



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS  
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO  
DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA MOLECULAR

**EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES:  
 $\alpha$ -SINUCLÉINA HUMANA SILVESTRE Y  $\alpha$ -SINUCLÉINA MODIFICADA  
EN LA POSICIÓN 39**

**TESIS QUE PRESENTA:**

LBG. HEBER MIGUEL TORRES CORDERO

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS EN LA ESPECIALIDAD  
DE BIOMEDICINA MOLECULAR

**CO-DIRECTOR DE TESIS**

DRA. MARÍA TERESA ESTRADA GARCÍA

**CO-DIRECTOR DE TESIS**

DRA. DVORAK MONTIEL CONDADO

CIUDAD DE MÉXICO, AGOSTO, 2016

## COMITÉ DE TESIS

### DIRECTORES

---

**DRA. MARÍA TERESA ESTRADA GARCÍA**

Investigadora del Departamento de Biomedicina Molecular, CINVESTAV

---

**DRA. DVORAK MONTIEL CONDADO**

Investigadora de la Facultad de Ciencias Biológicas, UANL

### ASESORES

---

**DRA. AZUCENA DEL CARMEN GONZÁLEZ HORTA**

Investigadora de la Facultad de Ciencias Biológicas, UANL

---

**DR. VIANNEY FRANCISCO ORTÍZ NAVARRETE**

Investigadora del Departamento de Biomedicina Molecular, CINVESTAV

---

**DR. BRUNO ALFONSO ESCALANTE ACOSTA**

Investigador del Departamento de Biomedicina Molecular, CINVESTAV

Este trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Ciencias Genómicas de la Facultad de Ciencias Biológicas Unidad B, de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL) en colaboración con el Departamento de Biomedicina Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN), Unidad Zacatenco de la Ciudad de México.

Agradezco al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por las becas otorgadas que permitieron la realización de este trabajo.

Agradezco también al laboratorio de la Dra. Rosaura Hernández y al laboratorio de la Dra. Iracheta por algunos de los reactivos proporcionados para la realización de este proyecto.

*“Hermanos míos, tened por sumo gozo cuando os halléis en diversas pruebas, sabiendo que la prueba de vuestra fe produce paciencia. Mas tenga la paciencia su obra completa, para que seáis perfectos y cabales, sin que os falte cosa alguna. Y si alguno de vosotros tiene falta de sabiduría, pídala a Dios, el cual da a todos abundantemente y sin reproche, y le será dada. Pero pida con fe, no dudando nada; porque el que duda es semejante a la onda del mar, que es arrastrada por el viento y echada de una parte a otra.”*

*Santiago 1:2-6*

## AGRADECIMIENTOS

**A la Dra Dvorak Montiel** que me dio la oportunidad de trabajar en su laboratorio dentro del proyecto y nunca me faltó nada para mi trabajo. Por sus consejos, su tiempo y su asesoría incondicional y por darme la confianza de crecer profesionalmente en el desarrollo de este trabajo. Especialmente por las oportunidades que me dio de asistir a congresos y eventos internacionales. Muchas gracias Dra, significó mucho para mí.

**A la Dra Teresa Estrada** por su cuidado y sus consejos a lo largo de la realización de este trabajo y la oportunidad que me dio de realizar mi proyecto de tesis en co-tutoría con la Dra Dvorak. Le estoy muy agradecido.

**A mis asesores de tesis** por sus consejos, asesorías y reactivos brindados en la elaboración de este trabajo. En especial a la Dra Azucena y a la Dra Iracheta que me ayudaron mucho.

**A mis compañeras y amigas de laboratorio** Karen, Claudia y Jaqui, porque el ambiente de trabajo lo hicieron disfrutable y ameno lleno de muchas experiencias. Igualmente a Ediner y Lupita que en una parte del proyecto se involucraron mucho y fueron de muchísima ayuda. Les agradezco mucho a todos. Al Dr Claudio Moreno por su apoyo en algunas revisiones y a la Dra Janneth Salinas.

**Y a todos** los que de alguna manera me apoyaron y creyeron en mi en todo este tiempo. Les agradezco mucho. Dios los bendiga a todos.

## DEDICATORIAS

**A Dios** por darme la fortaleza, sabiduría y paciencia para poder cumplir una meta más en mi vida, porque sin la ayuda de Él no se que hubiera hecho.

**A mis papás** por todo su apoyo brindado en cada una de mis frustraciones durante esta etapa; por sus consejos, ánimos y oraciones que me ayudaban a seguir adelante durante mi trabajo. A mis hermanos Aldo y Cynthia por darme ánimos cuando también lo necesitaba.

**A mis amigos del laboratorio** Claudio, Marina, Gil, Lalo, Ramón, Jordy, Dionicio, Amaya, Claudia, Karen y Jaqui, por su ayuda incondicional cuando lo llegué a necesitar en alguna parte del proyecto. A Ediner y Lupita que también me ayudaron mucho.

**A mis amigos de la iglesia** César, Héctor, Oscar, Mike, Valente, Damaris, Carlos, Misa y Abelardo, principalmente por sus oraciones y apoyo moral cuando más lo necesité. Y porque hicieron de este año una experiencia de muchos retos y logros para mi vida personal.

**A mis amigos del CIDEB** Jeannie, Elsa, Alexandra y Alan, porque desde el principio estuvieron al pendiente de mi y me ayudaron en todo el tiempo que necesité de ellos.

**A mis amigos de la escuela** Carlos, Marisol, Rebeca y Alonso, sin ustedes no hubiera sido lo mismo sobrellevar este reto todo el primer año. Los aprecio bastante y tenemos que seguir en contacto.

**A la maestra Yolanda Barboza** porque también desde el principio me aconsejó y creyó en mi en todo momento. Por darme ánimos y confiar en mi trabajo.

**Por último a la Dra. Dvorak** porque me demostró el cariño que en muchos laboratorios hace mucha falta de parte de los tutores a nosotros los estudiantes. La aprecio mucho.

## ÍNDICE

<b>Lista de Tablas</b> .....	<b>10</b>
<b>Lista de Figuras</b> .....	<b>11</b>
<b>Lista de Abreviaturas</b> .....	<b>13</b>
<b>Resumen</b> .....	<b>17</b>
<b>Summary</b> .....	<b>18</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>19</b>
1.1 La Enfermedad de Parkinson .....	<b>19</b>
1.2 Mecanismos Patogénicos .....	<b>20</b>
1.3 Estructura de la $\alpha$ -sinucleína .....	<b>21</b>
1.4 Función de la $\alpha$ -sinucleína .....	<b>23</b>
1.5 Disfunción de la $\alpha$ -sinucleína en la Enfermedad del Parkinson.....	<b>24</b>
1.6 Interacción de $\alpha$ -sinucleína con membranas mitocondriales .....	<b>27</b>
1.7 Producción de la $\alpha$ -sinucleína recombinante .....	<b>29</b>
<b>II. JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>31</b>
<b>III. HIPÓTESIS</b> .....	<b>31</b>
<b>IV. OBJETIVOS</b> .....	<b>32</b>
4.1 Objetivo General .....	<b>32</b>
4.2 Objetivos Específicos .....	<b>32</b>
<b>V. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>33</b>
5.1 Obtención y rediseño de la secuencia codificante de la $\alpha$ -sinucleína humana silvestre y de la $\alpha$ -sinucleína modificada en la posición 39 .....	<b>33</b>
5.2 Síntesis química de las secuencias codificantes para la $\alpha$ -sinucleína humana silvestre modificada en la posición 39 .....	<b>33</b>
5.3 Obtención del vector de expresión pGEX .....	<b>33</b>
5.4 Preparación de las células calcio competentes de las cepas de <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ y	

	9
BL21.....	34
5.5 Transformación de las células <i>E. coli</i> Top10 con las secuencias sintéticas y el vector de expresión pGEX por choque térmico .....	34
5.6 Purificación de los plásmidos .....	35
5.7 Liberación de las construcciones sintéticas a partir de pUC57 .....	36
5.8 Purificación del DNA a partir del gel de agarosa .....	36
5.9 Preparación del vector pGEX para subclonación .....	37
5.10 Ligación de las construcciones sintéticas al vector de expresión pGEX .....	38
5.11 PCR de colonia .....	38
5.12 Ensayo de expresión de las proteínas de fusión GST- $\alpha$ -sinucleína humana silvestre y GST- $\alpha$ -sinucleína Y39W .....	40
5.13 SDS-PAGE .....	40
5.14 Ensayo de <i>Western Blot</i> .....	41
5.15 Ensayo de unión de las proteínas de fusión GST- $\alpha$ -sinucleína humana y GST- $\alpha$ -sinucleína Y39W a las perlas de <i>Glutathion Sepharose</i> .....	42
5.16 Corte específico de las proteínas de fusión GST- $\alpha$ -sinucleína humana silvestre y GST- $\alpha$ -sinucleína Y39W con la proteasa trombina .....	43
<b>VI. RESULTADOS .....</b>	<b>44</b>
6.1 Diseño de las secuencias sintéticas codificantes para las proteínas $\alpha$ -sinucleína humana y $\alpha$ -sinucleína Y39W .....	44
6.2 Subclonación de las secuencias codificantes para las proteínas $\alpha$ -sinucleína humana silvestre y $\alpha$ -sinucleína Y39W al vector de expresión .....	47
6.3 Expresión de las proteínas de fusión GST- $\alpha$ -sinucleína humana silvestre y GST- $\alpha$ -sinucleína Y39W .....	54
6.4 Purificación de las proteínas $\alpha$ -sinucleína humana silvestre y $\alpha$ -sinucleína con el cambio Y39W .....	57
<b>VII. DISCUSIÓN .....</b>	<b>60</b>
<b>VIII. CONCLUSIONES .....</b>	<b>64</b>
<b>IX. PERSPECTIVAS .....</b>	<b>65</b>

<b>X. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>66</b>
------------------------------	-----------

## **LISTA DE TABLAS**

**Tabla 1.** Reactivos y concentraciones utilizadas para realizar la reacción de ligación entre pGEX y las secuencias codificantes de las  $\alpha$ -sinucleínas

**Tabla 2.** Reactivos y concentraciones de la PCR de colonia

**Tabla 3.** Protocolo de la PCR para la programación del termociclador

**Tabla 4.** Reactivos y concentraciones utilizadas para la preparación del gel SDS-PAGE al 12%

**Tabla 5.** Diferentes condiciones probadas para la optimización de la producción de las  $\alpha$ -sinucleínas recombinantes

## LISTA DE FIGURAS

### INTRODUCCIÓN

**Figura 1.** Postura característica de los pacientes con la Enfermedad de Parkinson

**Figura 2.** Cuerpos de Lewy

**Figura 3.** Formación de oligómeros de la  $\alpha$ -sinucleína

**Figura 4.** Modificaciones conformacionales de la  $\alpha$ -sinucleína en un ambiente polar y en uno no polar

**Figura 5.** Estructura general de la  $\alpha$ -sinucleína

**Figura 6.** Localización de la  $\alpha$ -sinucleína en las células dopaminérgicas

**Figura 7.** Acoplamiento de la  $\alpha$ -sinucleína a las vesículas sinápticas

**Figura 8.** Modelo de la alteración de la membrana de las vesículas sinápticas: tipo poro

**Figura 9.** Modelo de la alteración de la membrana de las vesículas sinápticas: por desestabilización

**Figura 10.** Representación de la posible interacción de la  $\alpha$ -sinucleína con las bicapas lipídicas

**Figura 11.** Localización de la  $\alpha$ -sinucleína en la membrana de las mitocondrias

### RESULTADOS

**Figura 12.** Procedimiento para la obtención de la secuencia codificante de la  $\alpha$ -sinucleína humana silvestre

**Figura 13.** Sitio del cambio del codón TAT por TGG en la secuencia codificante de la  $\alpha$ -sinucleína

**Figura 14.** Secuencias codificantes para la  $\alpha$ -sinucleína humana y la  $\alpha$ -sinucleína Y39W

**Figura 15.** Secuencias codificantes para las  $\alpha$ -sinucleínas optimizadas para *E. coli*

**Figura 16.** Esquema del sitio de clonación del vector pGEX y la secuencia aminoacídica en fase para las proteínas GST y la  $\alpha$ -sinucleína

**Figura 17.** Resultado de la extracción de los plásmidos pGEX y pUC57+ $\alpha$ -sinucleína WT/YW

**Figura 18.** Gel de agarosa de los productos linearizados de los plásmidos pUC57+ $\alpha$ -sinucleína humana silvestre y la sinucleína humana 39 YW.

**Figura 19.** Gel de agarosa de los los fragmentos sintéticos y la preparación del vector pGEX

**Figura 20.** Secuencia de la construcción sintética que se obtendrá utilizando los *primers* comerciales para pGEX

**Figura 21.** Gel de electroforesis de la reacción de la PCR de colonia

**Figura 22.** Comparación entre la secuencia de la  $\alpha$ -sinucleína huamana sintética y la secuencia  $\alpha$ -sinucleína huamana silvestre

**Figura 23.** Gel de SDS-PAGE de la inducción de las proteínas de fusión GST- $\alpha$ -sinucleína WT/YW por IPTG

**Figura 24.** Gel de SDS-PAGE de la inducción de las proteínas de fusión GST- $\alpha$ -sinucleína WT/YW por IPTG después de la optimización de las condiciones para la producción de las proteínas recombinantes

**Figura 25.** *Western Blot* de la identificación de las  $\alpha$ -sinucleínas recombinantes

**Figura 26.** Gel de SDS-PAGE del acoplamiento de las proteínas de fusión GST- $\alpha$ -sinucleína WT/YW a las perlas de *Glutation Sepharose*

**Figura 27.** Gel de SDS-PAGE del corte específico con la enzima trombina de las proteínas de fusión GST- $\alpha$ -sinucleína WT/YW

## LISTA DE ABREVIATURAS

**EP** - Enfermedad de Parkinson

**SNpc** - *Sustancia nigra pars compacta*

**N-Terminal** - Amino terminal

**DNA** - Ácido desoxiribonucleico

**RNA** - Ácido ribonucleico

**A** - Alanina

**T** - Treonina

**E** - Acido glutámico

**K**- Lisina

**P**- Prolina

**Y** - Tirosina

**W** - Triptófano

**G** - Glutamina

**V** - Valina

**NAC** - Componente beta-no-amiloide

**C Terminal** - Carboxilo terminal

**RAB** - Proteínas cerebrales Ras

**SNARE** - *Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor*

**Ca** - Calcio

**DOPC** - 1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-fosfatidilcolina

**DOPE** - 1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-fosfatidiletanolamina

**DMPG** - 1',3'-bis[1,2-dimiristoil-*sn*-glicero-3-fosfo]-*sn*-glicerol

**DOPG** - 1',3'-bis[1,2- dioleoil-*sn*-glicero-3-fosfo]-*sn*-glicerol

**CH** - Colesterol

**PO<sub>4</sub>** - Grupos fosfato

**Thr** - Treonina

**Phe** - Fenilalanina

**Tyr** - Tirosina

**CL** - Cardiolipina

**GST** - Glutación-S-transferasa

**IPTG** - Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranósido

**Y39W** - Cambio de tirosina por triptófano en la posición 39

**µg** - Microgramos

**ng** - Nanogramos

**µL** - Microlitros

**LB** - Medio Luria-Bertani

**DO** - Densidad óptica

**mL** - Mililitros

**M** - Molaridad

**xg** - Gravedades

**rpm** - Revoluciones por minuto

**min** - Minutos

**seg** - Segundos

**hr** - Horas

**mM** - Milimolar

**u** - Unidades

**PCR** - Reacción en cadena de la polimerasa

**Amp** - Ampicilina

**volt** - Volteos

**PBS** - Solución salina amortiguadora de fosfatos

**SDS-PAGE** - Gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes

**NCBI** - *Nacional Center for Biotechnhnology Information*

**RNA<sub>m</sub>** - RNA mensajero

**pb** - Pares de bases

**aa** - Aminoácidos

**WT** - *Wild Type* (silvestre en inglés)

**YW** - Cambio de tirosina por triptófano

***E. coli*** - *Escherichia coli*

**kDa** - Kilodaltones

**M** - Marcador molecular

**pUC57+WT** - Plásmido pUC57 conteniendo la secuencia codificante para la α-sinucleína humana silvestre

**pUC57+YW** - Plásmido pUC57 conteniendo la secuencia codificante para la α-sinucleína con el cambio de tirosina por triptófano en la posición 39

**pGEX+WT** - Plásmido pGEX conteniendo la secuencia codificante para la  $\alpha$ -sinucleína humana silvestre

**pGEX+YW** - Plásmido pGEX conteniendo la secuencia codificante para la  $\alpha$ -sinucleína con el cambio de tirosina por triptófano en la posición 39

**GST- $\alpha$ -sinucleína WT** - Proteína de fusión entre GST y la proteína  $\alpha$ -sinucleína humana silvestre

**GST- $\alpha$ -sinucleína YW** - Proteína de fusión entre GST y la proteína  $\alpha$ -sinucleína con el cambio de tirosina por triptófano en la posición 39

**Ind** - Inducción con IPTG

**Perl** - Perlas de *Glutation Sepharose*

**DH** - *E. coli* cepa DH5- $\alpha$

**BL** - *E. coli* cepa BL21

**et. al.** - Y colaboradores

**MBP** - Proteína de unión a maltosa

**PD** - *Parkinson's disease*

**Sbn** - Sobrenadante

## RESUMEN

La Enfermedad de Parkinson (EP) es una enfermedad neurodegenerativa progresiva que comúnmente se presenta a la edad de entre los 40 y 70 años y que se ha asociado a la degeneración y a la pérdida selectiva de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia *nigra pars compacta* (SNpc). Algunos estudios indican que la  $\alpha$ -sinucleína se encuentra involucrada en el control del proceso sináptico de las membranas en las neuronas y en la liberación de neurotransmisores. También se ha comprobado que la acumulación de esta proteína contribuye al desarrollo de la enfermedad a través de la formación de agregados oligoméricos llamados Cuerpos de Lewy. Adicionalmente, algunas mutaciones en el gen *snca*, que codifica para la  $\alpha$ -sinucleína, se han asociado directamente con la EP. Por todo lo anteriormente mencionado es que la caracterización de la  $\alpha$ -sinucleína es relevante para dilucidar algunos de los mecanismos que conllevan al desarrollo de la EP.

Se ha demostrado que la región N-terminal de la  $\alpha$ -sinucleína juega un papel muy importante en la translocación de la  $\alpha$ -sinucleína a la membrana, ya que cuando esta región se encuentra alterada, es capaz de formar los agregados oligoméricos. Aunque no se sabe el mecanismo patogénico exacto dado por esta proteína en la EP, algunas evidencias sugieren que estos agregados resultan en la posible formación de poros en las membranas de las vesículas sinápticas, llevando a la célula a su muerte. Otros estudios sugieren que los agregados podrían desestabilizar a las membranas de estas vesículas causando una permeabilidad que provocaría la liberación de su contenido. Aún así, no se sabe a ciencia cierta lo que sucede con esta proteína, por lo que si se pretenden estudiar los procesos dados por la  $\alpha$ -sinucleína que llevan a la desregulación de la liberación de dopamina y por ende a la muerte celular, primero es necesario contar con un método estandarizado de expresión y purificación de la proteína recombinante que nos permita realizar dichos estudios. En este trabajo se propone la expresión y purificación de la proteína recombinante  $\alpha$ -sinucleína humana silvestre, como aquella con el cambio de tirosina por triptófano en la posición 39.

## **Summary**

*Parkinson's disease (PD) is a progressive neurodegenerative disease which commonly occurs at the age of between 40 and 70 years old and has been associated with degeneration and selective loss of dopaminergic neurons of the substantia nigra pars compacta (SNpc). Some studies indicate that  $\alpha$ -synuclein is involved in controlling synaptic membranes process in neurons and neurotransmitter release. It has also been found that the accumulation of this protein contributes to the development of the disease through the formation of oligomeric aggregates called Lewy Bodies. Additionally, some mutations in snca gene encoding for  $\alpha$ -synuclein, are associated directly with the PD; there's the importance for their study to understand some of the mechanisms that lead to disease development.*

*It has been shown that the  $\alpha$ -synuclein's N-terminal region plays an important role in the translocation of  $\alpha$ -synuclein through membrane, and when this region is altered, it is capable of forming the oligomeric aggregates. Although the exact pathogenic mechanism given by this protein in PD is not known, some evidence suggests that these aggregates may result in the formation of pores in the membranes of synaptic vesicles carrying the cell death. Other studies suggest that the aggregates could destabilize the membranes of these vesicles causing a permeability that result in the release of its contents. Still, no one knows for sure what happens with this protein, so if we intend to study the pathogenic mechanisms given by  $\alpha$ -synuclein that lead to dysregulation of dopamine release and cell death, it is first necessary have a standardized expression and purification of recombinant protein protocol that allows us to conduct such studies method. In this study, the expression and purification of human Wild Type  $\alpha$ -synuclein protein, like that with the change of tyrosine for tryptophan at position 39 recombinant is proposed.*

## I. INTRODUCCIÓN

### 1.1 La Enfermedad de Parkinson

La Enfermedad de Parkinson (EP), después de la Enfermedad de Alzheimer, es considerada la segunda causa de muerte celular por neurodegeneración en personas de entre los 40 y 70 años (Scott, 1961). La EP afecta aproximadamente al 1% de la población mayor de 50 años de edad (Kruger, 2004) y sus síntomas característicos son: un estado de temblor en reposo, rigidez e inestabilidad postural (**Figura 1**).

**Figura 1.** Postura característica de los pacientes con la Enfermedad de Parkinson.

La EP se caracteriza por la muerte progresiva de las neuronas dopaminérgicas en la *sustancia nigra pars compacta* (SNpc), lo que conlleva al agotamiento de la liberación y síntesis de la dopamina, que es esencial para el control del movimiento (Mercuri, 2005), y a la aparición de los síntomas no motores asociados a la degeneración de sistemas no dopaminérgicos (Obeso, 2010). El estudio de los mecanismos moleculares involucrados en el desarrollo de la enfermedad han permitido el reconocimiento de diferentes formas hereditarias de la EP. Hasta el momento se han identificado algunos genes que codifican para proteínas involucradas con alguna función relevante en el desarrollo de esta enfermedad, tal es el caso de los genes: 1) *snca*, que codifica para la  $\alpha$ -sinucleína; 2) *park2*, que codifica para la parkina; 3) *park7*, que codifica para la DJ-1;

4) *pink1* que codifica para la cinasa putativa 1 inducida por PTEN; y 5) *Lrrk2*, que codifica para la cinasa 2 rica en repetidos de leucina (Mandemakers, 2007).

## 1.2 Mecanismos Patogénicos

Desde el punto de vista fisiológico y morfológico, la Enfermedad de Parkinson se caracteriza por la degeneración y pérdida selectiva de neuronas dopaminérgicas de la SNpc (Smith, 2005) y la presencia de inclusiones citoplasmáticas llamadas Cuerpos de Lewy respectivamente. Los Cuerpos de Lewy están formados por ubiquitinas y fibrillas de la proteína  $\alpha$ -sinucleína mal plegada, los cuales también se han asociado a algunas enfermedades neurodegenerativas progresivas como la demencia de los Cuerpos de Lewy y la Enfermedad de Parkinson (**Figura 2**) (Soto, 2012).

**Figura 2.** Imagen histológica del cerebro de un paciente con EP donde se señalan los Cuerpos de Lewy presentes, estos compuestos en su mayoría por  $\alpha$ -sinucleína mal plegada (Auluck, 2010).

La  $\alpha$ -sinucleína al encontrarse sobre-expresada y/o con alguna mutación relevante es considerada tóxica, ya que adquiere la capacidad de formar agregados oligoméricos o bien, de anclarse a las bicapas lipídicas. Se ha descrito la similaridad de este comportamiento en pacientes con la EP con aquellos dados por las enfermedades causadas por priones, ya que la  $\alpha$ -sinucleína puede tomar también una conformación

de  $\beta$ -tira plegada favoreciendo la formación de fibrillas y agregados protéicos asociados a la neurodegeneración (**Figura 3**) (Olanow, 2013).

**Figura 3.** Imagen de una microscopía de la purificación de agregados protéicos de la proteína  $\alpha$ -sinucleína asociados a la neurodegeneración: **A)** oligómeros de la  $\alpha$ -sinucleína y **B)** fibrillas de la  $\alpha$ -sinucleína. (Bisaglia, 2009).

Algunas mutaciones en el gen de la  $\alpha$ -sinucleína resultan en un incremento en su afinidad por las membranas lipídicas, como los cambios de alanina por treonina en la posición 53 (A53T) y ácido glutámico por lisina en la posición 46 (E46K); mientras que la  $\alpha$ -sinucleína silvestre se cree que no tiene la capacidad de insertarse en la membrana lipídica, si no que únicamente interactúa por encima de ella. Cabe resaltar que la proteína que muestra el cambio del aminoácido de alanina por treonina en la posición 53 (A53T), al parecer, es capaz de insertarse en las membranas, lo que puede resultar en la desestabilización de las mismas y por ende en la muerte celular (Tsigelny, 2012). Para el caso de la mutación que conlleva al cambio de alanina por prolina en la posición del aminoácido 30 (A30P), solo se ha observado una reducción en la afinidad de la proteína por las membranas lipídicas (Bellucci, 2012).

### 1.3 Estructura de la $\alpha$ -sinucleína

La  $\alpha$ -sinucleína es una proteína constituida por 140 aminoácidos, con un peso molecular aproximado de 14.46 kDa y, en condiciones fisiológicas se encuentra de manera soluble (**Figura 4a**). La  $\alpha$ -sinucleína silvestre presenta una conformación desdoblada en el citoplasma, pero cuando interactúa con lípidos, adopta en el 70% de su extensión protéica una conformación de  $\alpha$ -hélice (Auluk 2010) (**Figura 4b**).

**Figura 4.** La  $\alpha$ -sinucleína puede cambiar su conformación al entrar en contacto con membranas lipídicas o vesículas. a) Representación de la proteína en su estado soluble con una conformación “libre” y b) Representación de la proteína en su estado de interacción con membranas lipídicas con un cambio en la estructura a  $\alpha$ -hélices. (Auluck, 2010)

En su estado nativo, la proteína contiene tres regiones importantes: 1) una región anfipática en el N-terminal, 2) una región central hidrofóbica NAC (Componente beta-no-amiloide, por sus siglas en inglés) y 3) una región C-terminal ácida, con carga negativa (**Figura 5**).

**Figura 5.** Representación gráfica de la estructura general de la  $\alpha$ -sinucleína y sus tres regiones importantes (Bisaglia, 2009 y Gallegos, 2015).

El extremo N-terminal de la  $\alpha$ -sinucleína incluye del aminoácido 1 al 60 y contiene una región de 11 repetidos de un péptido (KTKEGV) donde esta región forma un motivo tipo hexámero involucrado en la formación de estructuras  $\alpha$ -hélices anfipáticas, con

características similares a los dominios de unión a lípidos de las apolipoproteínas (Bellucci, 2012). Es precisamente esta región la que contiene los cambios de los aminoácidos A30P, E46K y A53T asociadas a casos de la EP familiar (Bisaglia, 2009 y Gallegos, 2015). La región central de la proteína abarca del aminoácido 61 al 95 y comprende una secuencia llamada componente-beta-no-amiloide (NAC) por su propensión a la formación de agregados. Esta porción central contiene dos motivos de  $\alpha$ -hélice y es la región más hidrofóbica de la  $\alpha$ -sinucleína por lo que está implicada en la agregación y la toxicidad de la proteína. Finalmente, la región C-terminal que va del aminoácido 96 al 140 tiene un carácter ácido, lo que impide su asociación con lípidos (Bonini, 2005). Además, contiene tres residuos conservados de tirosina, que al cambiar la región del gen que los codifica anula su capacidad de formar fibrillas (Gallegos, 2015)

**Figura 6.** La  $\alpha$ -sinucleína se localiza normalmente en las vesículas sinápticas en células dopaminérgicas sanas y se cree están involucradas en el tráfico vesicular (Auluk, 2010).

#### 1.4 Función de la $\alpha$ -sinucleína

Hasta el momento no se ha establecido una función precisa para la  $\alpha$ -sinucleína, pero su alta concentración en las terminales presinápticas y su asociación con las vesículas sinápticas (**Figura 6**), sugiere que está implicada en el reciclaje de las mismas y en la regulación de la sinapsis (**Figura 7**) (Yu, 2007 y Cheng, 2011). Esta idea se encuentra basada en que la  $\alpha$ -sinucleína es capaz de interactuar con las bicapas lipídicas de estas vesículas a través de la región N-terminal y logra interactuar con proteínas como las SNARE (del inglés *soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor*) y otras de la familia RAB (Proteínas Cerebrales Ras, por sus siglas en inglés),

todas ellas involucradas en la liberación de las vesículas; afectando así la distribución de neurotransmisores de las células dopaminérgicas (Lashuel, 2013).

Se piensa que la  $\alpha$ -sinucleína participa en el almacenamiento vesicular y la liberación de los neurotransmisores a través de la disminución de la fosforilación de la tirosina hidroxilasa, enzima involucrada en la síntesis de dopamina (Pérez, 2002). En cuanto a la participación de la proteína en el almacenamiento vesicular de los neurotransmisores, se ha observado que la  $\alpha$ -sinucleína interactúa con el transportador vesicular de monoamina 2 (VMAT2) y regula su actividad (Eiden, 2000). Varios experimentos demuestran que la sobreexpresión de la mutante A53T de esta proteína en células humanas MESC2.10 conlleva a la disminución de VMAT2 y por tanto a la consecuente acumulación de la dopamina en el citosol. También se ha observado que la sobreexpresión de la  $\alpha$ -sinucleína inhibe la actividad de VMAT2, interrumpiendo la homeostasis de la dopamina y originando el daño característico de las neuronas dopaminérgicas en la enfermedad de Parkinson (Guo, 2008).

**Figura 7.** Se ha demostrado que la  $\alpha$ -sinucleína podría estar involucrada en el tráfico vesicular y reciclaje de las vesículas sinápticas por medio de su interacción con estas vesículas y con la membrana plasmática de las terminales sinápticas (Auluk, 2010).

### **1.5 Disfunción de la $\alpha$ -sinucleína en la Enfermedad del Parkinson**

La  $\alpha$ -sinucleína pertenece a la familia de las proteínas flexibles, por lo que al darse la interacción entre la  $\alpha$ -sinucleína y la membrana lipídica de las vesículas sinápticas, la

región N-terminal adquiere una conformación de  $\alpha$ -hélice (Auluck, 2010). Cuando algunas mutaciones como la A53T o A30P se encuentran en la  $\alpha$ -sinucleína, se especula que su interacción con las bicapas lipídicas de las vesículas sinápticas altera la estructura de las mismas, provocando la liberación de dopamina al interior de la célula dopaminérgica. Aunque no se ha demostrado como se da este mecanismo, existen algunos modelos que lo proponen y se describen a continuación:

#### *Modelo Tipo Poro*

Se ha reportado que en las células dopaminérgicas, la  $\alpha$ -sinucleína A53T causa un aumento en la permeabilidad de la membrana plasmática, lo que conlleva a la posible formación de poros y como resultado, a la pérdida de la regulación de entrada y salida de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) (Ghio, 2015). Cabe mencionar que también se ha reportado una desestabilización de la estructura de  $\alpha$ -hélice en la región central de la proteína, cambiándola a  $\beta$ -tira plegada, lo que la vuelve tóxica. Esta nueva conformación permite su interacción con otras  $\alpha$ -sinucleínas para así formar oligómeros (Auluk, 2010) que, según el modelo computacional de Tsigelny, podrían llevarla a la formación de una estructura en forma de anillo en la membrana, lo que desencadenaría la generación de estos poros. Este modelo aún no ha sido bien demostrado *in vivo*, aunque en el 2012, utilizando microscopía electrónica, el mismo grupo de estudio de Tsigelny describió agregados oligoméricos de la  $\alpha$ -sinucleína formando protofibrillas anulares y tubulares con forma de poro en modelos de vesículas snápticas (**Figura 8**).

**Figura 8.** El modelo tipo poro se sobrepone en la fotografía de microscopía electrónica obtenida de una membrana lipídica sintética (Tsigenly, 2012).

### *Modelo de Desestabilización de Membrana*

Todas las membranas se encuentran compuestas principalmente por fosfolípidos, glucolípidos y colesterol (Nelson, 2009). En el caso de los estudios de interacción de la  $\alpha$ -sinucleína con las bicapas lipídicas, se requiere de la mimetización de membranas y vesículas sinápticas. Los lípidos más utilizados para estos estudios son: 1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-fosfatidilcolina (DOPC), 1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-fosfatidiletanolamina (DOPE), 1',3'-bis[1,2-dimiristoil-*sn*-glicero-3-fosfo]-*sn*-glicerol (DMPG), 1',3'-bis[1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-fosfo]-*sn*-glicerol (DOPG) y Colesterol (CH) (Stöckl, 2012); ya que permiten *in vitro* asemejar las condiciones de la membrana de las vesículas sinápticas. Estos estudios sugieren que la inserción de los oligómeros de  $\alpha$ -sinucleína provocan la desestabilización de la membrana en lugar de llevar a la formación de poros (**Figura 9**) (Stöckl, 2012). Se piensa que esta desestabilización de la membrana podría facilitar el transporte de pequeñas moléculas provocando la pérdida de la homeostasis (Nelson, 2009).

**Figura 9.** Microscopía de fluorescencia del trabajo realizado por van Rooijen *et. al.* 2010, donde se evalúa la interacción de la  $\alpha$ -sinucleína con modelos de vesículas sinápticas. Por medio de sondas (marcadas en **color verde**) colocadas al interior del modelo (marcado en **color rojo**), se observa que debido al efecto de la proteína de interés se libera el contenido a través de la membrana sin su rompimiento.

Si bien, aunque aún no se sabe cual de las dos anteriores teorías describe el mecanismo correcto por el cual se da la desestabilización de las membranas en las terminales sinápticas, ambas han abierto las puertas a estudios más detallados que pretenden describir la ruta por la cual se podría dar la permeabilización de la membrana que lleva a la degeneración neuronal.

En la Enfermedad de Parkinson, la estructura de la  $\alpha$ -sinucleína que se encuentra involucrada en la formación de fibrillas y su capacidad de interacción con las membranas, se ha hecho un blanco de estudio importante, ya que lo hace a las vesículas unilamelares que contienen fosfolípidos ácidos como fosfatidilserina y fosfatidilglicerol de carga negativa (Munishkina, 2007), tal como las vesículas sinápticas, y esta afinidad se ve incrementada por la presencia de los grupos acilos poliinsaturados y monoinsaturados (Kubo, 2005). Los modelos *in silico* sugieren que cuando la proteína se encuentra insertada en una membrana lipídica, los residuos de lisina (Lys) 21 y 23 se encuentran cercanos a los grupos  $\text{PO}_4^-$  de los fosfolípidos, formando puentes salinos; mientras que un residuo de Treonina (Thr) en la posición 22 se encuentra en el centro hidrofóbico de la bicapa. Se sugiere que el grupo hidroxilo de la Thr interactúa con los grupos carboxilo de las cadenas de acilos por medio de puentes de hidrógeno (Munishkina, 2007), pero no se tiene una idea muy clara de a qué nivel interactúa la proteína con los fosfolípidos de las membranas: A) superficial o B) por inserción entre los mismos (**Figura 10**). Además de los residuos mencionados, la  $\alpha$ -sinucleína contiene dos fenilalaninas (Phe) y cuatro tirosinas (Tyr) a lo largo de su estructura: Phe4 y Tyr39 que se encuentran en la región N-terminal, Phe94 al final de la región central y Tyr125, Tyr133 y Tyr136 al final de la región C-terminal (Dusa, 2006). Los datos sugieren que estos residuos le permite formar  $\alpha$ -hélices anfipáticas que facilitan su interacción con las membranas.

**Figura 10.** Representación gráfica de la posible interacción de la  $\alpha$ - sinucleína con la membrana lipídica, ya sea superficial (A) o por medio de su inserción entre los lípidos (B).

### 1.6 Interacción de $\alpha$ -sinucleína con membranas mitocondriales

Algunos estudios han demostrado que la  $\alpha$ -sinucleína no solo se encuentra localizada en las terminaciones presinápticas neuronales de las células

dopaminérgicas, si no también, en su estado monomérico, se puede localizar en las mitocondrias (**Figura 11**). La membrana mitocondrial, además de los componentes lipídicos básicos de una bicapa, contiene cardiolipina (CL), un fosfolípido aniónico con dos motivos de fosfatidilglicerol, lo que hace a esta membrana diferente al resto (Zigoneanu, 2012). Se ha demostrado que cuando la  $\alpha$ -sinucleína se encuentra sobre-expresada promueve: a) la liberación del citocromo C, b) el desacoplamiento del complejo I y c) la fusión de la membrana interna (Gallegos, 2015). Todos los eventos previamente descritos conllevan a un aumento del estrés oxidativo y por ende a la muerte celular (Zigoneanu, 2012). Los estudios de Zigoneanu *et. al.* indican que la  $\alpha$ -sinucleína tiene una afinidad importante por los componentes lipídicos de la membrana interna de la mitocondria, ya que contiene una concentración más alta de cardiolipina, en comparación con su membrana externa, lo que sugiere que esta característica permite una mejor interacción con la proteína. A pesar del posible rol de la  $\alpha$ -sinucleína en el daño a la mitocondria descrito por Gallegos *et. al.*, hasta la fecha hay pocos trabajo enfocados en el estudio de la interacción de la  $\alpha$ -sinucleína con las bicapas fosfolipídicas que asemejen a la composición de la membrana mitocondrial.

**Figura 11.** La  $\alpha$ -sinucleína se puede encontrar localizada también en la membrana mitocondrial. **A)**  $\alpha$ -sinucleína marcada (**color verde**) en la mitocondria de células HeLa, **B)** Membrana mitocondrial marcada (**color rojo**) y **C)** Empalme de imágenes (**color naranja**) (Zigoneanu, 2012).

### 1.7 Producción de la $\alpha$ -sinucleína recombinante

Existen diversos sistemas de producción de proteínas recombinantes que utilizan mecanismos celulares ya sean provenientes de eucariontes o procariontes (Structural Genomics Consortium *et. al.*, 2008). El uso de estos sistemas depende en gran manera de la proteína a producir. Los organismos más empleados para estos fines son las bacterias y las levaduras, debido a la simplicidad de sus sistemas biológicos y a que son capaces de acumular proteínas recombinantes en una proporción de hasta el 80% de su peso seco (Díaz, 2011). Las bacterias, principalmente la especie de *E. coli*, son utilizadas para producir proteínas de un tamaño relativamente pequeño (>60 kDa) y que no sufren de modificaciones postraduccionales. En cambio, los sistemas eucariontes como las levaduras, son utilizadas para la producción de proteínas de mayor tamaño o que proceden de organismos mucho más desarrollados y que incluyen modificaciones postraduccionales (Structural Genomics Consortium *et. al.*, 2008). El vector de expresión a utilizar dependerá del tipo de organismo que se pretende emplear para la producción de la proteína recombinante: la diferencia principal entre ellos es el sitio promotor y el origen de replicación del mismo, ya que estos deben ser específicos para cada tipo de organismo, ya sea procarionte o eucarionte. En el caso de las bacterias, los vectores expresión que contienen el promotor T7 son los más utilizados; mientras que para levaduras, son los vectores con el promotor AOX (Hwang, 2012). Para facilitar la purificación y la identificación de las proteínas recombinantes producidas en bacterias, normalmente se utilizan vectores que contienen etiquetas proteicas con capacidad de unión a un ligando específico, este método consiste principalmente en la producción de la proteína de interés fusionada a una proteína o péptido (GE Healthcare Life Sciences, 2014). Algunas de las etiquetas proteicas más utilizadas en la producción de proteínas recombinantes son la Proteína de Unión a Maltosa (MBP), del vector pMAL; la proteína GST, del vector pGEX; y un péptido compuesto por seis histidinas, del vector pPROEX; que tienen la capacidad de unirse de manera no covalente a maltosa, a glutatión y a níquel respectivamente (Terpe, 2002). Para el caso de la  $\alpha$ -sinucleína recombinante, se ha empleado su producción en *E. coli*, debido a la simplicidad de su sistema y el bajo peso molecular de la proteína. Uno de los métodos más reportados es haciendo uso del vector de expresión pGEX, que contiene la etiqueta de GST y un sitio de corte por trombina entre la etiqueta y el sitio de clonación (Saluta, 1998). El método consiste principalmente en clonar la secuencia codificante del

RNA<sub>m</sub> de la  $\alpha$ -sinucleína al sitio de clonación del vector de expresión pGEX de manera que quede en marco de lectura con respecto a la proteína GST; y así fusionar ambas secuencias nucleotídicas. La proteína GST fusionada a la  $\alpha$ -sinucleína se produce por la expresión regulada dada por el promotor *Lacl*, que es inducido por isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG), ya que este se une al represor *Lacl* removiéndolo de su región operadora y permitiendo así la transcripción y traducción del RNA<sub>m</sub> codificante para la proteína de fusión (Busby, 1999) . El uso de anticuerpos contra la etiqueta GST también permite la detección de la proteína de fusión; así como la recuperación de la misma haciendo uso del ligando acoplado a perlas de *Glutathion Sepharose* (Choi, 2002). Finalmente es posible eliminar la etiqueta de GST unida a la  $\alpha$ -sinucleína cortando con la proteasa trombina, que corta entre ambas proteínas. Choi *et. al.* describen que es posible obtener hasta un 80% de rendimiento final de la purificación de la  $\alpha$ -sinucleína por el método anteriormente descrito, y a partir de estos resultados es que esta estrategia ha sido ampliamente utilizada por diversos autores cuya finalidad es el estudio *in vitro* de la proteína  $\alpha$ -sinucleína: por ejemplo, Uversky (2005) lo usó para el estudio funcional de las posibles modificaciones postraduccionales que podría sufrir la proteína; Dusa, (2006) lo empleó para la caracterización de la formación de oligómeros de  $\alpha$ -sinucleína; y Fauvet, (2012) para el estudio de la toxicidad de la proteína en su forma monomérica por medio de su interacción con modelos de vesículas sinápticas. En todos estos casos, fue posible la expresión y purificación de la  $\alpha$ -sinucleína utilizando el vector de expresión pGEX.

## II. JUSTIFICACIÓN

La Enfermedad de Parkinson (EP) es una enfermedad neurodegenerativa y progresiva que afecta al 1% de la población mayor a los 50 años; se caracteriza por el daño progresivo de las neuronas dopaminérgicas en la *sustancia nigra pars compacta* (SNpc) y a la formación de agregados oligoméricos de la proteína  $\alpha$ -sinucleína llamados Cuerpos de Lewy. La  $\alpha$ -sinucleína se encuentra normalmente en mayor proporción en las terminaciones sinápticas de las neuronas dopaminérgicas y permiten el tráfico de las vesículas sinápticas por su capacidad de interacción con las membranas. Pero, aún se desconocen los mecanismos de desestabilización de las bicapas lipídicas dados por la  $\alpha$ -sinucleína en la Enfermedad de Parkinson.

Es por todo lo anterior que, si se pretenden estudiar los mecanismos patogénicos por los que se desarrolla la EP, surge la necesidad de producir en el laboratorio la proteína  $\alpha$ -sinucleína humana silvestre para caracterizarla y emplearla en estudios bioquímicos y celulares que nos permitan dilucidar su función, ya que obtenerla nativa a partir de pacientes no es posible.

## III. HIPÓTESIS

Es posible la expresión y purificación de las proteínas recombinantes  $\alpha$ -sinucleína humana silvestre y  $\alpha$ -sinucleína con el cambio de tirosina por triptófano en la posición 39 (Y39W).

## IV. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo General

Expresión y purificación de las proteínas recombinantes  $\alpha$ -sinucleína humana silvestre y  $\alpha$ -sinucleína modificada en la posición 39.

### 4.2 Objetivos Específicos:

1. Diseño de las secuencias sintéticas codificantes para las proteínas  $\alpha$ -sinucleína humana silvestre y  $\alpha$ -sinucleína con el cambio Y39W.
2. Subclonación de las secuencias de interés al vector de expresión.
3. Expresión y purificación de ambas proteínas recombinantes.

## V. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 OBTENCIÓN Y REDISEÑO DE LA SECUENCIA CODIFICANTE DE LA $\alpha$ -SINUCLÉINA HUMANA SILVESTRE Y DE LA $\alpha$ -SINUCLÉINA MODIFICADA EN LA POSICIÓN 39

La secuencia nucleotídica de la  $\alpha$ -sinucleína humana silvestre se obtuvo por medio del uso de la base de datos del GenBank del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Se tomó la secuencia codificante del RNAm maduro y se agregaron los sitios de restricción enzimática *Sma*I y *Xho*I a los extremos 5' y 3' respectivamente para su posterior clonación al vector de expresión pGEX 4T1. Así mismo se realizó el cambio del codón codificante para tirosina en la posición aminoacídica 39 por aquel que codifica para el triptófano y así generar la secuencia codificante para la  $\alpha$ -sinucleína con el cambio de tirosina por triptófano en la posición 39.

### 5.2 SÍNTESIS QUÍMICA DE LAS SECUENCIAS CODIFICANTES PARA LA $\alpha$ -SINUCLÉINA HUMANA SILVESTRE y LA $\alpha$ -SINUCLÉINA MODIFICADA EN LA POSICIÓN 39

Para la generación de las secuencias codificantes para la  $\alpha$ -sinucleína humana silvestre y la  $\alpha$ -sinucleína Y39W se utilizó el servicio de síntesis química de DNA dado por la compañía GenScript. La secuencia fue procesada para una mejor expresión en *E. coli* utilizando el servicio de optimización de la misma compañía, que hace uso de los codones preferenciales de este microorganismo respetando la secuencia aminoacídica de las proteínas una vez traducidas. Las secuencias enviadas por la compañía GenScript se encontraban clonadas en el vector pUC57 y en estado liofilizado. El DNA liofilizado (~4 $\mu$ g) fue rehidratado agregando 40  $\mu$ L de agua miliQ para llevarlo a una concentración de 100 ng/ $\mu$ L.

### 5.3 OBTENCIÓN DEL VECTOR DE EXPRESIÓN pGEX

Para llevar a cabo la expresión de la  $\alpha$ -sinucleína humana silvestre y la  $\alpha$ -sinucleína Y39W se utilizó el vector de expresión pGEX donado por el laboratorio de la Dra Rosaura Hernández del Departamento de Biomedicina Molecular del CINVESTAV-Zacatenco. Este vector contiene la etiqueta protéica de GST, que permite la producción de una proteína de fusión entre la etiqueta de GST y una proteína de interés para su

purificación por cromatografía de afinidad. Se transformaron bacterias *E. coli* Top10 con este plásmido a una concentración de 50 ng/ $\mu$ L con la finalidad de obtener un mayor número de copias y así poder trabajar con ellos en el laboratorio (sección 5.5) después de su extracción (sección 5.6). Los vectores fueron almacenados a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

#### **5.4 PREPARACIÓN DE LAS CÉLULAS CALCIO COMPETENTES TOP10, DH5 $\alpha$ Y BL21**

Para la preparación de las células calcio competentes se siguieron las recomendaciones dadas por Tu *et. al.*. Para esto, se inoculó una colonia de células *E. coli* de la cepa de DH5 $\alpha$ , una de Top10 y una de BL21 en 3 tubos de ensayo independientes conteniendo 3 mL de medio de LB sin antibiótico y se dejó incubando a  $37^{\circ}\text{C}$  durante toda la noche con una agitación constante de 180 rpm. Al día siguiente se tomó una proporción 1/100 del volumen total de estas células y se transfirió a 3 matraces independientes conteniendo 100 mL de medio LB cada uno y se mantuvieron en agitación constante de 180 rpm a  $37^{\circ}\text{C}$  hasta alcanzar una  $\text{DO}_{600}$  0.375 ( $\sim 5 \times 10^8$  cel/mL). Posteriormente se enfriaron los cultivos en hielo por 5 minutos y se centrifugaron 8 minutos a  $1,700 \times g$   $4^{\circ}\text{C}$  en tubos falcon de 50 mL. Luego se resuspendieron las pastillas con vórtex en 20 mL de cloruro de calcio 0.1 M pre-enfriado en hielo y se incubaron a  $4^{\circ}\text{C}$  por 30 min. Los tubos falcon se centrifugaron nuevamente por 8 minutos a  $1,700 \times g$  a  $4^{\circ}\text{C}$  y se dejaron reposar en hielo. Finalmente se resuspendieron las pastillas utilizando una micropipeta de  $1,000 \mu\text{L}$  en 4 mL de cloruro de calcio a 0.1 M previamente enfriado en hielo y se almacenaron en hielo. La eficiencia de las células fue probada utilizando un plásmido control, y una vez observando colonias positivas para este plásmido, estas fueron utilizadas para su transformación con los plásmidos conteniendo a las secuencias sintéticas y el vector de expresión pGEX.

#### **5.5 TRANSFORMACIÓN DE LAS CÉLULAS *E. coli* TOP10 CON LAS SECUENCIAS SINTÉTICAS Y EL VECTOR DE EXPRESIÓN pGEX POR CHOQUE TÉRMICO**

Una vez rehidratadas las construcciones sintéticas en el plásmido pUC57 enviadas por la compañía GenScript, se transformaron células *E. coli* Top10 con estos plásmidos y con el vector pGEX con la finalidad de obtener una mayor cantidad de estos. Para esto, se tomó un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL pre-enfriado y se agregaron  $50 \mu\text{L}$  de

bacterias calcio competentes, esto manteniéndolas en hielo a 4°C. Se agregaron 2 µL de DNA a una concentración de 50 ng/µL y se mezclaron dando unos ligeros golpecitos entre los tubos. Se dejó reposar en hielo de 20 a 30 minutos y se dio el choque térmico sumergiendo los tubos de microcentrífuga de 1.5 en un vaso de precipitado con agua corriente a una temperatura de 42°C por 1 minuto. Posteriormente se agregaron 200 µL de medio LB y se incubaron a 37°C de 20 a 30 minutos. Finalmente se cultivaron en cajas de Petri conteniendo medio LB con ampicilina a una concentración final de 0.1 µg/µL dejándolos en incubación a 37°C toda la noche (*JoVE Science Education Database*, 2006).

## 5.6 PURIFICACIÓN DE LOS PLÁSMIDOS

Se tomó una la colonia de las bacterias conteniendo a los plásmidos de interés y se sembraron en tubos de ensayo conteniendo 3 mL de medio LB con ampicilina a una concentración final de 0.1 µg/µL y se dejaron incubando toda la noche a 37°C en agitación constante de 180 rppm. Al día siguiente, se tomaron 1.5 mL de los cultivo de bacterias a tubos de microcentrífuga de 1.5 mL y se centrifugaron a 14,000 rpm por 30 seg. Se desechó el sobrenadante de cada tubo y se agregaron 200 µL de Solución I (Tris HCl 25 mM pH 8 y EDTA 25 mM pH 8) y se mezcló con vórtex. Se mantuvo a temperatura ambiente por 5 minutos y se agregaron 200 µL de Solución II (NaOH 500 mM y SDS 10%) y se mezcló por inversión. Se mantuvo a temperatura ambiente por 5 minutos y se agregaron 200 µL de Solución III (C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>KO<sub>2</sub> 1M y CH<sub>3</sub>COOH 10%) y se mezcló por inversión. Se dejó en hielo por 10 min y posteriormente se centrifugó a 14,000 rpm por 5 minutos. Se pasó el sobrenadante a un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL limpio conteniendo 1 mL de etanol al 100% haciendo uso de una puntilla y teniendo cuidado de no pasar ningún precipitado. Se incubó a -20°C por 10 min y se centrifugó a 14,000 rpm por 10 min. Se desechó el sobrenadante y se agregaron 200 µL de etanol al 70%; se dio vórtex unos segundos. Se centrifugo nuevamente a 14,000 rpm por 5 min y se desechó el sobrenadante con una puntilla. Finalmente se dejó secar la pastilla a 37°C por 5 min en la incubadora y se agregaron 20 µL de Agua miliQ con RNasa (10 ng/µL); se resuspendió la pastilla por vórtex. Para verificar que las extracciones se realizaron de la manera correcta, se corrieron 3 µL de cada muestra en un gel de agarosa al 0.8% y se almacenaron a 4°C (Stadler, 2004).

## 5.7 LIBERACIÓN DE LAS CONSTRUCCIONES SINTÉTICAS A PARTIR DE pUC57

Para llevar a cabo la liberación de los fragmentos correspondientes a las construcciones sintéticas conteniendo a las secuencias codificantes para las proteínas  $\alpha$ -sinucleína humana silvestre y  $\alpha$ -sinucleína con el cambio Y39W a partir del plásmido pUC57, se siguieron las recomendaciones dadas por la casa comercial PROMEGA (Madison WI, USA). Para esto, se realizaron ensayos de restricción independientes con las enzimas *Sma*I y *Xho*I de esta misma casa comercial. Primeramente los DNAs plasmídicos pUC57 con las construcciones sintéticas se digirieron con la enzima *Xho*I, para esto se tomaron 500 ng del vector en la mezcla de reacción conteniendo 2  $\mu$ L de *buffer* D 10X de PROMEGA, 0.5  $\mu$ L de la enzima *Xho*I 10 u/ $\mu$ L y 12.5  $\mu$ L de agua miliQ para completar un volumen final de 20  $\mu$ L de reacción. La reacción se incubó a 37°C por 2 hr y se corrió en un gel de electroforesis al 2% para verificar la linearización de los plásmidos. Posteriormente se purificaron los DNAs haciendo uso del kit QIAquick PCR Purification Kit (Cat. No. 28106) de QIAGEN: Se tomaron 5 volúmenes de *buffer* PB por cada 1 volumen de DNA y se mezclaron en un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL. Posteriormente se agregaron a las columnas contenidas en el kit para unir el DNA a la matriz de la misma. Se centrifugó a 13,500 rpm por 60 seg y se desechó el eluyente recolectado. Se realizaron 2 lavados con 0.75 mL de *buffer* PE agregándolos a la columna y centrifugando a 13,500 rpm por 60 seg para posteriormente desechar el eluyente recolectado. Se centrifugó a 13,500 rpm por 2 min para secar los restos del *buffer* y se eluyó el DNA en un tubo nuevo de microcentrífuga de 1.5 mL agregando 30  $\mu$ L de agua miliQ. Para esto, primeramente se agregaron los 30  $\mu$ L de agua miliQ a la columna y se dejaron reposar por 1 min, posteriormente se centrifugaron por 60 seg a 13,500 rpm. Finalmente, estos plásmidos linearizados con la enzima *Xho*I y purificados se llevaron a digerir con *Sma*I, para esto se tomaron 15  $\mu$ L de purificación (200 ng aprox.) en la mezcla de reacción conteniendo 2  $\mu$ L de *buffer* J 10X de PROMEGA, 0.5  $\mu$ L de la enzima *Sma*I 10 u/ $\mu$ L, 0.3 de BSA y 2.2  $\mu$ L de agua miliQ para completar un volumen final de 20  $\mu$ L de reacción. La reacción se incubó a 25°C por 2 hr y se corrió en un gel de electroforesis al 2% para verificar la liberación de los fragmentos.

## 5.8 PURIFICACIÓN DE DNA A PARTIR DE GEL DE AGAROSA

Los fragmentos liberados conteniendo a las construcciones sintéticas codificantes para las proteínas  $\alpha$ -sinucleína humana silvestre y  $\alpha$ -sinucleína con el cambio Y39W en el

plásmido pUC57, fueron purificados a partir del gel de agarosa en donde se corrieron. Para esto se hizo uso del kit QUIAEX II Gel Extraction Kit (Cat. No. 20051) de QIAGEN. Con un bisturí limpio se cortó la fracción del gel de agarosa que contenía la banda correspondiente a las construcciones sintéticas liberadas por las digestiones con las enzimas *Sma*I y *Xho*I. Se colocó el fragmento a un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL y se pesó en una báscula analítica. Se tomaron 300  $\mu$ L de *buffer* QX1 por cada 100 mg de gel de agarosa conteniendo el DNA, se calentó a 50°C por 10 min agregando previamente 10  $\mu$ L de perlas QIAEX II y se dio vórtex cada 2 min para mantener a las perlas en suspensión. Una vez que la agarosa se derritió completamente, se centrifugó la muestra por 30 seg para recuperar las perlas y se desechó el sobrenadante con mucho cuidado haciendo uso de una micropipeta de 200  $\mu$ L. La pastilla se lavó agregando 500  $\mu$ L de *buffer* QX1 dando vórtex y centrifugando 30 seg; posteriormente se lavó 2 veces con 500  $\mu$ L de *buffer* PE igualmente dando dando vórtex y centrifugando 30 seg. Se retiró todo el sobrenadante con una micropipeta de 200  $\mu$ L y se dejó secar la pastilla por 5 min hasta que se tornó de color blanco. Finalmente se agregaron 20  $\mu$ L de agua miliQ para eluir el DNA a partir de las perlas. Se centrifugó por 30 seg para así transferir el sobrenadante a un nuevo tubo de microcentrífuga de 1.5 mL y almacenarlo a -20°C.

## 5.9 PREPARACIÓN DEL VECTOR pGEX PARA LA SUBCLONACIÓN

En la preparación del vector de expresión pGEX para la posterior ligación de los fragmentos liberados conteniendo las construcciones sintéticas se realizaron ensayos de restricción independientes con las enzimas *Sma*I y *Xho*I de PROMEGA (Madison WI, USA). Primeramente el DNA plasmídico se digirió con la enzima *Xho*I, para esto se tomaron 500 ng del vector en la mezcla de reacción conteniendo 2  $\mu$ L de *buffer* D 10X de PROMEGA, 0.5  $\mu$ L de la enzima *Xho*I 10 u/ $\mu$ L y 12.5  $\mu$ L de agua miliQ para completar un volumen final de 20  $\mu$ L de reacción. Se incubó a 37°C por 2 hr y posteriormente se purificó el plásmido haciendo uso del kit *QIAquick PCR Purification Kit* (Cat. No. 28106). Posteriormente, los plásmidos se cortaron con la enzima *Sma*I, para esto se tomaron 15  $\mu$ L de purificación (200 ng aprox) en la mezcla de reacción conteniendo 2  $\mu$ L de *buffer* J 10X de PROMEGA, 0.5  $\mu$ L de la enzima *Sma*I 10 u/ $\mu$ L, 0.3 de BSA y 2.2  $\mu$ L de agua miliQ para completar un volumen final de 20  $\mu$ L de reacción.

La reacción se incubó a 25°C por 2 hr y se corrió en un gel de electroforesis al 2% para verificar que el corte se realizó de manera correcta.

### **5.10 LIGACIÓN DE LAS CONSTRUCCIONES SINTÉTICAS AL VECTOR DE EXPRESIÓN pGEX**

Para la ligación de los fragmentos liberados conteniendo a las secuencias sintéticas codificantes para las proteínas  $\alpha$ -sinucleína humana y  $\alpha$ -sinucleína con el cambio Y39W al vector de expresión pGEX previamente digeridos con las enzimas *SmaI* y *XhoI*, se realizó la mezcla de reacción que se muestra en la **Tabla 1** siguiendo las recomendaciones de la casa comercial PROMEGA. La reacción de ligación se incubó a 25°C toda la noche y se almacenó a 4°C.

**Tabla 1.** Reactivos y concentraciones utilizadas para realizar la ligación entre pGEX y los fragmentos sintéticos conteniendo a las secuencias codificantes las proteínas  $\alpha$ -sinucleína humana silvestre y  $\alpha$ -sinucleína con el cambio Y39W.

### **5.11 PCR DE COLONIA**

Una vez llevada a cabo la ligación de los fragmentos, se prosiguió a la transformación de células *E. coli* DH5 $\alpha$  con la misma. A partir de las células transformadas se

seleccionaron 10 colonias al azar para cada una de las dos ligaciones (5 de pGEX+ $\alpha$ -sinucleína huamana silvestre y 5 de pGEX+ $\alpha$ -sinucleína Y39W) y se les realizó un ensayo de PCR de colonia utilizando *primers* específicos para el vector pGEX que flanqueaban el sitio de clonación. La secuencia correspondiente al *primer Forward* utilizado fue 5'-GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG - 3' y para el caso del *primer Reverse* fue 5' - CCGGGAGCTGCATGTGTGTCAGAGG - 3'. Se realizó la mezcla de reacción de PCR como se muestra en la **Tabla 2** a un volumen final de 10  $\mu$ L y haciendo uso de los reactivos del *QIAGEN PCR Cloning Plus Kit* (Cat. No. 231224) corriendo la reacción según el protocolo que se muestra en la **Tabla 3** en un termociclador BioRad T100 System. Finalmente se corrieron las muestras en un gel de agarosa al 2% para verificar el tamaño del producto de PCR esperado. Posteriormente, el producto de PCR se mandó a secuenciar por el método de Sanger para verificar la integridad de la secuencia y que no haya habido un corrimiento en el marco de lectura o la generación de un codón de paro no deseado.

**Tabla 2.** Reactivos y concentraciones de la PCR de colonia

**Tabla 3.** Protocolo de la PCR para la programación del termociclador BioRad T-100 System.

## 5.12 ENSAYO DE INDUCCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE FUSIÓN GST- $\alpha$ -SINUCLEÍNA HUMANA SILVESTRE Y GST- $\alpha$ -SINUCLEÍNA Y39W

Una vez verificado que las células contenían a las ligaciones pGEX+ $\alpha$ -sinucleína huamana silvestre y pGEX+ $\alpha$ -sinucleína Y39W y se verificara la integración de la

secuencia por secuenciación, se prosiguió a realizar los ensayos de inducción de las proteínas de fusión GST- $\alpha$ -sinucleína humana silvestre y GST- $\alpha$ -sinucleína Y39W. Para esto se transformaron células *E. coli* DH5 $\alpha$  y BL21 con los plásmidos pGEX+ $\alpha$ -sinucleína humana silvestre y pGEX+ $\alpha$ -sinucleína Y39W. Se tomó una colonia de cada cepa a partir de las cajas de *Petri* y se crecieron en un tubo conteniendo 5 mL de medio LB y una concentración final de ampicilina de 0.1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  por toda la noche a 37°C con agitación constante de 180 rpm. Se tomaron los 5 mL de cultivo crecido y se inocularon en un matrás conteniendo 100 mL de medio LB a una concentración final de ampicilina de 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  por 1 hr a 37°C con una agitación constante de 250 rpm. Pasada 1h, se tomó 1 mL del cultivo y se centrifugó por 20 min, se desechó el sobrenadante y se congeló la pastilla para un ensayo posterior de SDS-PAGE. El resto del cultivo se indujo con IPTG de abcam Biochemicals ab142072 a una concentración final de 1 mM por 3 hr a 37°C con una agitación constante de 250 rpm. Se tomó 1 mL del cultivo inducido y se centrifugó 20 min a 13,500 rpm y se desechó el sobrenadante. Se agregaron 100  $\mu\text{L}$  de *buffer* PBS 1x (140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> / pH 7.3 0.5 mg/ml) y 50  $\mu\text{L}$  del reactivo Laemmli (1M tris pH6.8, SDS 10%, 2-mercapto, glicerol) 2x. Se calentaron las pastillas a 90°C por 5 min y se centrifugaron a 13,500 rpm 1 min. Finalmente se corrieron 5  $\mu\text{L}$  de muestra en un gel de SDS-PAGE. El resto del cultivo se congeló para la posterior purificación de la proteína. (GE Healthcare Life Sciences, 2014)

### 5.13 SDS-PAGE

La preparación y corrimiento de los geles de SDS-PAGE consistieron en lo siguiente: Primeramente se limpiaron los vidrios a utilizar con etanol al 70% y se fijaron a la cámara de electroforesis. Se realizó la preparación de agarosa para vertirla por debajo de los vidrios y de esta manera sellarlos y evitar que salieran las soluciones. Se prepararon las soluciones concentradoras al 4% y separadoras al 12% como se muestra en la **Tabla 4**. Primeramente se agregó la solución separadora a los vidrios fijos y posteriormente la solución concentradora. Finalmente se colocaron los peines y se dejó polimerizar por 20 min. Una vez gelificada la poliacrilamida, se prosiguió a cargar las muestras en los pocillos creados por los peines utilizados y se vertió el *buffer* de corrida de SDS-PAGE (glicina, TRIS, SDS 10%) 1x. Finalmente se corrieron a 100 volteos y a 140 mA por 2 hr 40 min. Transcurrido el tiempo y que el marcador haya

estado bien separado, se desmontó el gel de la cámara de electroforesis y se tiñó con azul de coomassie por 15 min y se destiñó con solución desteñidora durante toda la noche. (Sambrook, 2006)

**Tabla 4.** Reactivos y concentraciones utilizadas para la preparación del gel SDS-PAGE al 12%

#### **5.14 ENSAYO DE WESTERN BLOT**

Con la finalidad de identificar a la proteína de fusión producida en el sistema bacteriano, se realizó la inmunodetección de la misma por medio de un ensayo de *Western Blot*, utilizando un anticuerpo monoclonal contra la etiqueta de GST de SIGMA Aldrich producido en rata (SAB4200055). Para esto, primeramente se corrieron las muestras en un gel SDS-PAGE partiendo el gel en dos de manera que cada mitad del gel contuviera las mismas muestras. Una vez corridas las muestras, se partió el gel por la mitad utilizando un regla y se removieron los restos de azul de coomassie para evitar manchar la nitrocelulosa. Una mitad se tiñó con azul de coomassie mientras que la otra mitad se continuó con la transferencia de las muestras a la membrana de nitrocelulosa. Para realizar la transferencia de las muestras del gel de SDS-PAGE a la membrana de nitrocelulosa y el posterior ensayo de *Western Blot*, se armó el sandwich de transferencia colocando la membrana de nitrocelulosa hacia el polo positivo (+) de la cámara de transferencia y el gel hacia el lado negativo (-) de la misma. En general, los componentes del sandwich se colocaron en el siguiente orden: Polo negativo (-) Esponja + 2 papel filtro + gel de poliacrilamida + membrana de nitrocelulosa + 2 papel filtro + Esponja (+) Polo positivo. Posteriormente se colocó el *buffer* de transferencia (metanol 20% Tris y glicina) en la cámara de transferencia y se corrió a 90 volts por 1 hr

y 20 min. Para evitar que el *buffer* se calentara, se colocó un gel frío en la cámara de transferencia. Finalmente se removieron los componentes del sandwich y se obtuvo la nitrocelulosa. Para verificar que la transferencia se dio de la manera correcta, se tiñó con rojo de ponceau al 0.5% en ácido acético al 2% por 5 min a temperatura ambiente con agitación constante. Para desteñir se agregó agua corriente en agitación constante. Se continuó con el ensayo de *Western Blot* bloqueando primeramente la membrana agregando una solución de TBS-Tween de SIGMA Aldrich al 2% con leche al 5% durante 1 hr a temperatura ambiente y con rotación constante. Posteriormente se tomaron 7.5  $\mu$ L del anticuerpo monoclonal contra GST de SIGMA Aldrich (dilución 1:10) y se diluyó en 5 mL de TBS-Tween 0.1% con leche al 2% (a una dilución 1:1000) y se incubó la membrana toda la noche a 4°C en rotación constante. Al siguiente día, se lavó tres veces durante 10 min en rotación constante con TBS-Tween 0.1% y leche al 2% y se incubó la membrana con el anticuerpo secundario anti-rata de SIGMA Aldrich diluido (1:1000) en TBS-Tween 0.1% leche 2% por 2 hr a temperatura ambiente con agitación constante. Posteriormente se lavó la membrana tres veces durante 10 min en rotación con TBS-Tween 0.1% y se secó sobre un pedazo de papel. Finalmente se agregaron 300  $\mu$ L de la solución cromogénica (NBT/BCIP 0.1 mg/mL de abcam ab7468) sobre la membrana y se incubó de 5 a 10 min hasta aparecer una tinción azul-morada sobre el papel. Para realizar los lavados, se agregaron 10 mL de agua de la llave y se enjuagó 3 veces. (Sambrook, 2006)

#### **5.15 ACOPLAMIENTO DE LAS PROTEÍNAS DE FUSIÓN GST- $\alpha$ -SINUCLEÍNA HUMANA SILVESTRE Y GST- $\alpha$ -SINUCLEÍNA Y39W A LAS PERLAS DE GLUTATION SEPHAROSE**

Para llevar a cabo el acoplamiento de las proteínas de fusión GST- $\alpha$ -sinucleína humana silvestre y GST- $\alpha$ -sinucleína Y39W a las perlas de *Glutathione Sepharose* se hizo uso de los protocolos y reactivos del *Glutathione Sepharose 4B Batch Protocol* de GE Healthcare. Primeramente se centrifugaron 100 mL de un cultivo inducido en un tubo falcon de 50 mL a 5,500 rpm por 10 min y se desechó el sobrenadante. Este proceso se realizó dos veces con la finalidad de abarcar los 100 mL de cultivo. Posteriormente se tomó la pastilla y se resuspendió con vórtex en 10 mL de PBS (140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> / pH 7.3 0.5 mg/ml) conteniendo lisozima a una concentración final 100  $\mu$ g/mL e inhibidores de proteasas 1x final y se agregaron 200

$\mu\text{L}$  de Tritón-X100-PBS al 10% (1% final). La mezcla se incubó durante 15 min a  $4^{\circ}\text{C}$  y luego se sonicó en 5 pulsos de 50% por 50 seg con 1min de descanso entre cada pulso hasta que el sobrenadante se tornó transparente. Se centrifugó el lisado a 5,500 rpm por 20 min a  $4^{\circ}\text{C}$  y se pasó el sobrenadante a un tubo falcon de 15 mL estéril y se agregaron 200  $\mu\text{L}$  de Tritón-x100-PBS para una concentración final de 3%. Se agregó 1mL de medio preparado de perlas de *Glutation Sepharose* al 50% (1/3 parte perlas y 2/3 partes de buffer PBS) y se incubaron toda la noche a  $4^{\circ}\text{C}$  en agitación constante. Al día siguiente, se centrifugó a 500 xg por 5 min y se removió el sobrenadante para su análisis por SDS-PAGE (tomando 100  $\mu\text{L}$  del sobrenadante y agregando 25  $\mu\text{L}$  de buffer Laemmli 2x). Se realizaron 3 lavados a las perlas agregando 1 mL de PBS 1X frío y mezclando por inversión por 3 min cada uno y se centrifugó a 500 xg por 5 min desechando el sobrenadante. Finalmente se agregó 1 mL de PBS 1X frío y se mezcló por inversión. Las perlas se corrieron en un gel de SDS-PAGE tomando 100  $\mu\text{L}$  de perlas y agregando 50  $\mu\text{L}$  de buffer Laemmli 2X para verificar el acoplamiento.

#### **5.16 CORTE ESPECÍFICO DE LAS PROTEÍNAS DE FUSIÓN GST- $\alpha$ -SINUCLÉINA HUMANA SILVESTRE Y GST- $\alpha$ -SINUCLÉINA Y39W CON TROMBINA**

Una vez obtenidos las pastillas de perlas de *Glutation Sepharose* a las que se encuentran adheridas las proteínas de fusión GST- $\alpha$ -sinucleína humana silvestre y GST- $\alpha$ -sinucleína Y39W, se les agregó la enzima trombina, que es una proteasa que corta entre la GST y las  $\alpha$ -sinucleínas. Para esto, se preparó la solución de corte diluyendo 50  $\mu\text{L}$  del stock de trombina en 950  $\mu\text{L}$  de buffer PBS a pH 7.3 estéril (dilución 1:10); por cada 200  $\mu\text{L}$  de perlas en los tubos falcon de 15 mL, se agregaron 200  $\mu\text{L}$  de la solución de corte (relación 1:1). Se dejaron incubando a  $22^{\circ}\text{C}$  por toda la noche. Posteriormente se centrifugó la muestra a 500 g por 5 min y se recuperó el sobrenadante en un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL. Posteriormente se tomaron 20  $\mu\text{L}$  del sobrenadante y se agregaron 5  $\mu\text{L}$  de buffer Laemmli 2x y se corrieron en un gel de SDS-PAGE para verificar la proteólisis de las proteínas de fusión. (GE Healthcare Life Sciences, 2014)

## VI. RESULTADOS

### 6.1 DISEÑO DE LAS SECUENCIAS SINTÉTICAS CODIFICANTES PARA LAS PROTEÍNAS $\alpha$ -SINUCLÉINA HUMANA SILVESTRE Y $\alpha$ -SINUCLÉINA Y39W

La secuencia nucleotídica del gen *snca* que codifica para la proteína  $\alpha$ -sinucleína humana silvestre se encontró en la base de datos del GenBank del NCBI bajo el número de acceso 6622 con una longitud de 618,281 pb. Este gen contiene 14 exones, por lo que la secuencia del RNAm maduro se encontró bajo el número de acceso CCDS3634.1 con una longitud de 423 pb (incluyendo su codón de paro) que codifican para una proteína de 140 aminoácidos. En la **Figura 12** se puede observar el procedimiento general para la obtención de la secuencia del RNAm que codifica para la proteína  $\alpha$ -sinucleína humana silvestre.

**Figura 12.** Obtención de la secuencia nucleotídica del gen *snca* que codifica para la  $\alpha$ -sinucleína humana silvestre. Posteriormente de la secuencia del RNAm maduro sin intrones que codifica para la proteína  $\alpha$ -sinucleína humana silvestre.

Una vez obtenida la secuencia nucleotídica codificante del RNAm de la  $\alpha$ -sinucleína humana silvestre, se identificó el codón que codifica para la tirosina de la posición 39. Al identificar el codón codificante para la tirosina (TAT), este fue sustituido por el codón que codifica para el triptófano (TGG), generando así dos secuencias: una que codifica para la proteína  $\alpha$ -sinucleína humana silvestre, manteniendo el codón original TAT

correspondiente a una tirosina en la posición 39 (a la que llamamos **WT**) y una secuencia codificante para la  $\alpha$ -sinucleína con el cambio de tirosina por triptófano en la posición 39 con el codón TGG (a la que llamamos **YW**) (**Figura 13**).

**Figura 13.** Secuencia codificante de la  $\alpha$ -sinucleína humana silvestre (**izquierda**) con el cambio de los nucleótidos TAT en las posiciones 108, 109 y 110 por los nucleótidos TGG para la generación del nuevo codón de la secuencia codificante de la  $\alpha$ -sinucleína Y39W (**derecha**). Ambos codones se encuentran marcados en **color rojo**.

Con la intención de identificar a las enzimas de restricción que nos permitieran realizar la subclonación al vector de expresión, se realizó un análisis *in silico* de la secuencia blanco haciendo uso de la herramienta bioinformática NEBcutter de New England BioLabs tomando en cuenta las secuencias de corte del sitio multiple de clonación del vector de expresión. En la **Figura 14** se muestran las secuencias codificantes para la  $\alpha$ -sinucleína humana silvestre y la  $\alpha$ -sinucleína Y39W a las que se agregaron los sitios de restricción *SmaI* y *XhoI* a los extremos 5' y 3' respectivamente para ambas secuencias. En color rojo se muestran los nucleótidos añadidos para evitar el corrimiento del marco de lectura al subclonar la secuencia al vector de expresión.

**Figura 14.** Secuencias codificantes resultantes para la  $\alpha$ -sinucleína humana silvestre y la  $\alpha$ -sinucleína Y39W después de agregar los sitios de restricción para las enzimas *SmaI* y *XhoI*.

Ambas secuencias fueron optimizadas para la producción de las proteínas recombinantes en el sistema bacteriano de *E. coli*. En la **Figura 15a** se muestran las secuencias codificantes originales y optimizadas para este microorganismo que corresponden a la  $\alpha$ -sinucleína humana silvestre y la  $\alpha$ -sinucleína Y39W. Igualmente se confirmó que los cambios realizados en la secuencia después de la optimización no generaban alguna diferencia entre la secuencia de los aminoácidos de las proteínas resultantes y la secuencia original (**Figura 15b**).

**Figura 15. a)** Se muestran las secuencias nucleotídicas codificantes de las proteínas antes (**rojo**) y después (**negro**) de ser optimizadas para *E. coli*; así como **b)** las secuencias de los aminoácidos resultantes de las proteínas recombinantes.

Finalmente, la compañía GenScript envió las construcciones sintéticas clonadas en el vector pUC57.

## 6.2 SUBCLONACIÓN DE LAS SECUENCIAS CODIFICANTES DE LAS PROTEÍNAS $\alpha$ -SINUCLEÍNA HUMANA SILVESTRE Y $\alpha$ -SINUCLEÍNA CON EL CAMBIO Y39W AL VECTOR DE EXPRESIÓN

El vector de expresión seleccionado de entre las tres opciones que presenta pGEX para la producción de las proteínas fue el pGEX 4T1 (**Figura 16a**) debido a que en esta versión no se modifica el marco de lectura de las proteínas esperadas. Ambas proteínas de fusión están compuestas por 371 aminoácidos con un peso molecular aproximado de 41 kDa (**Figura 16b**).

**Figura 16.** a) Vector pGEX 4T1 seleccionado y los sitios de restricción para la subclonación de las secuencias fueron *Sma*I y *Xho*I. b) Secuencia aminoacídica de la proteína de fusión GST- $\alpha$ -sinucleína humana silvestre.

Con la finalidad de obtener una mayor concentración de los plásmidos pUC57 conteniendo a las construcciones sintéticas WT y YW, así como con el vector de expresión pGEX, estos se transformaron en células *E. coli* Top10. Posteriormente, se seleccionaron 3 colonias de cada transformación exitosa crecida en placa de agar y se realizó el cultivo masivo en líquido para la extracción de los plásmidos. El resultado se observa en la **Figura 17**, donde se muestra un gel de agarosa de los plásmidos pUC57+ $\alpha$ -sinucleína, pUC57+ $\alpha$ -sinucleína Y39W y del vector pGEX, todos representados en sus tres conformaciones.

**Figura 17.** Gel de agarosa al 0.8% teñido con bromuro de etidio de la extracción de los plásmidos pUC57+ $\alpha$ -sinucleína humana silvestre en los carriles **WT1** y **WT2**; pUC57+ $\alpha$ -sinucleína Y39W en los carriles **YW1** y **YW2**; y del vector pGEX en sus tres conformaciones características dentro de los carriles **pGEX**: circular abierto, lineal y superenrollado.

Cada uno de los plásmidos obtenidos se cortaron primeramente con la enzima *SmaI* para el extremo 5' del sitio de clonación, con lo cual se logró la linearización de los mismos (**Figura 18b**). En la **Figura 18a** se muestra la linearización de los plásmidos pUC57+ $\alpha$ -sinucleína humana silvestre y 39 YW con sus pesos moleculares de 3,141 pb; igualmente el vector pGEX a la altura de las 4,968 pb. En la **Figura 18b** se representa de manera gráfica la linearización de los plásmidos al ser digeridos con la enzima *SmaI* y el tamaño esperado. Estos productos de digestión correspondieron a sus tamaños esperados con respecto al marcador molecular utilizado.

**Figura 18. a)** Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio de la linearización de los plásmidos pUC57+ $\alpha$ -sinucleína humana silvestre en el carril **WT** y 39 YW en el carril **YW** con sus respectivos pesos moleculares de 3,141 pb cada uno; igualmente el vector pGEX se presenta a la altura de las 4,968 pb en el carril **pGEX**. **b)** Representación gráfica de la linearización de los plásmidos al ser digeridos con la enzima *SmaI* y el tamaño esperado.

Posteriormente se realizó la segunda digestión con la enzima *XhoI* para el extremo 3' del sitio de clonación para los plásmidos pUC57+WT y pUC57+YW. Con esto se logró liberar los insertos de 430 pb correspondientes al tamaño de los fragmentos sintéticos WT y YW (**Figura 19b**), por lo que se puede decir que se dio la liberación correcta de los fragmentos de interés. En la **Figura 19a** se muestra por medio de un gel de agarosa la liberación de las construcciones sintéticas a partir del plásmido pUC57 a la altura de las 430 pb; igualmente se muestra el resultado de la preparación del vector pGEX, donde no se observaron fragmentos liberados en el gel debido a su tamaño de 10 pb, sin embargo se observa el plásmido linearizado.

**Figura 19. a)** Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio de la liberación de las construcciones sintéticas WT y YW a partir del plásmido pUC57 (**últimos dos carriles**), así como de la preparación del vector pGEX (carriles **pGEX**). **b)** Representación gráfica de la liberación de los fragmentos a partir de los plásmidos al ser digeridos con la enzima *XhoI* y su tamaño esperado.

Una vez liberados los fragmentos, se limpiaron y ligaron de manera independiente al vector de expresión abierto pGEX 4T1 y se transformaron en células *E. coli* Top10. Se seleccionaron al azar 10 colonias para la ligación pGEX+WT y 10 para la ligación pGEX+YW a las que se les realizó PCR de colonia para verificar que la transformación de la cepa se llevó a cabo.

En la **Figura 20** se muestra un fragmento de la secuencia del vector de expresión pGEX con una de las construcciones sintéticas en su interior, en donde se observa la posición que tendrían las construcciones sintéticas de ser ligadas de manera correcta (**color azul**). Se observa de **color negro** la secuencia donde hibridarían los *primers* comerciales utilizados.

**Figura 20.** Fragmento del vector de expresión pGEX que muestra las regiones donde se unen los *primers* de **color negro** y la secuencia correspondiente a las construcciones sintéticas WT y YW de **color azul** (se usa la misma secuencia, ya que solo difieren en un codón y no afecta su tamaño esperado). De **color verde** se muestra el codon de inicio del marco de lectura abierto de la GST.

En la **Figura 21** se puede observar el producto de PCR obtenido a partir de una colonia por cada ligación (una para pGEX+WT y otra para pGEX+YW) y el producto obtenido al realizar la reacción únicamente con el vector pGEX (sin las secuencias correspondientes a las construcciones sintéticas). Igualmente el producto de PCR obtenido para el caso de pGEX+WT y pGEX+YW fue de 593 pb, que corresponde al tamaño esperado. Para el caso del vector de expresión pGEX vacío, se obtuvo un producto de PCR de 173 pb.

**Figura 21.** Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio de los productos amplificados representativos de PCR de colonia para pGEX+WT y otra para pGEX+YW en la altura de los 593 pb esperados (carriles **YW** y **WT**), así como el producto dado para el caso del vector de expresión pGEX vacío, que corresponde a los 173 pb (carril **pGEX**).

Para verificar la integridad de la secuencias dentro de los vectores pGEX, los plásmidos pGEX+WT y pGEX+YW se secuenciaron por el método de Sanger. El resultado obtenido se muestra en la **Figura 22a**, donde se observa una porción de la secuencia codificante para la  $\alpha$ -sinucleína humana silvestre alineada con el resultado de secuenciación para esta misma secuencia. El resultado indica que no hubo un cambio en la secuencia nucleotídica ni un corrimiento en el marco de lectura abierto, y que igualmente no se observó la generación de algún codón de paro prematuro. En la **Figura 22b** se puede observar también una porción de la secuencia codificante para la  $\alpha$ -sinucleína humana silvestre alineada con el resultado de secuenciación para la  $\alpha$ -sinucleína Y39W. Este resultado demostró que efectivamente se mantuvo el cambio del codón TAT por TGG para esta secuencia modificada.

**Figura 22. a)** Porción de la secuencia codificante para la  $\alpha$ -sinucleína humana silvestre (Seq\_1) de **color celeste** alineada con el resultado de secuenciación para esta misma secuencia (Seq\_2, de **color negro**). De **color amarillo** se observa la secuencia codificante de la proteína GST. **b)** Porción de la secuencia codificante para la  $\alpha$ -sinucleína humana silvestre (Seq\_1) de **color celeste**, pero en este caso, alineada con el resultado de secuenciación para la  $\alpha$ -sinucleína Y39W (Seq\_2, de **color negro**), donde se muestra en un **recuadro rojo**

### **6.3 EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE FUSIÓN GST- $\alpha$ -SINUCLÉINA HUMANA SILVESTRE Y GST- $\alpha$ -SINUCLÉINA CON EL CAMBIO Y39W**

Se realizó la inducción de los cultivos celulares conteniendo pGEX+WT y pGEX+YW tanto en cepas DH5 $\alpha$  como en BL21 de *E. coli* siguiendo las recomendaciones publicadas por Burré *et. al.*, donde una vez alcanzada la DO600 de 0.5-0.7 se agregó el

isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración final de 0.05 mM durante 3 horas a 37°C, con agitación constante. El resultado obtenido se muestra en la **Figura 23**, donde se observa la inducción por IPTG de la producción de las proteínas de fusión GST- $\alpha$ -sinucleína humana silvestre y GST- $\alpha$ -sinucleína Y39W en células *E. coli* DH5 $\alpha$  y BL21. Igualmente se muestra la producción correspondiente a la proteína GST. Este resultado indicó que no hubo cambio en los patrones de bandeo a la altura de los 41 kDa esperados.

**Figura 23.** Gel de SDS-PAGE al 12% teñido con azul de coomassie de la inducción por IPTG de la producción de las proteínas de fusión GST- $\alpha$ -sinucleína humana silvestre (carriles **WTs**) y GST- $\alpha$ -sinucleína Y39W (carriles **YWs**) en células *E. coli* DH5 $\alpha$  y BL21, así como de la producción correspondiente a la proteína GST (carriles **GST**).

Por tal motivo, se prosiguió a la adecuación de las condiciones para la producción de las proteínas de fusión GST- $\alpha$ -sinucleína humana silvestre y GST- $\alpha$ -sinucleína Y39W, para lo cual se probaron: 1) dos puntos de inicio de inducción (con respecto a la fase sublogarítmica del crecimiento celular), 2) tres diferentes concentraciones de IPTG, 3) dos condiciones de temperatura, y 4) dos tiempos de inducción, todo lo anterior, tanto para las cepas de *E. coli* DH5 $\alpha$  como para la BL21 (**Tabla 5**).

**Tabla 5.** Se muestran las condiciones probadas para estandarizar la producción de las proteínas de fusión GST- $\alpha$ -sinucleína humana silvestre y GST- $\alpha$ -sinucleína Y39W. Se variaron las cepas utilizadas, la densidad óptica al iniciar la inducción, la concentración de IPTG, la temperatura y el tiempo de inducción.

De todas éstas pruebas, las condiciones en las que se observó un resultado favorable fueron las siguientes: células *E. coli* BL21, con un inicio de inducción a una DO<sub>600 nm</sub> de 0.5, IPTG a una concentración de 1 mM durante 3 horas (en agitación constante de 250 rpm) y a una temperatura de 37°C. En la **Figura 24** se observa que hubo una diferencia en el patrón de bandeo dado por los cultivos inducidos conteniendo los plásmidos pGEX+WT y pGEX+YW a la altura de los 36 kDa que corresponderían a las proteínas de fusión GST- $\alpha$ -sinucleína humana silvestre y GST- $\alpha$ -sinucleína Y39W respectivamente; con respecto al vector de expresión pGEX vacío (control), solo se observó un banda más intensa a la altura de los 26 kDa correspondiente a la GST (carril **GST**).

**Figura 24.** Gel de SDS-PAGE al 12% teñido con azul de coomassie donde se muestra la diferencia en el patrón de bandeo dado por los cultivos inducidos conteniendo los plásmidos pGEX+WT y pGEX+YW (carriles **WT1** y **WT2**) a la altura de los 36 kDa; y el vector pGEX vacío (carril GST) a los 26 kDa.

Haciendo uso del software ImageLab de BioRad, se verificó que las bandas con mayor intensidad pertenecían a un peso molecular de 36 kDa, y para corroborar que correspondían a las proteínas de fusión GST- $\alpha$ -sinucleína humana silvestre y GST- $\alpha$ -sinucleína Y39W se realizó un ensayo de *Western Blot* utilizando un anticuerpo monoclonal específico contra GST de SIGMA Aldrich. En la **Figura 25** se muestra el resultado de este ensayo: Se corrieron los cultivos celulares inducidos con IPTG que contenían a los plásmidos pGEX+WT, pGEX+YW y pGEX vacío. Lo que se pudo observar es que efectivamente el anticuerpo se unió a las proteínas de fusión GST- $\alpha$ -sinucleína humana silvestre y GST- $\alpha$ -sinucleína Y39W a la altura de los 36 kDa, así como a la proteína GST a la altura de los 26 kDa

**Figura 25.** *Western Blot* de los cultivos celulares inducidos con IPTG que contenían a los plásmidos pGEX+WT (carriles **WT1** y **WT2**), pGEX+YW (carriles **YW1** y **YW2**) y pGEX vacío (carril **GST**).

#### **6.4 PURIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS $\alpha$ -SINUCLÉINA HUMANA SILVESTRE Y $\alpha$ -SINUCLÉINA CON EL CAMBIO Y39W**

Una vez inducidas las proteínas de fusión, la bacterias se sometieron a un proceso de lisis para tener acceso a las proteínas totales las cuales, posteriormente, se pusieron en contacto con perlas de *Glutathion Sepharose* para lograr acoplar unicamente aquellas que tienen el ligando de interacción. En la **Figura 26** se observan los extractos protéicos totales de los cultivos celulares inducidos con IPTG conteniendo los plásmidos pGEX+WT, pGEX+YW y pGEX vacío. Por medio de las bandas correspondientes a las proteínas de fusión acopladas a las perlas de *Glutathion Sepharose* a la altura de los 36 kDa para los casos de YW y WT y a la altura de los 26 kDa para el caso de la GST, se mostró la unión específica de las proteínas de fusión en el peso esperado, así como la proteína control.

**Figura 26.** Gel de SDS-PAGE al 12% teñido con azul de coomassie de los extractos protéicos totales de los cultivos celulares inducidos con IPTG conteniendo los plásmidos pGEX+WT (**WT**), pGEX+YW (**YW**) y pGEX vacío (**GST**) en los carriles Ind, así como las bandas correspondientes a las proteínas de fusión y GST acopladas a las perlas de *Glutation Sepharose* en los carriles **Perl**.

Finalmente, para lograr la purificación de la  $\alpha$ -sinucleína humana silvestre y  $\alpha$ -sinucleína Y39W, las perlas de *Glutation Sepharose* con las proteínas de fusión acopladas se sometieron a un corte específico, haciendo uso de la proteasa trombina, entre la etiqueta de GST y la secuencia aminoacídica de interés. Esta estrategia nos permitió dejar acoplado el *tag* de GST a las perlas de *Glutation Sepharose*, mientras que en el sobrenadante, solo a las proteínas recombinantes correspondientes a la  $\alpha$ -sinucleína humana silvestre y a la  $\alpha$ -sinucleína Y39W. El resultado obtenido se muestra en la **Figura 27**, donde se observan los extractos protéicos totales de los cultivos celulares inducidos con IPTG conteniendo los plásmidos pGEX+WT (**WT**) y pGEX+YW (**YW**), así como las bandas correspondientes a las proteínas de fusión purificadas a partir de las perlas de *Glutation Sepharose* para los casos de YW y WT antes y después del corte

con trombina. Se muestran también las bandas correspondientes a las proteínas  $\alpha$ -sinucleína humana silvestre y a la  $\alpha$ -sinucleína Y39W purificadas. Estos resultados indican la liberación de los péptidos correspondientes a la  $\alpha$ -sinucleína humana silvestre y a la  $\alpha$ -sinucleína Y39W a la altura de los 14 kDa partir de las proteínas de fusión; dejando a la GST adherida a las perlas de *Glutathion Sepharose*.

**Figura 27.** Gel de SDS-PAGE al 12% teñido con azul de coomassie de los extractos protéicos totales de los cultivos celulares inducidos con IPTG conteniendo los plásmidos pGEX+WT (**WT**) y pGEX+YW (**YW**) en los carriles **Ind**. Igualmente se observan las bandas correspondientes a las proteínas de fusión acopladas a las perlas de *Glutathion Sepharose* a la altura de los 36 kDa para los casos de YW y WT antes del corte con trombina (carriles de **Perlas -Trombina**) y después del corte con trombina (carriles de **Perlas +Trombina**). Finalmente se observan las bandas correspondientes a las proteínas de la  $\alpha$ -sinucleína humana silvestre y la  $\alpha$ -sinucleína Y39W a una altura aproximada de los 14 kDa en los carriles correspondientes a los sobrenadantes resultantes después del corte con trombina (carriles **Sbn**).

## VII. DISCUSION

En la actualidad, diversos estudios han tratado de demostrar los mecanismos patogénicos por los cuales la proteína  $\alpha$ -sinucleína se ve involucrada en el desarrollo de la EP de una persona. Estas investigaciones se han centrado en dilucidar la función que tiene esta proteína dentro de las células dopaminérgicas, ya que es capaz de interactuar con las bicapas lipídicas de las vesículas sinápticas y se encarga de la regulación de la liberación de la dopamina. En la EP se ha visto que esta proteína podría estar sobreexpresada o mutada en su región N-terminal, razones que podrían ser las causantes de la alteración en su interacción con las membranas que, junto con la formación de los cuerpos de Lewy, llevarían a la muerte de las neuronas dopaminérgicas y por ende al desarrollo de la enfermedad. Por esta razón, en este trabajo se pretende generar una herramienta básica que permita utilizar a la  $\alpha$ -sinucleína en estudios de función como pueden ser: la dinámica de polimerización de monómeros, la formación de inclusiones, el tipo de interacción y/o desestabilización de bicapas lipídicas, etc. ya que logrando la expresión y purificación de esta proteína, se contaría con el principal recurso de estudio.

Es por esto que, el objetivo de este trabajo es generar un sistema de producción de una  $\alpha$ -sinucleína humana silvestre y una  $\alpha$ -sinucleína con un triptófano en la posición aminoacídica 39 en lugar de la tirosina. Grupos de trabajo como Choi, *et. al.* Uversky, *et. al.*, Dusa, *et. al.* y Fauvet, *et. al.* han utilizado de manera efectiva un sistema de producción de esta proteína en el sistema bacteriano de *E. coli* haciendo uso del vector de expresión pGEX, que consiste en la producción de la proteína fusionada a la etiqueta GST para su posterior identificación y purificación. El uso de este método se describe en muchos casos como una herramienta que induce a niveles muy altos la expresión de la proteína de interés debido a la presencia del promotor *tac* bajo la inducción con IPTG (Harper, 2011), que en nuestro resultado preliminar de la producción de GST en un gel de SDS-PAGE, mostró que esta se observó a una altura de los 26 kDa al menos a una intensidad mayor aproximada del 40% con respecto al control no inducido bajo las condiciones descritas por Jaqueline Burré. Sin embargo, al escalar estas condiciones a la producción de las proteínas de fusión GST- $\alpha$ -sinucleína humana silvestre y GST- $\alpha$ -sinucleína Y39W, no se observó un resultado favorable (**Figura 23**). Rosano y Ceccarelli (2014) describen que la producción de la proteína Lac

permeasa, que permite la entrada de IPTG al citoplasma de la célula, es muy heterogénea y varía en número para cada célula, por lo que un incremento en la concentración de IPTG a utilizar podría mejorar la expresión de las proteínas. Igualmente Saluta (1998) describe que la inducción a una DO600 celular baja, de aproximadamente 0.5, aumenta el rendimiento de producción sinificativamente. Estos datos coincidieron con el resultado obtenido después de la omptimización de las condiciones de expresión de las proteínas de fusión, donde se observó un aumento en la producción de las mismas a la altura de los 36 kDa (**Figura 24**). El uso de las células de *E. coli* de la cepa BL21 fue primordial para esta optimización, ya que según Grodberg *et. al.* (1988) esta cepa no contiene los genes *OmpT* y *Lon* que codifican para proteasas en el sistema natural de *E. coli*, evitando así una disminución en la producción total de las proteínas recombinantes. En el caso de la posible degradación de las proteínas en producción, esta depende de la temperatura y el tiempo de inducción utilizados. En nuestro caso el resultado fue variado, ya que según Herper *et. al.*, a una temperatura de 37°C existe una muy alta probabilidad de perder hasta el 50% de la producción de las proteínas de interés debido a su degradación a comparación de que si esta es de 30°C. En este ensayo, la temperatura a la que mejor se realizó la inducción de las proteínas de fusión fue de 37°C y no de 30°C. Los tiempos de inducción deben ser de igual manera relativamente cortos para evitar la degradación de las proteínas (Rosano, 2014), esto coincidió con nuestro resultado, ya que en un tiempo de inducción mayor de 3 horas no se observó la producción de la proteína. Cabe mencionar que estas condiciones de optimización coincidieron en su mayoría con las descritas por los autores Fauvet, *et. al.*, Choi, *et. al.* y Feng, *et al.*, que también produjeron a la  $\alpha$ -sinucleína fusionada a GST en sistemas bacterianos de *E. coli* haciendo uso del vector pGEX.

Para verificar la producción de las proteínas se realizó un ensayo tipo *Western Blot* con un anticuerpo monoclonal contra GST. El resultado obtenido demostró que las bandas proteicas con mayor intensidad a la altura de los 36 kDa observadas en la **Figura 24** corresponden a las proteínas de fusión GST- $\alpha$ -sinucleína humana silvestre y GST- $\alpha$ -sinucleína Y39W respectivamente; sin embargo, esto no coincidía con el peso teórico calculado de 41 kDa. Según Rath *et. al.*, las proteínas que tienen la capacidad de interacción con lípidos de carga negativa, podrían aparecer en geles de SDS-PAGE en

pesos moleculares por debajo de su peso teórico. Esto se puede deber a que el ambiente hidrofóbico dado por el SDS es similar al ambiente en el que se encuentran esas proteínas de manera natural, haciéndolas tomar (en una parte de su extensión protéica) una conformación de  $\alpha$ -hélice, lo que provoca una migración más rápida en el gel. Adicional a este evento, Uversky *et. al.* describen que los pHs ácidos y las bajas temperaturas son condiciones importantes para el plegamiento de la  $\alpha$ -sinucleína en contacto con lípidos de carga negativa (como el SDS), por lo que probablemente también podrían influir en la migración de la proteína en este gel. Según Rath, *et. al.* estos resultados son muy comunes para las proteínas que son capaces de interactuar con bicapas fosfolipídicas, por lo que esto podría explicar el fenómeno de identificación de las proteínas de fusión a un peso molecular por debajo de su peso teórico.

Para los ensayos de acoplamiento de las proteínas de fusión a las perlas de *Glutathion Sepharose*, se siguieron las recomendaciones del fabricante de los vectores, donde se indica que la eficiencia de la purificación depende de la cantidad de perlas a utilizar con respecto a la cantidad de proteína producida por las bacterias. Por medio del software de ImageLab de Biorad se pudo identificar en base a la intensidad de las bandas en los geles de SDS-PAGE que se logró recuperar al menos el 70% de las proteínas de fusión producidas por *E. coli* (**Figura 26**) por medio de su acoplamiento a las perlas de *Glutathion Sepharose* con respecto a las bandas obtenidas según la inducción de los cultivos celulares con IPTG. Haneskog *et. al.* exponen que el rendimiento del acoplamiento de las proteínas de fusión a GST a las perlas de *Glutathion Sepharose* es normalmente del 80%, por lo que podemos decir que nuestras condiciones permitieron obtener un resultado fue muy favorable, ya que se contaba con una cantidad visible en un gel de SDS-PAGE de las proteínas de fusión teñido con coomassie, y como el límite de detección del reactivo azul de coomassie es de 100 ng (Sambrook, 2006), se pudo identificar al menos 1  $\mu$ g de proteína en el gel.

Choi, *et. al.* (2002) describe que en su sistema de producción de  $\alpha$ -sinucleína en *E. coli* obtenía un rendimiento de purificación final de la proteína del 80%. En nuestro caso, se observó un rendimiento de purificación menor al 30%, ya que según el resultado (**Figura 27**) del corte con trombina, fue posible identificar poco menos de la mitad de las proteínas con respecto a las bandas correspondientes a las proteínas de fusión

acopladas a las perlas. Probablemente esto se debe a las condiciones no desnaturizantes en las que se encuentran las proteínas de fusión en su acoplamiento con las perlas, ya que estas condiciones podrían ocasionar que el sitio de corte de la trombina entre GST y las  $\alpha$ -sinucleínas se encuentre de cierta manera oculto en el plegamiento de la proteína GST disminuyendo significativamente la eficiencia de corte. Algunos protocolos de corte con trombina como el descrito por SIGMA-ALDRICH en su *Thrombin CleanCleave Kit*, sugieren el uso de condiciones semi-desnaturizantes agregando urea a la reacción para aumentar el rendimiento en cuanto a su corte con trombina. Otra razón podría ser que la enzima no reconozca de manera eficiente su sitio de corte, ya que autores como Harmer y Pandey (2014) exponen que es un problema muy común al momento de cortar con esta proteasa. Aun así, el resultado indica que el corte de las proteínas  $\alpha$ -sinucleína humana silvestre y  $\alpha$ -sinucleína Y39W que se encontraban fusionadas a GST se llevó a cabo de la manera correcta, pero no con la eficiencia que se esperaba.

## VIII. CONCLUSIONES

- Fué posible la subclonación las secuencias sintéticas codificantes de las proteínas  $\alpha$ -sinucleína humana silvestre y  $\alpha$ -sinucleína con el cambio Y39W al vector de expresión pGEX4T1.
- Se estandarizó la expresión de las proteínas recombinantes  $\alpha$ -sinucleína humana silvestre y  $\alpha$ -sinucleína Y39W fusionadas a GST en células *E. coli* BL21.
- Se logró la recuperación de las proteínas de fusión GST- $\alpha$ -sinucleína humana silvestre y GST-  $\alpha$ -sinucleína Y39W por cromatografía de afinidad por medio del acoplamiento a perlas de *Glutation Sepharose*.
- Se alcanzo una eficiencia máxima de purificación, a través del corte de la etiqueta de afinidad de GST con trombina, de aproximadamente un 30%.

## IX. PERSPECTIVAS

La baja eficiencia de purificación de las proteínas  $\alpha$ -sinucleína humana silvestre y  $\alpha$ -sinucleína Y39W después del corte con trombina nos motiva a optimizar las condiciones de corte de manera que ésta se eleve de forma significativa. Sin embargo, no descartamos el uso de algún otro método de expresión y purificación de proteínas recombinantes como el uso de los vectores pPROEX, que contiene la etiqueta de purificación por histidinas, ya que esta etiqueta es más pequeña a comparación de la de GST y esto podría permitir una mejor eficiencia en el corte de la etiqueta y su purificación. Igualmente después de la purificación efectiva de las proteínas, se podrían caracterizar estructuralmente por medio de la técnica del dicroísmo circular y funcionalmente por medio de su interacción con modelos de vesículas sinápticas mediante la técnica de espectroscopía de fluorescencia. Una vez obteniendo a las proteínas recombinantes bien caracterizadas, también será posible realizar estudios de interacción de la  $\alpha$ -sinucleína con modelos tanto de vesículas sinápticas como de membranas mitocondriales, de manera que sea posible profundizar en los mecanismos patogénicos aún desconocidos en los que esta proteína se encuentra involucrada en el desarrollo de la Enfermedad de Parkinson y describir cual de los modelos de desestabilización de la membrana de las vesículas sinápticas es el que podría provocar la liberación de la dopamina al interior de las neuronas dopaminérgicas.

## X. BIBLIOGRAFÍA

1. Auluck, Pavan K., Gabriela Caraveo, and Susan Lindquist. (2010).  $\alpha$ -Synuclein: Membrane Interactions and Toxicity in Parkinson's Disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 26:211–33. doi: 10.1146/annurev.cellbio.042308.113313
2. Adrien W. Schmid, Bruno Fauvet, Marc Moniatte y Hilal A. Lashuel. Alpha-synuclein Post-translational Modifications as Potential Biomarkers for Parkinson Disease and Other Synucleinopathies. *Molecular & Cellular Proteomics* 12: 10.1074/mcp.R113.032730, 3543–3558, 2013. DOI 10.1074/mcp.R113.032730
3. Ausubel, F. M. *Current Protocols in Molecular Biology*. Vol 2, 16.0.1 (1996)
4. Bellucci, Arianna, Michela Zaltieri, Laura Navarra, Jessica Grigoletto, Cristina Missale, PierFranco Spano (2012). From  $\alpha$ -synuclein to synaptic dysfunctions: New insights into the pathophysiology of Parkinson's disease. *Brain Research* 1476:183–202. doi:10.1016/j.brainres.2012.04.014
5. Bisaglia, M., Mammi, S., and Bubacco, L. (2009). Structural insights on physiological functions and pathological effects of alpha-synuclein. *FASEB J.* 23, 329–340. doi: 10.1096/fj.08-119784
6. Bonini NM, Giasson BI. (2005). Snaring the function of alpha-synuclein. *Cell.* 2005 Nov 4;123(3):359-61. doi:10.1016/j.cell.2005.10.017
7. Burré, Jacqueline, Manu Sharma y Thomas C. Südhof. Systematic Mutagenesis of  $\alpha$ -Synuclein Reveals Distinct Sequence Requirements for Physiological and Pathological Activities. *J Neurosci.* 2012 October 24; 32(43): 15227–15242. doi:10.1523/JNEUROSCI.354z-12.2012.
8. Busby S., Ebright RH. (2001). "Transcription activation by catabolite activator protein (CAP)". *J. Mol. Biol.* 293: 199–213. doi:10.1006/jmbi.1999.3161
9. Cheng, L., Locke, C., Davis, G.W. (2011). S6 kinase localizes to the presynaptic active zone and functions with PDK1 to control synapse development. *J. Cell Biol.* 194(6): 921–935. doi: 10.1083/jcb.201101042
10. Choi, Ju-Youn, Young-Mo Sung, Hyo-Jin Park, Eun-Hye Hur, Sun-Joo Lee. (2002). Rapid purification and analysis of  $\alpha$ -synuclein proteins: C-terminal truncation promotes the conversion of  $\alpha$ -synuclein into a protease-sensitive form in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 36, 33–40.

11. Choi, Bong-Kyu, Mal-Gi Choi, Jae-Yeol Kim. Large  $\alpha$ -synuclein oligomers inhibit neuronal SNARE-mediated vesicle docking. PNAS. 2013.Vol. 110. No. 10. 4087–4092. doi: 10.1073/pnas.1218424110
12. Dusa, Alexandra, Joanna Kaylor, Shauna Edridge, Nika Bodner, Dong-Pyo Hong, and Anthony L. Fink. (2006). Characterization of Oligomers during R-Synuclein Aggregation Using Intrinsic Tryptophan Fluorescence. Biochemistry. 45, 2752-2760. doi: 10.1021/bi051426z.
13. Eiden, L. E. (2000) The vesicular neurotransmitter transporters: current perspectives and future prospects. FASEB J. 14,2396-2400
14. Ellis, C. E., Schwartzberg, P. L., Grider, T. L., Fink, D. W., Nussbaum, R. L. (2001) alpha-synuclein is phosphorylated by members of the Src family of protein-tyrosine kinases. J. Biol. Chem. 276,3879-3884
15. Fauvet, Bruno, *et. al.* Alpha-Synuclein in Central Nervous System and from Erythrocytes, Mammalian Cells, and *Escherichia coli* Exists Predominantly as Disordered Monomer. The Journal of Biological Chemistry. Vol.287, No.19, pp. 15345-15364. 2012. doi: 10.1074/jbc.M111.318949
16. Feng, L. R., Federoff, H. J., Vicini, S., and Maguire-Zeiss, K. A. (2010). Alpha-synuclein mediates alterations in membrane conductance: a potential role for alpha-synuclein oligomers in cell vulnerability. Eur. J. Neurosci. 32, 10–17. doi: 10.1111/j.1460-9568.2010.07266.x
17. Gallegos S, Pacheco C, Peters C, Opazo CM and Aguayo LG. (2015). Features of alpha-synuclein that could explain the progression and irreversibility of Parkinson's disease. Front. Neurosci. 9:59. doi: 10.3389/fnins.2015.00059
18. Ghio, Stephanie, Frits Kamp, Ruben Cauchi, Armin Giese, Neville Vassallo. Interaction of  $\alpha$ -synuclein with biomembranes in Parkinson's disease —role of cardiolipin. Progress in Lipid Research 61 (2016) 73–82. doi:10.1016/j.plipres.2015.10.005
19. Hanahan, D. (1983). "Studies on the transformation of *Escherichia coli* with plasmids". J. Mol. Biol. 166 (4): 557–580. doi:10.1016/S0022-2836(83)80284-8.
20. Harper, Sandra y David W. Speicher. Expression and purification of GST fusion proteins. Curr Protoc Protein Sci. 2008 May;Chapter 6:Unit 6.6. doi: 10.1002/0471140864.ps0606s52.

21. Harper, Sandra y David W. Speicher. Purification of proteins fused to glutathione S-transferase. *Methods Mol Biol.* 2011; 681: 259-280. doi: 10.1007/978-1-60761-913-0\_14
22. Hwang PM, Pan JS y Sykes BD. Targeted expression, purification, and cleavage of fusion proteins from inclusion bodies in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* 2014; 588(2):247-52. doi: 10.1016/j.febslet.2013.09.028.
23. JoVE Science Education Database. Basic Methods in Cellular and Molecular Biology. Bacterial Transformation: The Heat Shock Method. JoVE, Cambridge, MA, doi: 10.3791/5059 (2016).
24. Kruger R, Kuhn W, Muller T, Woitalla D, Graeber M, Kosel S, Przuntek H, Eppelen JT, Schols L, Riess O. (1998). Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Nat Genet.* 18:106-108.
25. Kubo S., V.M. Nemani, R.J. Chalkley, M.D. Anthony, N. Hattori, Y. Mizuno, R.H. Edwards, D.L. Fortin. (2005). A combinatorial code for the interaction of alpha-synuclein with membranes, *J. Biol. Chem.* 280:31664–31672.
26. Lashuel, H. A., Overk, C. R., Oueslati, A., and Masliah, E. (2013). The many faces of  $\alpha$ -synuclein: from structure and toxicity to therapeutic target. *Nat. Rev. Neurosci.* 14, 38–48. doi: 10.1038/nrn3406
27. Lashuel, Hilal A., Benjamin M. Petre, Joseph Wall, Martha Simon, Richard J. Nowak, Thomas Walz, Peter T. Lansbury Jr.(2002).  $\alpha$ -Synuclein, Especially the Parkinson's Disease-associated Mutants, Forms Pore-like Annular and Tubular Protofibrils. *Journal of Molecular Biology.* Vol.322, Issue 5. pp.1089-1102. doi:10.1016/S0022-2836(02)00735-0
28. Lakowicz, Protein fluorescence, Principles of fluorescence spectroscopy, Springer, New York, 2006, pp. 529–575.
29. Mandemakers, Wim, Vanessa A. Morais and Bart De Strooper. (2007). A cell biological perspective on mitochondrial dysfunction in Parkinson disease and other neurodegenerative diseases. *Journal of Cell Science* 120, 1707-1716. doi:10.1242/jcs.03443
30. Michaelson, Yechezkel Barenholz, Asymmetry of lipid organization in cholinergic synaptic vesicle membranes, *Biochem. J.* 211 (1983) 155–162.

31. Munishkina, Larissa A., Anthony L. Fink. (2007). Fluorescence as a method to reveal structures and membrane-interactions of amyloidogenic proteins. *Biochimica et Biophysica Acta* 1768:1862–1885. doi:10.1016/j.bbamem.2007.03.015.
32. Nakamura, K., Kubo, S., Anthony, M.D., and Edwards, R.H. (2011). Lipid rafts mediate the synaptic localization of a-synuclein. *J. Neurosci.*, 24, 6715–6723.
33. Nelson, DL and Cox, M.M. (2009). *Lehninger Principles of Biochemistry*. 5<sup>a</sup> ed. Freeman. Caps 10, 11.
34. Olanow, C. Warren and Patrik Brundin. (2013). Parkinson's Disease and Alpha Synuclein: Is Parkinson's Disease a Prion-Like Disorder? *Movement Disorders* 28:1. doi: 10.1002/mds.25373.
35. Perez RG, Waymire JC, Lin E, Liu JJ, Guo F, Zigmond MJ. (2002). A role for alpha-synuclein in the regulation of dopamine biosynthesis. *J Neurosci*. Apr 15;22(8):3090-9.
36. Parihar, M.S., Parihar, A., Fujita, M., Hashimoto, M., and Ghafourifar, P. (2009) a-Synuclein overexpression and aggregation exacerbates impairment of mitochondrial functions by augmenting oxidative stress in human neuroblastoma cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 41, 2015–2024.
37. Pfefferkorn, C.M. and Lee, J.C. (2012) Tryptophan probes at the a-synuclein and membrane interface. *J. Phys. Chem. B*, 114, 4615–4622.
38. Rath A, Cunningham F, Deber CM. Acrylamide concentration determines the direction and magnitude of helical membrane protein gel shifts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 110: 15668-73. PMID 24019476 DOI: 10.1073/pnas.1311305110
39. Rath A, Glibowicka M, Nadeau VG, Chen G, Deber CM. Detergent binding explains anomalous SDS-PAGE migration of membrane proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 106: 1760-5. PMID 19181854 DOI: 10.1073/pnas.0813167106
40. Rouser G, Siakotos AN, Fleischer AS. (1966) . Quantitative analysis of phospholipids by TLC and phosphorus analysis of spots. *Lipids*. 1: 85-6.
41. Saluta, M. y Bell P.A., Troubleshooting GST fusion protein expression in *E. coli*. *Life Science News I*. Amersham Pharmacia Biotech. (1998).

42. Sambrook, J. and David W. Russell. (2006). Preparation and Transformation of Competent *E. coli* Using Calcium Chloride. *Molecular Cloning. Cold Spring Harb Protoc.* doi:10.1101/pdb.prot3932
43. Scott, T.R. y Netsky, M.G. (1961). The pathology of Parkinson's syndrome: a critical review. *Int. J. Neurol.*, 2: 51-60.
44. Smith, Wanli W., Haibing Jiang, Zhong Pei, Yuji Tanak, et. al. (2005). Endoplasmic reticulum stress and mitochondrial cell death pathways mediate A53T mutant alpha-synuclein-induced toxicity. *Human Molecular Genetics.* 14: 24, 3801–3811. doi:10.1093/hmg/ddi396
45. Stadler J, Lemmens R, Nyhammar T. Plasmid DNA purification. *J Gene Med.* 2004 Feb;6 Suppl 1:S54-66. doi: 10.1002/jgm.512
46. Stöckl, Martin T., Niels Zijlstra and Vinod Subramanian. (2007).  $\alpha$ -Synuclein Oligomers: an Amyloid Pore? : Insights into Mechanisms of  $\alpha$ -Synuclein Oligomer-Lipid Interactions. *Molecular neurobiology.* 47(2) DOI: 10.1007/s12035-012-8331-4
47. Takamori, M. Holt, K. Stenius, E.A. Lemke, M. Gronborg, D. Riedel, H. Urlaub, S. Schenck, B. Brugger, P. Ringler, S.A. Muller, B. Rammner, F. Grater, J.S. Hub, B.L. De Groot, G. Mieskes, Y. Moriyama, J. Klingauf, H. Grubmuller, J. Heuser, F. Wieland, R. Jahn, Molecular anatomy of a trafficking organelle, *Cell* 127 (2006) 831–846.
48. Teale, F. W. and G. Werber. (1956). Ultraviolet Fluorescence of the Aromatic Amino Acids. *Biochem J.* 1957 Mar; 65(3): 476–482.
49. Tsigelny, I. F., Sharikov, Y., Wrasidlo, W., Gonzalez, T., Desplats, P. A., Crews, L., et al. (2012). Role of  $\alpha$ -synuclein penetration into the membrane in the mechanisms of oligomer pore formation. *FEBS J.* 279, 1000–1013. doi: 10.1111/j.1742-4658.2012.08489.
50. Tu Zhiming, Guangyuan He, Kexiu X. Li, Mingjie J. Chen. An improved system for competent cell preparation and high efficiency plasmid transformation using different *Escherichia coli* strains. *Electronic Journal of Biotechnology.* Vol.8 No.1, 2005. DOI: 10.2225/vol8-issue1-fulltext-8
51. Ulrih, N.P., Barry, C.H., Fink, A.L. (2008). Impact of Tyr to Ala mutations on alpha-synuclein fibrillation and structural properties. *Biochim. Biophys. Acta* 1782, 581–585.

52. Uversky, Vladimir N., Ghiam Yamin, Larissa A. Munishkina. Effects of nitration on the structure and aggregation of  $\alpha$ -synuclein. *Molecular Brain Research* 134 (2005) 84–10. doi:10.1016/j.molbrainres.2004.11.014
53. van Rooijen B. D., Claessens M. M., Subramaniam V. (2009). Lipid bilayer disruption by oligomeric alpha-synuclein depends on bilayer charge and accessibility of the hydrophobic core. *1788(6):1271-8*. doi: 10.1016/j.bbamem.2009.03.010.
54. Zigoneanu, Inola G., Yoo Jeong Yang, Alexander S. Krois, Md. Emdadul Haque, Gary J. Pielak. (2012). Interaction of  $\alpha$ -synuclein with vesicles that mimic mitochondrial membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*. Vol. 1818, Issue 3. pp. 512-519. doi:10.1016/j.bbamem.2011.11.024