*, 2009. **6**(1): p. 015005.
167. Hoyer W; Grönwall C; Jonsson A; Ståhl S and Härd T, *Stabilization of a beta-hairpin in monomeric Alzheimer's amyloid-beta peptide inhibits amyloid formation*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(13): p. 5099-104.
168. Auluck PK; Caraveo G and Lindquist S, *α -Synuclein: membrane interactions and toxicity in Parkinson's disease*. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2010. **26**: p. 211-33.
169. Jameson DM; Ross JA and Albanesi JP, *Fluorescence fluctuation spectroscopy: ushering in a new age of enlightenment for cellular dynamics*. *Biophys Rev*, 2009. **1**(3): p. 105-118.
170. Schwille P, *Fluorescence correlation spectroscopy and its potential for intracellular applications*. *Cell Biochem Biophys*, 2001. **34**(3): p. 383-408.
171. Rusu L; Gambhir A; McLaughlin S and Rädler J, *Fluorescence correlation spectroscopy studies of Peptide and protein binding to phospholipid vesicles*. *Biophys J*, 2004. **87**(2): p. 1044-53.
172. Takamori S; Holt M; Stenius K; Lemke EA; Grønborg M; Riedel D; Urlaub H; Schenck S; Brügger B; Ringler P; Müller SA; Rammner B; Gräter F; Hub JS; De Groot BL; Mieskes G; Moriyama Y; Klingauf J; Grubmüller H; Heuser J; Wieland F and Jahn R, *Molecular anatomy of a trafficking organelle*. *Cell*, 2006. **127**(4): p. 831-46.
173. van Meer G; Voelker DR and Feigenson GW, *Membrane lipids: where they are and how they behave*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008. **9**(2): p. 112-24.
174. Zustiak S; Riley J; Boukari H; Gandjbakhche A and Nossal R, *Effects of multiple scattering on fluorescence correlation spectroscopy measurements of particles moving within optically dense media*. *J Biomed Opt*, 2012. **17**(12): p. 125004.
175. Kamp F and Beyer K, *Binding of alpha-synuclein affects the lipid packing in bilayers of small vesicles*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(14): p. 9251-9.
176. Nuscher B; Kamp F; Mehnert T; Odoy S; Haass C; Kahle PJ and Beyer K, *Alpha-synuclein has a high affinity for packing defects in a bilayer membrane: a thermodynamics study*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(21): p. 21966-75.
177. Jo E; McLaurin J; Yip CM; St George-Hyslop P and Fraser PE, *alpha-Synuclein membrane interactions and lipid specificity*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(44): p. 34328-34.

178. Kjaer L; Giehm L; Heimbürg T and Otzen D, *The influence of vesicle size and composition on alpha-synuclein structure and stability*. Biophys J, 2009. **96**(7): p. 2857-70.
179. Chong SS; Taneva SG; Lee JM and Cornell RB, *The curvature sensitivity of a membrane-binding amphipathic helix can be modulated by the charge on a flanking region*. Biochemistry, 2014. **53**(3): p. 450-61.
180. Reynolds NP; Soragni A; Rabe M; Verdes D; Liverani E; Handschin S; Riek R and Seeger S, *Mechanism of membrane interaction and disruption by alpha-synuclein*. J Am Chem Soc, 2011. **133**(48): p. 19366-75.
181. Hellstrand E; Nowacka A; Topgaard D; Linse S and Sparr E, *Membrane lipid co-aggregation with alpha-synuclein fibrils*. PLoS One, 2013. **8**(10): p. e77235.
182. Chaudhary H; Stefanovic AN; Subramaniam V and Claessens MM, *Membrane interactions and fibrillization of alpha-synuclein play an essential role in membrane disruption*. FEBS Lett, 2014. **588**(23): p. 4457-63.
183. Calne DB and Mizuno Y, *The neuromythology of Parkinson's Disease*. Parkinsonism Relat Disord, 2004. **10**(5): p. 319-22.
184. Iyer A; Roeters SJ; Schilderink N; Hommersom B; Heeren RM; Woutersen S; Claessens MM and Subramaniam V, *The Impact of N-terminal Acetylation of alpha-Synuclein on Phospholipid Membrane Binding and Fibril Structure*. J Biol Chem, 2016. **291**(40): p. 21110-21122.
185. Zhu M; Li J and Fink AL, *The association of alpha-synuclein with membranes affects bilayer structure, stability, and fibril formation*. J Biol Chem, 2003. **278**(41): p. 40186-97.
186. Mishra VK; Palgunachari MN; Segrest JP and Anantharamaiah GM, *Interactions of synthetic peptide analogs of the class A amphipathic helix with lipids. Evidence for the snorkel hypothesis*. J Biol Chem, 1994. **269**(10): p. 7185-91.
187. Narayanan V and Scarlata S, *Membrane binding and self-association of alpha-synucleins*. Biochemistry, 2001. **40**(33): p. 9927-34.
188. Stöckl M; Fischer P; Wanker E and Herrmann A, *Alpha-synuclein selectively binds to anionic phospholipids embedded in liquid-disordered domains*. J Mol Biol, 2008. **375**(5): p. 1394-404.
189. Galvagnion C; Brown JW; Ouberai MM; Flagmeier P; Vendruscolo M; Buell AK; Sparr E and Dobson CM, *Chemical properties of lipids strongly affect the kinetics of the membrane-induced aggregation of alpha-synuclein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016. **113**(26): p. 7065-70.
190. Kahle PJ; Neumann M; Ozmen L; Müller V; Jacobsen H; Schindzielorz A; Okochi M; Leimer U; van Der Putten H; Probst A; Kremmer E; Kretschmar HA and Haass C, *Subcellular localization of wild-type and Parkinson's disease-associated mutant alpha-synuclein in human and transgenic mouse brain*. J Neurosci, 2000. **20**(17): p. 6365-73.
191. Fortin DL; Troyer MD; Nakamura K; Kubo S; Anthony MD and Edwards RH, *Lipid rafts mediate the synaptic localization of alpha-synuclein*. J Neurosci, 2004. **24**(30): p. 6715-23.
192. Giannakis E; Pacifico J; Smith DP; Hung LW; Masters CL; Cappai R; Wade JD and Barnham KJ, *Dimeric structures of alpha-synuclein bind preferentially to lipid membranes*. Biochim Biophys Acta, 2008. **1778**(4): p. 1112-9.
193. Quist A; Doudevski I; Lin H; Azimova R; Ng D; Frangione B; Kagan B; Ghiso J and Lal R, *Amyloid ion channels: a common structural link for protein-misfolding disease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(30): p. 10427-32.

Comunicación de la ciencia

Comunicación de la ciencia

Entendiendo la importancia de la comunicación científica como una de las herramientas indiscutibles para alcanzar la democratización de la ciencia. Aquí se exhibe una infografía de carácter divulgativo con algunos de los resultados más relevantes de este trabajo de tesis.

Nuestro **Cerebro** es un órgano muy complejo que se encarga del control de todo el cuerpo!

En su interior hay una proteína llamada **alfa-sinucleína**

El trabajo de esta proteína es colaborar en el sistema encargado de los impulsos nerviosos para que podamos movernos

Cada neurona se conecta con la otra a través de la liberación de una sustancia llamada **Dopamina** que se encuentra almacenada en bolsitas de grasas

Los impulsos se transmiten por circuitos hechos de células llamadas **neuronas**

alfa-sinucleína se une a estas bolsitas para regular la liberación de dopamina

Cuando envejecemos aumentan las probabilidades de tener la enfermedad de Parkinson en la que se alteran principalmente los movimientos del cuerpo

Si bien se desconocen los motivos de por qué sucede, se sabe que **alfa-sinucleína** está involucrada!

Los oligómeros hacen que la proteína no pueda unirse más a las bolsitas!

En neuronas enfermas **alfa-sinucleína** se junta formando primero pelotitas llamadas **oligómeros** que luego se transforman en **fibras alargadas**...

En los oligómeros, **alfa-sinucleína** se ordena de manera especial! Algunas partes de la proteína se acomodan en formas planas llamadas **hojas-beta**, y cada una de esas partes están en una dirección opuesta (**antiparalela**) a la de al lado...

En las fibras las **hojas-beta** son **paralelas**, es decir que todas las partecitas se orientan en la misma dirección

Estos agrupamientos son **tóxicos** para las neuronas y probablemente los **causantes de Parkinson!**

Luego las estructuras planas se **desarman** un poco para poder **reacomodarse** y formar las **fibras**

Curriculum Vitae

Curriculum Vitae

DATOS PERSONALES

Fecha y lugar de nacimiento: 26/12/1985, Córdoba- Argentina. **Estado civil:** Soltero. **DNI:** 32059055.

Domicilio: Santa Rosa, 1368- Depto. 11, Córdoba- Argentina. **Teléfono:** +54-9-351-7735989.

E-mail: jigallea@fcq.unc.edu.ar

POSICIÓN ACTUAL

- Becario doctoral del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Abril 2013-presente. RD N°: 4361/12.
- Profesor ayudante A (DS), interino. RD N°: 129/17. Dto. Química Biológica (DQB)-CIQUIBIC, Facultad de Ciencias Químicas (FCQ), Universidad Nacional de Córdoba (UNC). Categoría V del Programa de Incentivos a docentes investigadores. Secretaría de Políticas Universitarias. Ministerio de Educación y Deportes. RD N°: 1562/17

FORMACIÓN ACADÉMICA

- Alumno de la Carrera de Doctorado en Ciencias Químicas, DQB, FCQ, UNC. Inicio: 12/11/2012. RD N°: 1013/12
- Biólogo, Università degli Studi di Milano, Milán- Italia. Egreso: 05/2010.

PUBLICACIONES

- *Amyloid oligomerization of the Parkinson's disease related protein α -synuclein impacts on its curvature-membrane sensitivity.* **Gallea JI**, Ambroggio EE, Vilcaes AA, James NG, Jameson DM, Celej MS. Enviado.
- *Alpha-synuclein fibrils recruit TBK1 and OPTN to lysosomal damage sites and induce autophagy in microglial cells.* Bussi C, Peralta Ramos JM, Arroyo DS, **Gallea JI**, Ronchi P, Kolovou A, Wang JM, Florey O, Celej MS, Schwab Y, Ktistakis NT, Iribarren P. Enviado.
- *Autophagy down regulates pro-inflammatory mediators in BV2 microglial cells and rescues both LPS and α -synuclein induced neuronal cell death.* Bussi C, Peralta Ramos JM, Gaviglio EA, Arroyo DS, **Gallea JI**, Wang JM, Celej MS, Iribarren P. **Scientific Reports.** (2017) 7:43153.
- *Structural remodeling during amyloidogenesis of physiological N α -acetylated α -synuclein.* **Gallea JI**, Sarroukh R, Yunes-Quartino P, Ruyschaert JM, Raussens V, Celej MS. **Biochim. Biophys. Acta.** (2016) 1864:501–510.
- *Amyloid fibrils are the molecular trigger of inflammation in Parkinson's disease.* Gustot A, **Gallea JI**, Sarroukh R, Celej MS, Ruyschaert JM, Raussens V. **Biochem J.** (2015) 471(3):323-33.

- *Structural insights into amyloid oligomers of the Parkinson disease related protein α -synuclein.* Gallea JI and Celej MS. **J Biol Chem.** (2014) 289:26733-26742.
- *Neuronal inclusions of α -synuclein contribute to the pathogenesis of Krabbe disease.* Smith BR, Santos MB, Marshall MS, Cantuti-Castelvetri L, Lopez-Rosas A, Li G, van Breemen R, Claycomb KI, Gallea JI, Celej MS, Crocker S, Givogri MI, Bongarzone ER. **J Pathol.** (2014) 232: 509-21.

BECAS

Postgrado

- Beca doctoral del CONICET. Iniciada el 01/04/2013, duración: 5 años. RD N°: 4361/12
- Beca doctoral de la Secretaría de Ciencia y Tecnología, UNC (SECyT-UNC), año 2012. Renunciada por beca de mayor jerarquía.

Asistencia a Reuniones Científicas Internacionales

- Beca de viaje. International Brain Research Organization (IBRO). Año: 2017
- Beca de viaje. The joint meeting of the International Society of Neurochemistry (ISN) and the European Society for Neurochemistry (ESN). Paris, Francia. Año 2017
- Beca de viaje. V Latin American Protein Society Meeting (LAPSM). Rio de Janeiro – Brasil. Año 2016

ESTADIAS DE INVESTIGACION

Internacionales

- 06/2014- 07/2014. Laboratorio del Dr. Erik Goormaghtigh, Universidad Libre de Bruselas, Bruselas–Bélgica. Proyecto de cooperación bilateral Argentina- Bélgica (MINCYT-FNRS). *Comprendiendo la relación entre α -synucleina y neuroinflamación subyacente en la patobiología de la enfermedad de Parkinson.*

ANTECEDENTES EN DOCENCIA

Docencia de grado

- Función desempeñada: Jefe de trabajos prácticos en las Asignaturas Biofísico Química, Laboratorio IV y Bioquímica de Macromoléculas, DQB, FCQ, UNC.
- Profesor ayudante A (DS), interino. DQB - CIQUIBIC, FCQ, UNC. Periodo: 04/2015- 03/2018. RD N°: 193/15, 614/15, 1150/15, 408/16 y 129/17.
- Profesor asistente (DE), interino. DQB -CIQUIBIC, FCQ, UNC. Periodo: 10/2012- 12/2012. RD N°: 864/12 Periodo: 03/2013. RD N°: 117/13
- Profesor ayudante A (DE), interino. DQB -CIQUIBIC, FCQ, UNC. Periodo: 10/2011- 03/2012. RD N°: 938/114;

SIMPOSIOS

- *Structural and pathological insights into oligomeric species of the Parkinson's disease related protein α -synuclein* **Gallea JI**, Celej MS. V Latin American Protein Society Meeting (LAPSM). Rio de Janeiro – Brasil. Año 2016

PRESENTACIONES EN REUNIONES CIENTIFICAS

Internacionales

- *Autophagy down regulates pro-inflammatory mediators in microglial cells and rescues α -synuclein induced neuronal cell death.* Bussi C, Ramos JP, Arroyo DS, **Gallea JI**, Celej MS, Florey O, Schwab Y, Kostakis N, Iribarren P. Alexander von Humboldt Kolleg (AVH-Kolleg), Current Advances on Neurodegeneration: from Molecular Biology to Translational Medicine. Córdoba- Argentina. Año: 2017
- *Structural organization of amyloid oligomers of the Parkinson's disease related protein α -synuclein.* Ardanaz E, **Gallea JI**, Vazquez DS, Bertoncini CW, Santos J, Celej MS. AVH-Kolleg, Current Advances on Neurodegeneration: from Molecular Biology to Translational Medicine. Córdoba- Argentina. Año: 2017
- *Influence of the amyloid oligomerization of the Parkinson's disease-related protein alpha-synuclein on its membrane-curvature sensitivity.* **Gallea JI**, Mas C, Ambroggio EE, James NG, Jameson DM, Celej MS. AVH-Kolleg, Current Advances on Neurodegeneration: from Molecular Biology to Translational Medicine. Córdoba- Argentina. Año: 2017
- *Effect of oligomerization of the Parkinson's disease related protein α -synuclein on its curvature-membrane sensitivity.* **Gallea JI**, Mas C, Ambroggio EE, James NG, Jameson DM, Celej MS. The International Society for Neurochemistry-European Society for Neurochemistry Meeting (ISN-ESN). Paris-Francia. Año 2017
- *Effect of amyloid oligomerization on α -synuclein curvature-membrane sensitivity.* **Gallea JI**, Mas C, Ambroggio EE, James NG, Jameson DM, Celej MS. 19th IUPAB Congress & 11th EBSA Congress. Edimburgo- Escocia. Año: 2017
- *Effect of amyloid oligomerization on the α -synuclein curvature-dependent vesicle binding selectivity.* **Gallea JI**, Mas C, Ambroggio EE, James NG, Jameson DM, Celej MS. III Latin American Federation of Biophysical Societies (LAFeBS) - IX IberoAmerican Congress of Biophysics - XLV Reunión Anual SAB 2016. Tucumán- Argentina. Año 2016
- *β -sheet remodeling during amyloidogenesis of physiological N α -acetylated α -synuclein.* **Gallea JI**, Sarroukh R, Yunes-Quartino P, Ruysschaert JM, Raussens V, Celej MS. Latin American Crosstalk in Biophysics and Physiology and VIII PosLatAm course. Salto –Uruguay. Año 2015
- *Autophagy modulates pro-inflammatory mediators in BV2 microglial cells and rescues both LPS and alpha synuclein-induced neuronal cell death.* Bussi C, Peralta Ramos J, Gaviglio EA, Arroyo DS, **Gallea JI**, Celej MS, Iribarren P. British Society for Cell Biology Spring Meeting and at the First UK Autophagy Network Meeting. Coventry-Inglaterra. Año: 2015
- *Sculpting the internal architecture of α -synuclein amyloid oligomers with residue-specific fluorescence resolution.* Celej MS, **Gallea JI**. 13th Conference on Methods and applications of fluorescence -MAF13. Genova- Italia. Año: 2013

Nacionales

- *Structural organization of amyloid oligomers of the Parkinson's disease related protein α -synuclein.* Ardanaz E, **Gallea JI**, Vazquez DS, Bertoncini CW, Santos J, Celej MS. Reunión conjunta de Sociedades de Biociencias. Buenos Aires- Argentina. Año: 2017

- *Effect of amyloid oligomerization on α -synuclein curvature-membrane sensitivity.* **Gallea JI**, Mas C, Ambroggio EE, James NG, Jameson DM, Celej MS. Reunión conjunta de Sociedades de Biociencias. Buenos Aires- Argentina. Año: 2017
- *Spying into the supramolecular arrangement of α -synuclein amyloid oligomers.* **Gallea JI**, Celej MS. XLII Reunión anual de la Sociedad Argentina de Biofísica (SAB). Villa Carlos Paz- Córdoba, Año: 2013 y VI Jornadas de Postgrado, FCQ, UNC, Año: 2013.
- *Insights into the supramolecular architecture of α -synuclein amyloid oligomers.* **Gallea JI**, Celej MS. XLI Reunión anual SAB. San Javier-Tucuman, Año: 2012 y V Encuentro de Jóvenes Investigadores en Neurociencias de Córdoba: Un enfoque interdisciplinario, UNC, Año: 2013
- *Caracterización estructural de oligómeros amiloides de α -synucleina.* **Gallea JI**, Celej MS. IV Encuentro de Jóvenes Investigadores en Neurociencias de Córdoba: Un enfoque interdisciplinario. UNC. Año: 2012
- *Aspectos estructurales y funcionales de la interacción de oligómeros de α -synucleina con membranas lipídicas.* **Gallea JI**, Celej MS. V Jornadas de Postgrado, Facultad de Ciencias Químicas, UNC. Año: 2011

ORGANIZACIÓN DE REUNIONES CIENTÍFICAS

- Miembro del comité de organización de la XLII Reunión anual de la Sociedad Argentina de Biofísica (SABXLII), Villa Carlos Paz- Córdoba, 2013.

PARTICIPACIÓN EN PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN

- Integrante del proyecto SECyT-UNC: *Propiedades estructurales y termodinámicas de agregados supramoleculares de α -sinucleina y su implicancia en la enfermedad de Parkinson.* Director Dra. MS Celej. DQB- CIQUIBIC, FCQ, UNC. Periodo: 01/2016- 12/2017
- Integrante del proyecto FONCyT PICT-2013-2603: *Estudios estructurales de oligómeros de α -synucleina y su implicancia en la interacción con membranas.* Director Dra. MS Celej. DQB- CIQUIBIC, FCQ, UNC. Periodo: 01/2014- 12/2016
- Integrante del proyecto SECyT- UNC: *Efecto de la oligomerización amiloidea de α -synucleina en sus propiedades de interacción con membranas de diferente curvatura.* Director Dra. MS Celej. DQB- CIQUIBIC, FCQ, UNC. Periodo: 01/2014- 12/2015
- Integrante del proyecto: *Red para desarrollo y fomento del estudio de sistemas autoorganizados. Aplicaciones biológicas y nanotecnológicas.* Programa para el fortalecimiento de redes interuniversitarias VI. Proyecto 17-16-296. Ministerio de Educación, Secretaria de Políticas Universitarias. Periodo: 2013.
- Integrante de los proyectos de Cooperación bilateral Argentina- Bélgica: *Comprendiendo la relación entre α -synucleina y neuroinflamación subyacente en la patobiología de la enfermedad de Parkinson.* MINCyT-FNRS (BE1201). Director Dra. MS Celej. Periodo: 2013-2014.
- Integrante del proyecto SECYT-UNC categoría A: *Propiedades estructurales de oligómeros de α -synucleina y su implicancia en la estabilidad de biomembranas y degeneración axonal.* Director Dra. MS Celej. DQB-CIQUIBIC, FCQ, UNC. Periodo: 01/2012- 2013.
- Integrante del proyecto FONCyT PICT-2011-1913: *Estudio de las propiedades estructurales y dinámicas de oligómeros de α -synucleina y su implicancia en la estabilidad de biomembranas y degeneración axonal.* Director Dra. MS Celej. DQB -CIQUIBIC, FCQ, UNC. Periodo: 10/10/2012-2013.
- Integrante del proyecto: *Selección y caracterización de mutantes de Escherichia Coli con producción alterada de factores extracelulares.* Director Dr. Paolo Landini. Dipartimento di Biologia Cellulare e Molecolare. Università degli Studi di Milano- Italia. Periodo: 2009-2010.

CURSOS DE DOCTORADO

- *Universidad, Ciencia y Sociedad*. Curso de doctorado de formación general. Director: Dra. Susana Genti-Raimondi Año 2016 Córdoba- Argentina. Aprobado.
- *New trends in advanced fluorescence techniques*. Director: Dra. Susana Sánchez Donoso. Año 2016 Concepción –Chile. Aprobado.
- *VIII Curso Internacional POSLATAM- LAFéBS. Membrane lipids, transporters, channels...and all that crosstalk*. Director: R. Daniel Peluffo. Año 2015 Salto- Uruguay. Aprobado.
- *Neurobiología Celular y Molecular: Patologías Asociadas*. Curso de doctorado de formación específica. Directora: Dra. Marta E. Hallak. Año 2015 Córdoba -Argentina. Aprobado con calificación: 10 (diez)
- *VI Curso Internacional POSLATAM- LAFéBS. Biophysical approaches to study systems of biological interest*. Curso de doctorado de formación específica. Director: Dr. G. Fidelio. Año: 2013 Córdoba - Argentina. Aprobado con calificación: 10 (diez)
- *Estructura y dinámica de proteínas*. Curso de doctorado de formación específica. Director: Dr. Guillermo Montich. Año: 2013 Córdoba -Argentina. Aprobado con calificación: 8 (ocho)

FORMACIÓN COMPLEMENTARIA

- Curso de Adobe Photoshop CC orientado a la preparación de figuras científicas para publicación. Facultad de Odontología, Universidad Nacional de Córdoba. Año 2015. Aprobado.
- Biofísico-Química. Materia Vocacional. Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba. Año 2012. Aprobada con calificación: 9 (nueve)
- Química Biológica Especial. Materia Vocacional. Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba. Año 2011. Aprobada con calificación: 8 (ocho)

EXTENSIÓN UNIVERSITARIA

- Programa radial de divulgación científica “Ciencia Turuleca”. Radio Revés FM 88.7- Facultad de Ciencias de la Comunicación, UNC. Producción y conducción. Período 01/2015-12/2016.

IDIOMAS

- Español: Lengua materna.
- Inglés: Nivel Upper- Intermediate (B2), Nivel Intermediate (B1+) con diploma de estudio aprobado. EC School. Ciudad del Cabo -Sud África. Residiendo 6 meses en Sud África.
- Italiano: Nivel Avanzado (C2).
- Francés: Nivel Inicial, Facultad de Lenguas, UNC, Córdoba- Argentina.