

ANÁLISIS FUNCIONAL DE OLIGÓMEROS DE ALFA-SINUCLEÍNA EN LA PERMEABILIDAD DE MEMBRANAS

Data de aceite: 02/05/2024

Azucena González-Horta

Facultad de Ciencias Biológicas,
Laboratorio de Ciencias Genómicas,
Universidad Autónoma de Nuevo León,
Pedro de Alba s/n Cd. Universitaria San
Nicolás de los Garza, México
ORCID: 0000-0002-8222-2111

RESUMEN: La enfermedad de Parkinson es un desorden neurodegenerativo común originado por la muerte celular dentro de la *substancia nigra pars compacta*. Se caracteriza por la presencia de agregados intracelulares proteicos compuestos principalmente por la alfa-sinucleína. Aunque los mecanismos moleculares por los cuales esta proteína contribuye a la toxicidad neuronal todavía se desconocen, se ha sugerido que los intermediarios oligoméricos son citotóxicos y permeabilizan las membranas celulares posiblemente a través de complejos que forman un poro en la bicapa; sin embargo, este mecanismo es altamente controversial. Así pues, es necesario identificar el mecanismo por el cual ocurre la permeabilización de membranas para entender la interacción entre oligómeros y lípidos y poder estimar la relevancia biológica de este proceso. En

este trabajo se evaluó por espectroscopía de fluorescencia la liberación de contenidos acuosos originados por oligómeros de alfa-sinucleína desde vesículas fosfolípídicas de distinta composición mediante el método ANTS/DPX. Los resultados muestran que la disrupción de membranas solo ocurre en presencia de lípidos aniónicos y también por parámetros de empaquetamiento lipídico, lo que sugiere que la accesibilidad a la región hidrofóbica de las vesículas modula la interacción lípido-oligómero.

PALABRAS-CLAVE: alfa-sinucleína* interacción lípido-oligómero* permeabilización

FUNCTIONAL ANALYSIS OF OLIGOMERIC ALPHA-SYNUCLEIN IN MEMBRANE PERMEABILIZATION

SUMMARY: Parkinson's disease is a common neurodegenerative disorder marked by increased cell death within the substantia nigra pars compacta. It is characterized by the presence of intracellular aggregates composed primarily of the protein alpha-synuclein. How the aggregation of alpha-synuclein is related to neuronal degeneration is an important unresolved question. Oligomeric intermediates have been found to be more

toxic to cells than monomeric or fibrillar forms of the protein. A possible mechanism by which oligomers could be toxic is through the disruption and permeabilization of cellular membranes. The proposed disruption mechanism is the formation of pore-like structures within the lipid bilayer although this mechanism is still highly controversial. To identify the mechanism through which membrane permeabilization is facilitated and to estimate the biological relevance of this process, it is crucial to have a greater knowledge of the lipid-oligomer interaction. The membrane disruptive effect of Alpha-synuclein oligomers on lipid vesicles of different headgroup composition using the ANTS/DPX assay was evaluated in this work. It was shown that membrane permeabilization is mainly determined by the presence of negatively charged lipids and also by lipid packing parameters, suggesting that the accessibility to the bilayer hydrocarbon core modulates oligomer-membrane interaction.

KEYWORDS: alpha-synuclein * lipid-oligomer interaction * leakage

ANÁLISE FUNCIONAL DOS OLIGÔMEROS DE ALFA-SINUCLEÍNA NA PERMEABILIDADE DAS MEMBRANAS

RESUMO: A doença de Parkinson é uma condição neuro-degenerativa comum que se origina na morte celular dentro da substância nigra pars compacta. é caracterizada pela presença de agregados intracelulares protéicos compostos especialmente pela alfa-sinucleína. Mesmo que se desconheça os mecanismos moleculares por onde essa proteína contribui para toxicidade neuronal, existe uma possibilidade de que os intermediários oligoméricos sejam citotóxicos, e permeabilizam as membranas celulares possivelmente através de complexos que formam um poro na capa dupla, entretanto, este mecanismo gera muita controvérsia. Sendo assim, é necessário identificar o mecanismo responsável pela permeabilidade das membranas para entender a interação entre os oligômeros e os lipídios, e para ter uma estimativa da relevância biológica deste processo. Neste trabalho, analisamos através de espectroscopia de fluorescência, a liberação dos conteúdos aquoso originados por oligômeros de alfa-sinucleína a partir das vesículas fosfolídicas de composição diferente através do método ANTS/DPX. Os resultados mostraram que a ruptura de membranas ocorrerá somente diante da presença de lipídios aniônicos, e também pelos parâmetros de empacotamento lipídico, e isso sugere que a acessibilidade à região hidrofóbica das vesículas faz a modulação da interação lípidio-oligômero

PALAVRAS-CHAVE: alfa-sinucleína * interação lípidio-oligômero * permeabilização

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Parkinson es una enfermedad neurodegenerativa asociada a la edad que afecta entre 1-2% de la población de alrededor de 65 años de edad. A nivel fisiológico, la causa de la enfermedad es la severa pérdida de neuronas dopaminérgicas especialmente en la *substancia nigra pars compacta* (1). El origen de la muerte de las células dopaminérgicas se desconoce, sin embargo, estudios bioquímicos, histológicos y genéticos han implicado a una proteína neuronal, la alfa-sinucleína, en la patogénesis de esta enfermedad ya que es el componente principal de los agregados intracelulares proteicos

conocidos como cuerpos y neuritas de Lewy característicos en los pacientes con Parkinson (2)(3). Además, descubrimientos genéticos relacionan el padecimiento temprano de esta enfermedad con la triplicación del gen que codifica para la alfa-sinucleína y a 3 mutaciones puntuales del mismo gen (A30P, E46K, A53T) (4). Por eso se ha sugerido que el desarrollo de la enfermedad de Parkinson está asociado con la formación de especies mal plegadas de alfa-sinucleína que disparan la formación de fibras amiloides y originan finalmente, depósitos fibrilares que interfieren severamente con el buen funcionamiento de estructuras membranosas y procesos celulares 5. Ya sea de origen esporádico o genético, la enfermedad de Parkinson no solo se asocia con la presencia de alfa-sinucleína sino que también está implicado su estado conformacional. Mientras que la proteína soluble se caracteriza por tener una estructura desplegada *in vitro* (6) es la forma agregada (fibras amiloides) la que se encuentra en los cuerpos y neuritas de Lewy (4)(7). Las especies protofibrilares (oligoméricas) se han implicado como los agentes patogénicos, dado que las especies mutantes presentes en el Parkinson familiar originan mayores tasas de oligomerización sin que se incremente la formación de fibras amiloides (8). Son estas características las que categorizan a la enfermedad de Parkinson como una enfermedad de mal plegamiento proteico. A pesar de la falta de estructura secundaria, la proteína de 140 aminoácidos y 14.5 kDa de masa molecular, puede dividirse en tres diferentes regiones con distintas propiedades y funciones (9)(10).

- I. el segmento N-terminal anfipático (comprende los residuos 1-70) que contiene 7 dominios de repeticiones imperfectas de 11 residuos (XKTKEGVXXXX) y que es muy similar al dominio α -helicoidal de unión a membrana de las apolipoproteínas,
- II. la región central hidrofóbica (residuos 71-82) también conocida como NAC (de las siglas en inglés *non-Abeta component of Alzheimer amyloid*) y que se cree es la región responsable de la agregación proteica y de la formación de fibras amiloides y finalmente,
- III. la región C terminal (residuos 83-140) que tiene un fuerte carácter ácido debido a sus 15 carboxilos, lo que impide la asociación de este segmento de la proteína con lípidos.

Aproximadamente los primeros 100 aminoácidos de la proteína forman hélices anfipáticas al unirse con membranas, esta habilidad parece estar relacionada con su función fisiológica. Debido a su alta concentración en las terminales presinápticas y a su asociación con las vesículas sinápticas, se ha sugerido que la alfa-sinucleína está implicada tanto en el reciclaje de dichas vesículas como en la regulación de las transmisiones sinápticas (11)(12). Aunque la pérdida de función debido a la agregación puede desempeñar un papel en la toxicidad de esta proteína, son las formas oligoméricas y prefibrilares las que se consideran las especies tóxicas con respecto a la muerte neuronal y a la progresión de la enfermedad de Parkinson. Sin embargo, todavía se desconoce el proceso mediante el cual los oligómeros originan la muerte celular. Uno de los mecanismos más aceptados para explicar la neurotoxicidad de la alfa-sinucleína es la permeabilización de las membranas

celulares que originan los oligómeros proteicos (13)(14). Sin embargo, todavía no está claro por cuál mecanismo pierde integridad la membrana. Por un lado, los oligómeros de alfa-sinucleína pueden integrarse en la membrana y formar poros a través de los cuales se pueden permear moléculas pequeñas (13) (15) y por otro, es concebible que las interacciones entre los oligómeros proteicos y la bicapa fosfolipídica desestabilicen el empaquetamiento lipídico y que por tanto se pierda la integridad (16). Con el fin de tener un mayor entendimiento del proceso de interacción entre la alfa-sinucleína y modelos de membrana y poder identificar el mecanismo por el cual ocurre la permeabilización, en el presente trabajo se analizó el efecto de los oligómeros de alfa-sinucleína sobre la permeabilización de membranas fosfolipídicas de distinta composición mediante espectroscopía de fluorescencia.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES

Los lípidos empleados para la preparación de vesículas fosfolipídicas fueron: 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3[fosfo-rac-(1-glicerol)] (POPG), 1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3[fosfo-rac-(1-glicerol)] (DOPG), 2-oleoil-1-palmitoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (POPC) y colesterol (Chol) obtenidos de Avanti Polar Lipids, Inc. La alfa-sinucleína humana se obtuvo de Sigma-Aldrich. Para los ensayos de liberación de contenidos de vesículas lipídicas se utilizaron las sondas fluorescentes de ácido 8-aminonaf-talen-1,2,6-trisulfónico (ANTS) y bromuro de *p*-xilen-bis-piridino (DPX) que fueron proporcionados por Sigma-Aldrich. Los solventes orgánicos cloroformo y metanol fueron de calidad HPLC y se obtuvieron de J.T. Baker. Los geles cromatográficos Superdex 200 y Sephadex G-75 procedieron de Sigma-Aldrich. El resto de los reactivos que se emplearon fueron de calidad analítica y procedieron de J. T. Baker.

PREPARACIÓN DE OLIGÓMEROS DE ALFA-SINUCLEÍNA

Para inducir la formación de las protofibras, se incubó la alfa-sinucleína humana (Sigma-Aldrich) en agua MilliQ a una concentración de 350 μ M en un *termomixer* Eppendorf por 18 horas a temperatura ambiente a 1250 rpm seguido de 2 horas a 37 °C sin agitación para posteriormente filtrarlo a través de un filtro de 0,2 μ m (Corning) con el fin de remover los agregados fibrilares. La separación de la forma oligomérica y monomérica de la proteína se llevó a cabo mediante una cromatografía de exclusión molecular en una columna Superdex 200 (GE), usando 10 mM Hepes pH 7,4, 150 mM NaCl como eluyente. Las fracciones correspondientes a los oligómeros se identificaron mediante espectro de absorción UV, para después juntarlas y concentrarlas usando un concentrador Vivaspin (Startorius) con un corte de separación de 10 kDa de peso molecular. La concentración de proteínas se determinó por Bradford.

PREPARACIÓN DE VESÍCULAS UNILAMELARES GRANDES

La obtención de vesículas multilamelares se llevó a cabo por el método de evaporación-hidratación. Para ello, se mezclaron en un tubo de ensayo las cantidades adecuadas de lípido a partir de soluciones madre en cloroformo/metanol (2:1 v/v). Posteriormente, las muestras se secaron primero bajo flujo de nitrógeno y después en vacío durante al menos 3 horas con el fin de eliminar las trazas de disolvente orgánico. La película seca de lípido formada se rehidrató posteriormente en tampón HEPES 50 mM pH 7,0, NaCl 30 mM incubando las muestras durante 2 h a 25 °C, temperatura superior a la de transición de fase de los lípidos empleados, y se agitó vigorosamente a intervalos de 10 min. Para preparar vesículas unilamelares de tamaño definido, las suspensiones obtenidas por el método de evaporación-hidratación se pasaron 10 veces a través de un mini-extrusor de alta presión (*Avanti Polar Lipids*, Alabaster, AL, EE.UU.) equipado con una membrana de policarbonato con tamaño de poro de 100 nm y termostaticado a la misma temperatura a la que se hidrataron los lípidos, obteniendo de esta forma una suspensión homogénea de vesículas unilamelares grandes (LUV's) de unos 100 nm de tamaño medio.

PREPARACIÓN DE LIPOSOMAS ENCAPSULANDO ANTS/DPX

Las diferentes composiciones lipídicas se prepararon mezclando la cantidad apropiada de lípido en cloroformo/metanol (2:1 v/v). Para preparar las vesículas unilamelares grandes que encapsulen el fluoróforo y el quenchedor, se secaron 3 mg de lípido bajo flujo suave de N₂ y después en vacío durante al menos 2 h. La película seca de lípido se rehidrató con 1 mL de *buffer* Hepes 50 mM pH 7, NaCl 30 mM que contenía ANTS (8-aminonaftaleno-ácido-1,3,6-trisulfónico) 12,5 mM y DPX (N,N'-p-xileno-bis-piridino de bromuro) 45 mM y se incubó durante por 2 h a 25 °C con agitación a intervalos de 10 min. Las LUV's se prepararon por extrusión como se indicó anteriormente encapsulando la sonda y el quenchedor. Para remover la sonda que no fue encapsulada, se utilizó una cromatografía de exclusión molecular Sephadex G-75 usando Hepes 10 mM pH 7,0 NaCl 150 mM como eluyente. El proceso cromatográfico se siguió monitorizando la absorbancia de las fracciones a 249 nm y 353 nm, longitudes de onda de los máximos de absorción del quenchedor y del fluoróforo, DPX y ANTS, respectivamente. Las fracciones correspondientes a las vesículas que contenían sonda y desactivador coencapsulados se reunieron y se determinó la concentración de fosfolípido mediante cuantificación de fósforo.

CUANTIFICACIÓN DE LÍPIDOS

La cantidad de fosfolípido en las muestras lipídicas se determinó mediante la valoración de fósforo según el método descrito por Rouser *et al.* (17), para lo cual se secaron las muestras a analizar para posteriormente añadir ácido perclórico al 70% (0,45 mL) e incubarlas en baño de arena a 260 °C durante 30 min con el fin de conseguir la mineralización del fósforo. Transcurrido este tiempo, se dejaron enfriar los tubos y se añadieron 0,5 mL de molibdato amónico (2,5% p/v), 0,5 mL de ácido ascórbico (10% p/v) y 3,5 mL de agua bidestilada por muestra, incubándose éstas durante 7 min en baño de agua hirviendo. La reacción cromogénica se detuvo colocando los tubos en hielo para posteriormente medir la absorbancia del producto coloreado que se forma en presencia de fósforo a 820 nm en un espectrofotómetro marca Phenix modelo UV1800PC. Para conocer la cantidad de fosfolípido en cada muestra, la absorbancia obtenida se interpoló en una recta patrón realizada a partir de una solución estándar de concentración conocida de fosfato inorgánico (KH₂PO₄ 0,05 mg/mL).

LIBERACIÓN DE CONTENIDOS ACUOSOS (LEAKAGE)

La capacidad de los oligómeros de alfa-sinucleína para provocar la pérdida de contenidos acuosos de vesículas lipídicas se analizó mediante el método ANTS/DPX descrito por Ellens *et al.* (18). El ensayo de *leakage* se realizó colocando 1,2 mL de la suspensión de vesículas que contenían ANTS/DPX a una concentración final de fosfolípido 20 mM en la cubeta del espectrofluorímetro (LS45 Perkin Elmer). La composición de las vesículas que se emplearon fueron: POPG, DOPG, POPC:DOPG (1:1 relación molar) y POPC:POPG (1:1). La liberación del ANTS de las vesículas se siguió monitorizando la emisión de fluorescencia del ANTS a 536 nm, a una longitud de onda de excitación de 353 nm. Todas las mediciones se llevaron a cabo a 25 °C y se realizaron por duplicado. El experimento finalizó con la adición de una alícuota de Triton X-100 (0,5% concentración final) que proporcionó la fluorescencia correspondiente al 100% de liberación como referencia. El porcentaje de *leakage* se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Leakage} = [F(1) - F(0)] / [F(100) - F(0)] \times 100$$

donde F(0) es la medida inicial de fluorescencia, F(1) es la emisión de fluorescencia máxima obtenida después de inyectar los oligómeros de alfa-sinucleína y F(100) es la fluorescencia obtenida en presencia de 0,5% de Triton X-100.

RESULTADOS

OBTENCIÓN Y PURIFICACIÓN DE OLIGÓMEROS DE ALFA-SINUCLÉINA

Uno de los retos en la evaluación de la interacción de los oligómeros de alfa-sinucleína y fosfolípidos es precisamente la producción de las especies oligoméricas, ya que su purificación generalmente no resulta en la obtención de una sola población homogénea sino que se producen varios agregados proteicos de diferente tamaño y con un bajo rendimiento. En la Figura 1 se muestra el cromatograma correspondiente a la purificación de oligómeros obtenidos para la realización de este trabajo. La alfa-sinucleína eluye en 3 picos correspondientes a las especies oligomérica (fracciones 20 a 23), dimérica (fracciones 40 a 44) y monomérica (fracciones 47 a 59). Se ha reportado que la formación *in vitro* de oligómeros de alfa-sinucleína mediante este procedimiento nunca excede el 5% del total de la proteína en solución ni siquiera incrementando el tiempo de incubación, debido a que una vez alcanzada la concentración crítica, las protofibrillas comienzan a desaparecer dando lugar a la formación de fibras amiloides (19). Una vez identificado el pico correspondiente a los oligómeros proteicos, estas fracciones se colectaron para posteriormente calcular su concentración mediante la medida de absorbancia a 275 nm. Los valores obtenidos oscilaron entre 12-15 mM, rendimiento que concuerda con lo reportado en la literatura.

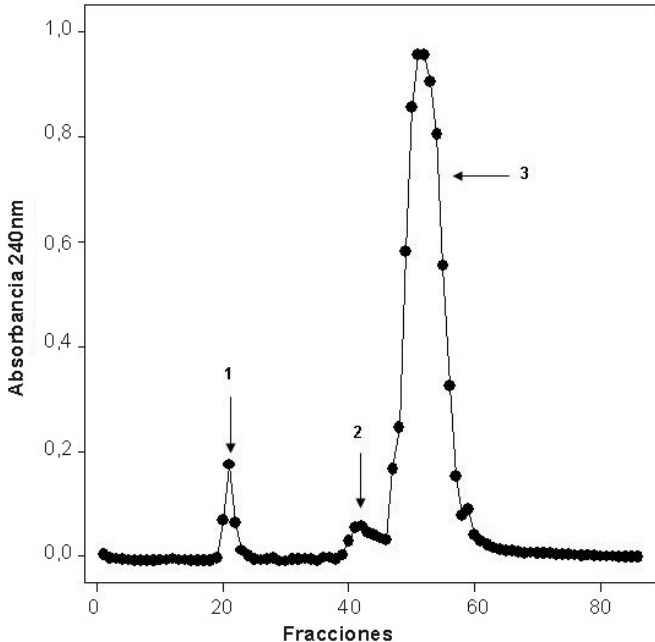


Figura 1. Cromatografía de exclusión molecular para la purificación de oligómeros de alfa-sinucleína. La cromatografía se realizó en una columna Superdex 200, el cromatograma muestra la separación entre la forma oligomérica (1), dimérica (2) y monomérica (3) de la proteína a partir de una solución stock (300 mM) en buffer Hepes 10 mM pH 7,4 que contenía NaCl 150 mM.

ENCAPSULACIÓN DE SONDAS FLUORESCENTES EN LIPOSOMAS DE DISTINTAS ESPECIES FOSFOLIPÍDICAS

Para evaluar la interacción de los oligómeros de alfa-sinucleína sobre la permeabilización de vesículas, se prepararon liposomas de distintas especies fosfolipídicas que contenían ANTS como fluoróforo y DPX como quenchedor. La Figura 2 muestra un ejemplo representativo de la purificación de estos liposomas y como puede observarse, las sondas encapsuladas en vesículas fosfolipídicas se separan fácilmente de las sondas libres gracias a la gran diferencia de tamaño existente entre esas especies moleculares. Una vez identificado el pico correspondiente a los liposomas marcados, se colectaron esas fracciones y se realizó su cuantificación mediante el método de Rouser *et al.* descrito en la metodología. Los fosfolípidos empleados para la preparación de cada una de las vesículas utilizadas en este trabajo (POPC, POPG, DOPG y colesterol) permiten tener un sistema modelo bien definido de las vesículas sinápticas posibilitando identificar las especies lipídicas y las propiedades de membrana que influyen en la unión entre los oligómeros de alfa-sinucleína y los lípidos. Se ha reportado que las membranas de las vesículas sinápticas contienen 40,9% de colesterol, 24,6% de fosfatidilcolina (PC), 12% fosfatidiletanolamina (PE), 11,5% de esfingomielina (SM), 7,3% de fosfatidilserina (PS) y 3,7% de fosfatidilinositol (PI) [20-22]. Las colas de acilo de ácido palmítico y oleico se eligieron para simular la asimetría y monoinsaturación de los lípidos fisiológicos mientras que la cabeza zwitteriónica de PC es la más común encontrada *in vivo*.

EFFECTO DE LOS OLIGÓMEROS DE ALFA-SINUCLEÍNA EN LA LIBERACIÓN DE CONTENIDOS ACUOSOS DE VESÍCULAS FOSFOLIPÍDICAS

Se ha reportado que la permeabilización de membranas por oligómeros de alfa-sinucleína depende de la composición de la cabeza lipídica; sin embargo, los datos son contradictorios. Algunos grupos de investigación reportan una fuerte unión de la proteína con vesículas unilamelares grandes formadas por fosfolípidos aniónicos y zwitteriónicos (23)(24) así como a dominios lipídicos tipo *rafts* (25)(26) mientras que otros grupos reportan que la proteína no se une a fosfolípidos neutros y sí a vesículas unilamelares pequeñas (SUVs) compuestas por fosfolípidos aniónicos. Por lo que, para evaluar esta especificidad se prepararon vesículas unilamelares grandes (LUVs) con diferente composición lipídica empleando tanto lípidos aniónicos (POPG y DOPG) como zwitteriónicos (POPC). La incubación de LUVs preparadas de POPC con oligómeros de alfa-sinucleína no produjo liberación de los contenidos de estos liposomas lo cual era de esperarse dado que la proteína, debido a su carácter catiónico a pH 7, sólo se une débilmente a estas vesículas (Fig. 3).

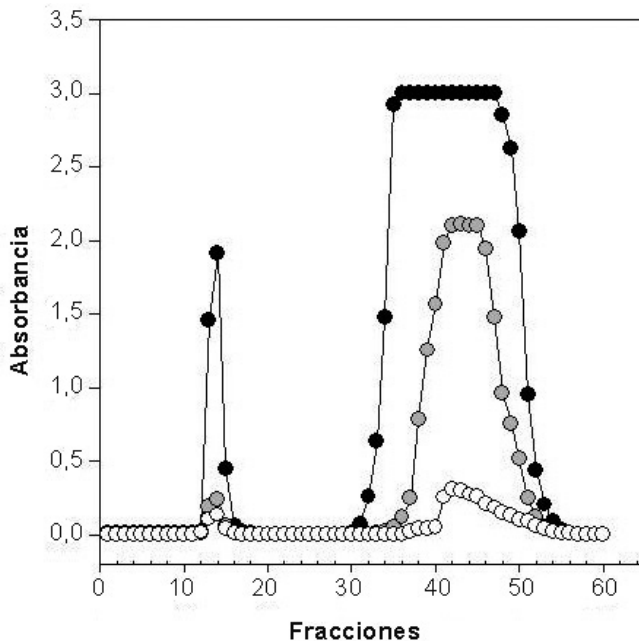


Figura 2. Cromatografía de exclusión molecular de la purificación de liposomas de POPG encapsulando una solución ANTS 12,5 mM, DPX 45 mM. Las vesículas se prepararon por extrusión utilizando membranas de policarbonato con un tamaño de poro de 100 nm. El proceso de elución fue monitoreado a 259 nm para el ANTS (negro) 353 nm para el DPX (gris) y 400 nm para las vesículas (blanco). El primer pico corresponde a las sondas encapsuladas y el segundo a la sonda libre.

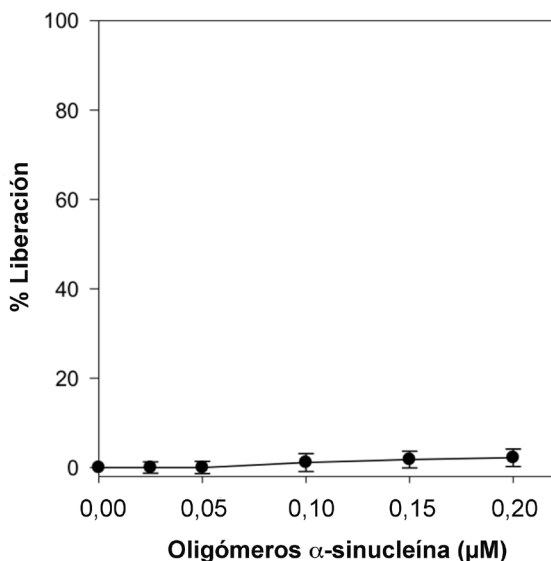


Figura 3. Liberación de contenidos acuosos desde vesículas de POPC. Se muestra el efecto de la concentración de oligómeros de alfa-sinucleína sobre la permeabilidad de membranas. El porcentaje de liberación está expresado como el porcentaje de la pérdida de contenido acuoso máxima, obtenida al añadir Triton X-100 (concentración final 0,5% v/v). Las barras de error muestran la desviación estándar tras promediar dos medidas realizadas en experimentos independientes.

Por el contrario, pudo observarse una fuerte disrupción de las vesículas preparadas con lípidos negativos (POPG, DOPG). La Figura 4 muestra cómo los oligómeros de alfa-sinucleína producen una liberación prácticamente instantánea del contenido de vesículas de DOPG y POPG. Esta liberación de contenidos acuosos resultó ser dependiente de la concentración de oligómeros en el medio, en lo que se refiere tanto a la extensión final de liberación como a la velocidad a la que se alcanza el máximo. Para el caso de vesículas formadas por DOPG, el 50% de liberación de las LUVs se alcanzó a una concentración en torno a 0,05 mM mientras que para las vesículas de POPG este mismo porcentaje de liberación se alcanzó empleando una mayor concentración de oligómeros (~0,1 mM), lo que sugiere un efecto relativamente selectivo por la DOPG sobre la interacción lípido/oligómero y sus consecuencias en cuanto a la alteración de las propiedades de permeabilidad de las membranas. Ahora bien, dado que las bicapas lipídicas que contienen exclusivamente lípidos aniónicos tienen una elevada densidad de carga y no reflejan la situación presente en una membrana celular, se analizó también la permeabilización inducida por los oligómeros de alfa-sinucleína sobre bicapas lipídicas con una densidad de carga menor, es decir, LUVs que contenían 50% de POPC y 50% de un lípido aniónico (mol:mol). En la Figura 5 se muestra el efecto de la relación oligómero/lípido sobre la permeabilidad inducida por oligómeros de alfa-sinucleína desde las diferentes vesículas fosfolipídicas empleadas. Puede observarse claramente cómo la presencia de POPC en las membranas inhibe la capacidad de los oligómeros para permeabilizar las vesículas, alcanzándose a la máxima concentración de oligómeros empleada tan solo el 40% de liberación para el caso de POPC:DOPG y el 3% para los liposomas formados por POPC:POPG. Los resultados de este experimento muestran claramente que para que ocurra la permeabilización de las membranas por oligómeros de alfa-sinucleína las interacciones electrostáticas juegan un papel importante.

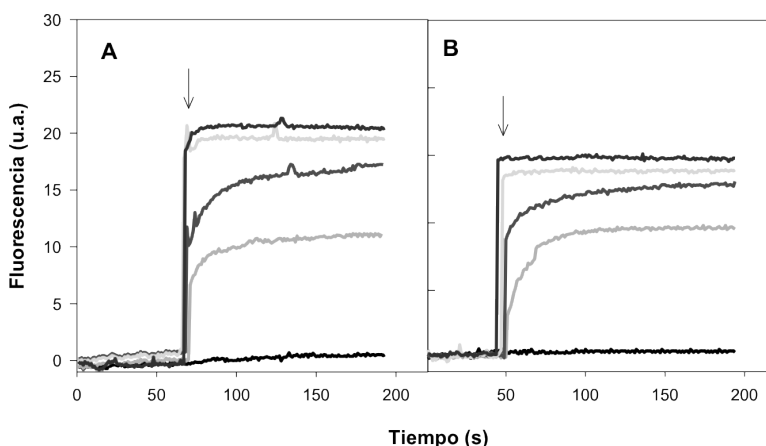


Figura 4. Cinéticas de liberación de contenidos acuosos desde vesículas de DOPG (A) y POPG (B). La liberación es inducida por la presencia de oligómeros de alfa-sinucleína a concentraciones de 0,025, 0,05, 0,1, 0,15 y 0,2 mM (del negro al gris oscuro) a 25 °C. La concentración de lípido utilizada por ensayo fue de 20 mM. El leakage se siguió monitoreando la emisión de fluorescencia del ANTS a 536 nm utilizando una longitud de onda de excitación de 353 nm.

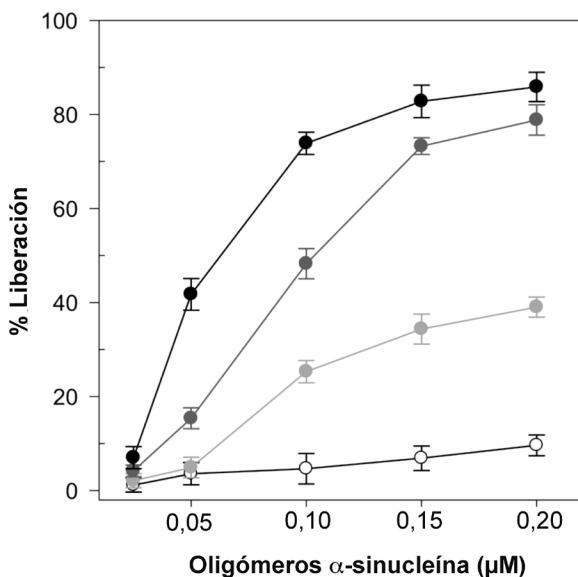


Figura 5. Efecto de la relación oligómero/lípido en la liberación de contenidos acuosos desde diferentes vesículas fosfolípídicas. La concentración de lípido utilizada por ensayo fue de 20 mM siendo la composición de las vesículas: POPC:POPG (blanco), POPC:DOPG (gris claro), POPG (gris oscuro) y DOPG (negro). Las barras de error muestran la desviación estándar tras promediar dos medidas realizadas en experimentos independientes.

Experimentos realizados por otros autores empleando vesículas unilamelares gigantes (GUVs) como modelo de membranas (15) sugieren que aunque la carga negativa es suficiente para favorecer la unión de la alfa-sinucleína, para que ocurra la permeabilización es necesario la des-estabilización de la bicapa lipídica. Así pues para evaluar esta hipótesis se prepararon LUVs en las cuales el empaquetamiento lipídico en la bicapa se viese afectado de alguna manera ya sea por el número de insaturaciones en la cadena de acilo de los fosfolípidos o por la presencia de colesterol en las vesículas. Al incrementar el grado de insaturación en las vesículas mediante el empleo de DOPG, se disminuye el grado de orden las cadenas aciladas permitiendo una mayor separación entre las cabezas polares de los fosfolípidos, lo que resulta en una bicapa más delgada que favorece la interacción de los oligómeros con la región hidrocarbonada. La Figura 6 muestra la influencia del grado de orden de vesículas preparadas a partir de especies de fosfatidilglicerol con un grado de orden ascendente (DOPG, POPG, POPG:Chol 70:30). Puede observarse cómo el incremento en el orden de las membranas disminuye la permeabilización inducida por los oligómeros de alfa-sinucleína alcanzándose a la máxima concentración de oligómeros empleada tan solo un 61% para liposomas compuestos por POPG:Col, un 78% para LUVs de POPG y un 85% para DOPG. Estos resultados sugieren que no solo las interacciones electrostáticas son importantes en la interacción lípido/oligómero sino que para que la permeabilización ocurra, también es necesario que los oligómeros tengan acceso al corazón hidrocarbonado de la membrana.

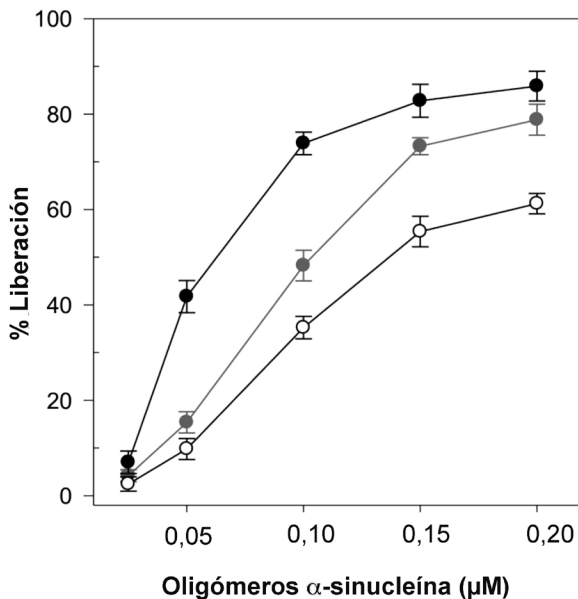


Figura 6. Influencia del grado de orden de vesículas lipídicas de PG sobre la permeabilización inducida por oligómeros de alfa- sinucleína. La concentración de lípido empleado por ensayo fue de 20 mM. Las barras de error muestran la desviación estándar tras promediar dos medidas realizadas en experimentos independientes.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Aunque la relevancia fisiológica de las interacciones entre la alfa-sinucleína y las membranas lipídicas está ampliamente reconocida, muchos de los factores que afectan estas interacciones no se comprenden en su totalidad debido principalmente, a que la composición de la membrana plasmática es demasiado compleja para identificar directamente las especies lipídicas y las propiedades de membrana que influyen la unión entre la alfa-sinucleína y las vesículas, es por esto que ha sido necesario emplear un sistema modelo bien definido para su estudio. Desde hace años se han desarrollado varios métodos biofísicos que permiten estabilizar, aislar y caracterizar los diferentes intermediarios protofibrilares en la vía de formación de amiloides. Se ha propuesto que los oligómeros prefibrilares de esta proteína, a diferencia de las fibrillas maduras, representan la especie tóxica en la enfermedad de Parkinson (27) debido a que la disrupción membranal que causan las especies oligoméricas es considerada como un mecanismo de citotoxicidad probable. Algunos estudios realizados en modelos celulares muestran que la citotoxicidad parece estar asociada al contenido de lámina-beta mientras que, oligómeros con una elevada fracción en dominios alfa-helicoidales parecen ser benignos (28)(29). Utilizando diferentes protocolos, *in vitro*, ha sido posible sintetizar y purificar especies oligoméricas con diferente citotoxicidad, estructura secundaria y morfología, observándose mediante AFM y EM oligómeros esféricos con un diámetro mayor a 30 nm y alturas que oscilan entre 2 y 10 nm (30)(31). Hasta ahora, la detección *in vivo* de oligómeros de alfa-sinucleína solo había

sido posible empleando métodos bioquímicos indirectos en modelos hemiparkinsonianos de ratas y no fue hasta el año pasado cuando se desarrolló un modelo animal que permite detectar y realizar el seguimiento de la formación de los oligómeros de alfa-sinucleína *ex vivo* e *in vivo* (32). En dichos experimentos se observa claramente la aparición de agregados proteicos característicos de los cuerpos de Lewy y neuritas de Lewy presentes en pacientes con Parkinson. El protocolo que se siguió en esta investigación para la preparación de los oligómeros de alfa-sinucleína fue el propuesto por van Rooijen *et al.* (13), el cual permite la obtención reproducible de especies oligoméricas de entre 6-11nm de diámetro, predominantemente con estructura lámina-beta y con capacidad para interactuar con vesículas lipídicas. Los resultados obtenidos en este trabajo proveen información sobre la contribución de la cabeza polar y el estado de fase de los fosfolípidos sobre la permeabilización de vesículas. Estos resultados muestran claramente que la incubación de liposomas de POPC con oligómeros de alfa-sinucleína no origina permeabilización de membranas, lo que descarta que la membrana plasmática de la mayoría de las células sea un blanco para la permeabilización por dichos oligómeros. Por el contrario, se observó que los oligómeros pueden permeabilizar vesículas de POPG y DOPG de una manera dependiente de la concentración. Las cinéticas mostraron que la permeabilización ocurre directamente después de la adición de los oligómeros y que se completa en tan solo unos minutos, lo que sugiere que las interacciones electrostáticas parecen ser determinantes en mediar la permeabilización de membranas. Esta unión podría explicarse debido al hecho de que a pH neutro, el segmento N-terminal de la región de la proteína contiene muchos residuos cargados positivamente (33)(34), sin embargo, parece poco favorable energéticamente que exista una clara separación de carga en los oligómeros de alfa-sinucleína tal y como ocurre en el monómero proteico; no obstante, puede pensarse que en los oligómeros, el segmento N-terminal se encuentra disponible para la unión con las vesículas lipídicas. En el trabajo de investigación realizado por Villar se identificó mediante el empleo de espectroscopia de resonancia magnética nuclear en estado sólido, que el corazón de las fibras oligoméricas de alfa-sinucleína está conformado por 5 hojas beta, mientras que los segmentos N- y C- terminales presentan una conformación flexible (35). Las primeras 3 hojas beta tienen una longitud de 6-8 residuos y las otras dos una longitud de 9-13 residuos. Así pues, dado este acomodo estructural puede decirse que el papel que desempeñan las interacciones electrostáticas en la permeabilización de membranas por los oligómeros de alfa-sinucleína parece ser algo más complejo. En experimentos realizados por otro grupo de investigación utilizando como sonda indicadora calceína (36), se observaron porcentajes de liberación muy similares a los obtenidos en este trabajo a partir del mismo tipo de vesículas fosfolipídicas, lo que permite expresar que la encapsulación de las sondas ANTS y DPX presenta otra alternativa válida para la evaluación de la liberación de contenidos acuosos desde vesículas en este sistema modelo. Ahora bien, además de las interacciones electrostáticas, los resultados mostraron que otro de los parámetros que tiene influencia sobre la disrupción de membranas es el empaquetamiento lipídico ya que pudo observarse que las vesículas más densamente empaquetadas son más resistentes

a la permeabilización, sugiriendo que las interacciones hidrofóbicas contribuyen también a la unión lípido-oligómero, dejando más accesibles a la disrupción, bicapas con una mayor fluidez en su interior. Los datos biofísicos que aquí se presentan solo proporcionan indicios de cómo es que podrían interactuar las especies oligoméricas de esta proteína con los componentes celulares, ya que no es tan sencillo trasladar estos resultados al efecto que pudieran tener los oligómeros *in vivo* debido principalmente a que las membranas biológicas reales son mucho más heterogéneas y contienen dominios distintos que facilitarían las interacciones oligómero-membrana. Sin embargo, la dependencia en las propiedades físicas de la membrana proporciona información relevante sobre el mecanismo por el cual ocurre la permeabilización originada por oligómeros de alfa-sinucleína. Además del mecanismo de poro propuesto por Volles *et al.* (23), el “adelgazamiento” de la bicapa se ha propuesto recientemente como un posible modo de acción. Por tanto, en base a los resultados obtenidos se puede concluir que la adsorción de los compuestos oligoméricos en la superficie de la membrana probablemente causa un aumento en el espaciamiento promedio de la cabeza polar de los fosfolípidos y que, por tanto, se tenga un efecto de adelgazamiento de la bicapa con lo cual se incrementa la permeabilidad al disminuir el espesor de la barrera hidrofóbica.

AGRADECIMIENTOS

El autor principal agradece el apoyo financiero otorgado por la Universidad Autónoma de Nuevo León a través del Programa ProACTI clave 177-MCS-2023 para la realización de este trabajo.

REFERENCIAS

1. Scott TR, Netsky MG. The pathology of Parkinson's syndrome: a critical review. *Int J Neurol* 1961; 2: 51-60.
2. Moore DJ, West AB, Dawson VL, Dawson TM. Molecular pathophysiology of Parkinson's Disease *Pathophys* 2005; 28: 55-84.
3. Uversky VN. Neuropathology, biochemistry and biophysics of alpha-synuclein aggregation. *J Neurochem* 2007; 103: 17-37.
4. Conway KA, Harper JD, Lansbury PT. Fibrils formed *in vitro* from alpha-synuclein and two mutant forms linked to Parkinson's disease are typical amyloid. *Biochem* 2000; 39: 2552-63.
5. Stöckl MT, van Rooijen D, Mireille MAE, Classens V, Subramaniam V. Structural and functional insights into alpha-synuclein-lipid interaction. *Lipids and Cellular Membranes in Amyloid Diseases*, 1st. Ed. Albany (NY): Wiley-VCH; 2011. p. 33-53.
6. Weinreb PH, Zhen W, Poon AW, Conway KA, Lansbury PT. NACP a protein implicated in Alzheimer's disease and learning, is natively unfolded. *Biochem* 1996; 35: 13709-15.

7. Chiti F, Dobson CM. Protein, misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annu Rev Biochem* 2006; 75: 333-66.
8. Outeiro TF, Putcha P, Tetzlaff JE, Spoelgen R, Koker M. Formation of toxic oligomeric alpha-synuclein species in living cells. *PLoS ONE* 2008; 3: e1867.
9. Chandra S, Chen X, Rizo J, Jahn R, Sudhof TC. A broken alpha-helix in folded alpha-synuclein. *J Biol Chem* 2003; 278: 15313-8.
10. Bonini NM, Giasson BI. Snaring the function of alpha-synuclein. *Cell* 2005; 123: 359-61.
11. Yu S, Li X, Liu G, Han J, Zhang C, Liu C. Extensive nuclear localization of alpha-synuclein in normal rat brain neurons revealed by a novel monoclonal antibody. *J Neurosci* 2007; 145: 539-55.
12. Cheng F, Vivacqua G, Yu S. The role of alpha-synuclein in neurotransmission and synaptic plasticity. *J Chem Neu* 2011; 42: 242-8.
13. van Rooijen BD, Claessens MM, Subramaniam V. Lipid bilayer disruption by oligomeric alpha-synuclein depends on bilayer charge and accessibility of the hydrophobic core. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1788: 1271-8.
14. van Rooijen BD, Claessens MMAE, Subramaniam V. Membrane permeabilization by oligomeric alpha-synuclein: In search of the mechanism. *PLoS ONE* 2010; 5: e0014292.
15. Stöckl MT, Fischer P, Hermann V. Alpha-synuclein selectively binds to anionic phospholipids embedded in liquid-disordered domains. *J Mol Biol* 2008; 375: 1394-404.
16. Stöckl MT, Zijlstra N, Subramaniam V. Alpha-synuclein oligomer: an amyloid pore? *Mol Neurobiol* 2013; 47: 613-21.
17. Rouser G, Siakotos AN, Fleischer AS. Quantitative analysis of phospholipids by TLC and phosphorus analysis of spots. *Lipids* 1966; 1: 85-6.
18. Ellens H, Bentz J, Szoka FC. H⁺ and Ca²⁺ induced fusion and destabilization of liposomes. *Biochem* 1985; 24: 3099-106.
19. Lashuel HA, Petre BM, Wall J, Simon M, Nowak RJ, Walz T, *et al.* Alpha-synuclein, especially the Parkinson's disease-associated mutants, forms pore-like annular and tubular protofibrils. *J Mol Biol* 2002; 322: 1089-102.
20. Takamori S, Holt M, Stenius K, Lemke E. Molecular anatomy of a trafficking organelle. *Cell* 2006; 127: 831-46.
21. Trexler AJ, Rhoades E. Alpha-synuclein binds large unilamellar vesicles as an extended helix. *Biochem* 2009; 48: 2304-6.
22. Deutsch JW, Kelly RB. Lipids of synaptic vesicles: relevance to the mechanism of membrane fusion. *Biochem* 1981; 20: 378-85.

23. Volles MJ, Lansbury PT. Vesicle permeabilization by pro- tofibrillar alpha-synuclein is sensitive to Parkinson's disease-linked mutations and occurs by a pore-like mechanism. *Biochem* 2002; 41: 4595-602.
24. Zhu M, Li J, Lou A, Fink. The association of alpha-synuclein with membranes affects bilayer structure, stability and fibril formation. *J Biol Chem* 2003; 278: 40186-97.
25. Fortin DL, Trayer MD, Nakamura K, Kubo S. Lipid rafts mediate the synaptic localization of alpha-synuclein. *J Neurosci* 2004; 24: 6715-23.
26. Rhoades E, Ramlall TF, Eliezer D. Quantification of alpha-synuclein binding to lipid vesicles using fluorescence correlation spectroscopy. *Biophys J* 2006; 90: 4692-700.
27. Winner B, Jappelli R, Samir K, Maji PA, Desplats A, Boyer L, *et al.* *In vivo* demonstration that alpha-synuclein oligomers are toxic. *PNAS* 2011; 108: 4194-9.
28. Ehrnhoefer DE. EGCG redirects amyloidogenic polypeptides into unstructured, off-pathway oligomers. *Nat Struct Mol Biol* 2008; 15: 558-66.
29. Bieschke J. EGCG remodels alpha-synuclein and amyloid-beta fibrils and reduces cellular toxicity. *Proc Natl Acad Sci* 2010; 107: 7710-5.
30. Denzer KM. Different species of alpha-synuclein oligomers induce calcium influx and seeding. *J Neurosci* 2007; 27: 9220-332.
31. Kim HY, Cho MY, Kumar A, Maier E, Becker S, Lashuel HA, Xweckstetter M. Structural properties of pore-forming oligomers of alpha-synuclein. *J Am Chem Soc* 2009; 131: 17482-9.
32. Dimant H, Kalia S, Kalia L, Zhu L, Kibuu L, Ebrahimi-Fakhari D, *et al.* Direct detection of alpha-synuclein oligomers *in vivo*. *Acta Neurophatol Commmun* 2013; 1: 6-11.
33. Auluck PK, Caraveo G, Lindquist S. Alpha-synuclein: membrane interactions and toxicity in Parkinson's disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2010; 26: 211-33.
34. Eliezer D, Kutluay E, Busell R, Browne G. Conformational properties of alpha-synuclein in its free and lipid-associated states. *J Mol Biol* 2001; 307: 1061-73.
35. Vilar M, Chou H, Lührs T, Maji SK, Riek-Loher D, Verel R, *et al.* The fold of alpha-synuclein fibrils. *PNAS* 2008; 105: 8637-42.
36. van Rooijen BD, Claessens MM, Subramaniam V. Lipid bilayer disruption by oligomeric alpha-synuclein depends on bilayer charge and accessibility of the hydrophobic core. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1788: 1271-8.