

Informe final publicable de proyecto

Vías (o rutas) de señalización de las especies extracelulares de la proteína alfa-sinucleína en astrocitos y neuronas

Código de proyecto ANII: FCE_1_2019_1_156706

23/11/2023

SOUZA, José M. (Responsable Técnico - Científico)

CASSINA GOMEZ, María Patricia (Investigador)

CHAVARRIA, Cecilia (Investigador)

IVAGNES GREEN, Rodrigo (Investigador)

QUIJANO HERRERA, Celia Lía (Investigador)

SOUZA, José M. (Investigador)

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE MEDICINA (Institución Proponente) \ \

PROGRAMA DE DESARROLLO DE LAS CIENCIAS BÁSICAS. FUNDACIÓN PARA EL DESARROLLO DE LAS CIENCIAS BÁSICAS

Resumen del proyecto

La proteína alfa-sinucleína (α -syn) es un componente altamente prevalente en los agregados proteicos intracelulares encontrados en pacientes con Enfermedad de Parkinson y otras enfermedades neurodegenerativas. El objetivo de este proyecto fue investigar las formas de interacción y las vías de señalización de las principales conformaciones de α -syn: monómeros, oligómeros y fibras. En términos metodológicos, se utilizó una sonda fluorescente para marcar el monómero de α -syn, a partir del cual se generaron las formas marcadas de oligómeros y fibras. El propósito era identificar los receptores específicos que interactúan con las diversas especies de α -syn en los astrocitos y, especialmente, evaluar el efecto de estas especies sobre la función mitocondrial. Además, se buscaba determinar el impacto de estas especies de α -syn en cultivos primarios de neuronas. Aunque se logró generar eficientemente la marcación de los monómeros de α -syn, el rendimiento fue relativamente bajo, lo que afectó el marcado de los oligómeros y las fibras de α -syn. Estos resultados tuvieron repercusiones en los estudios con los cultivos de astrocitos y neuronas. Lamentablemente, hasta el momento no se ha podido realizar un estudio sistemático de la interacción de las especies marcadas con los astrocitos y neuronas mediante microscopía de fluorescencia confocal.

A pesar de los desafíos encontrados, este proyecto representa un valioso paso en la comprensión de la α -sinucleína y su potencial rol en las distintas enfermedades neurodegenerativas donde participa. Es importante continuar con el esfuerzo para superar las limitaciones actuales y avanzar hacia una mejor comprensión de estos procesos biológicos clave.

Ciencias Médicas y de la Salud / Medicina Básica / Bioquímica y Biología Molecular / Bioquímica

Palabras clave: alfa-sinucleína / neurodegeneración / astrocitos /

Introducción

La investigación sobre α -syn (alfa-sinucleína) es de vital importancia debido a su relevancia en diversas patologías neurodegenerativas conocidas como sinucleinopatías [1]. Estas enfermedades se caracterizan por la formación de agregados proteicos intracelulares, donde la α -syn juega un papel central. En el campo de las enfermedades neurológicas, hay un debate científico en curso sobre el papel que juegan las diferentes conformaciones de α -syn (monómeros, oligómeros y fibras) en el desarrollo de las distintas sinucleinopatías [2]. Inicialmente, se consideraba que las fibras de α -syn eran los principales agentes neurotóxicos. Sin embargo, estudios posteriores han demostrado que los oligómeros de α -syn tienen efectos neurotóxicos diversos, como afectación de la concentración intracelular de Ca^{+2} , disfunción mitocondrial, la permeabilización de los lisosomas y la afectación de los microtúbulos, entre los efectos más destacados [3]. Un aspecto relevante es la capacidad de las fibras de α -syn para propagar la formación de agregados entre grupos neuronales, incluso a distancias considerablemente largas [4]. Además, se ha detectado la presencia de formas extracelulares de α -syn en diferentes sinucleinopatías, lo que implica un papel importante en la propagación y afectación de grupos neuronales relacionados y vecinos. Por lo cual, el debate sobre la especie o las especies neurotóxicas y su rol en la patogénesis de las sinucleinopatías sigue estando presente [5].

Nuestra hipótesis es que los monómeros, oligómeros y fibras de α -syn median parte de sus efectos a través de receptores específicos presentes en las membranas de los astrocitos y neuronas. Estos receptores participan en la respuesta celular, ya sea la activación y el fenotipo reactivo en los astrocitos, así como una respuesta que induce la formación de agregados de α -syn intraneuronal o daño neuronal irreversible. Dilucidar los receptores y las vías de señalización relacionados con las distintas especies de α -syn tiene un potencial importante para intentar inhibir las rutas que conllevan un aumento de la astrogliosis y muerte neuronal. La descripción de las rutas de señalización que inducen las formas extracelulares de la proteína α -syn permitiría comprender cómo se propaga la enfermedad entre neuronas vecinas o conectadas y cómo se activan los astrocitos cercanos. Nuestro objetivo es identificar receptores específicos para las distintas especies de α -syn, lo que proporcionaría una base para explicar los diferentes efectos observados por nuestro grupo y otros en relación con la activación de oligómeros y fibras de α -syn en astrocitos, así como su efecto sobre neuronas [6].

Metodología/diseño del estudio

Marcaje de α -syn monomérica con sondas fluorescentes y no fluorescentes. Para poder estudiar la unión de la α -syn a astrocitos y neuronas es necesario generar una forma marcada de la proteína que puede ser analizada tanto por

microscopia como por otros métodos espectroscópicos. La primera opción fue utilizar la sonda fluorescentes Alexa fluor 488 (Thermo-Fisher Apex™-Alexa fluor 488). A partir de a-syn purificada se desarrolla la reacción en amortiguador fosfato de sodio pH 7.8 de acuerdo la empresa vendedora del fluoróforo (Thermo-Fisher Apex™-Alexa fluor 488 labeling kit). La proteína es re purificada por gel filtración (PD-10) y se analiza el rendimiento de marcaje cuantificando la presencia Alexa-488 por espectro UV-visible y por medio del espectrofluorímetro. Una alternativa de marcaje de monómeros de a-syn fue a través del uso de sulfo-NHS-LC-Biotin, que genera aductos de biotina-a-syn y puede detectarse por medio de estreptavidina conjugado con HRP.

Generación de oligómeros y fibras de a-syn marcadas. A partir del monómero marcado se generaron oligómeros y fibras de a-syn. Para las fibras el monómero (140 uM en amortiguador de Hepes 10 mM pH 7.4) se incubó bajo agitación a 37°C durante 3 días. Los oligómeros se generan incubando el monómero de a-syn (300 uM en Hepes 10 mM pH 7.4) sin agitación durante 20 h a 37°C. Luego se purifican utilizando un filtro de cut-off 100 kDa. La pureza de los oligómeros se analizó por medio de geles de poliacrilamida nativos. Además, tanto fibras como oligómeros fueron analizados por medio de microscopia electrónica utilizando acetato de uranilo como contraste. Este método permite cuantificar el tamaño y la forma de oligómeros y fibras de a-syn.

Cultivos primarios de astrocitos. La preparación de astrocitos se realizó a partir de neonatos de rata de 1 a 2 días, siguiendo el protocolo descrito en la referencia [6] y con la ayuda del Departamento de Histología y Embriología de la Facultad de Medicina.

Cultivos primarios de astrocitos y neuronas de hipocampo de rata se incubaron con monómeros, oligómeros y fibras marcadas de a-syn buscando, para los astrocitos, reproducir los resultados ya obtenidos en la referencia [6] y para las neuronas, se estudiará su morfología y viabilidad luego de la exposición a las especies de a-syn. Estos resultados también se compararan con las mismas especies de a-syn sin marcar.

La búsqueda de potenciales receptores de las especies a-syn es un importante aspecto que no se pudo desarrollar en el proyecto.

Resultados, análisis y discusión

Como se expresan en los informes anteriores logramos marcar el monómero de a-syn con el fluoróforo Alexa 488. Se puede observar en la siguiente figura presentadas, dónde se purifica luego del marcaje el monómero y se analiza la absorbancia a 280 nm (proteína) junto con la emisión a 495 nm del fluoróforo Alexa-488.

También se analizó la capacidad del monómero de a-syn de formar fibras y ver si eran similares a las de la proteína no marcada. Utilizando el ensayo de Thioflavina-T se puede ver que la cinética de agregación y la formación de fibras es similar en la proteína marcada con relación a la proteína wt no marcada.

También se analizaron por microscopía electrónica la formación de fibras y se observa un patrón y tamaño similar en ambas condiciones marcada y no marcada.

También se analizó la posibilidad de marcar las fibras directamente en lugar de marcar primero el monómero y luego generar fibras. El resultado claramente muestra que en ambas situaciones se obtienen fibras de similar forma y tamaño.

Para analizar la toxicidad de las fibras marcadas se utilizó la línea celular SH-SY5Y que corresponde a células de neuroblastoma. Primero se generaron cultivos de las células y se pudo comprobar su morfología habitual.

Estas células fueron sometidas a incubación con distintas concentraciones de monómero de a-syn (M) o fibras de a-syn (F) a distintas concentraciones y se midió la viabilidad celular. Además se comparó entre sí los monómeros marcados (aSM488) y fibras marcadas (aSF488).

La viabilidad de las formas marcadas de la a-syn fue insignificante en relación al control pero se observó cierta toxicidad del Alexa-488 solo. También se observó cierta toxicidad de las fibras no marcadas que no se observa en las fibras marcadas. Pensamos que estos resultados se deben a diferencias en las concentraciones proteicas de las fibras y que debe mejorar la cuantificación. Se debe repetir estos experimentos para estar seguros que estas diferencias son reales o solo un problema de error en la cuantificación de las especies utilizadas en los ensayos de viabilidad.

Utilizando esta misma línea celular SH-SY5Y, se realizaron experimentos para visualizar la interacción de los monómeros y fibras marcadas con Alexa-488.

Se logró visualizar las fibras marcadas con Alexa a las 2 h de incubación, no así los monómeros ni a tiempos más largos de incubación.

A partir de la financiación del proyecto FCE se presentaron en Congresos resúmenes y una publicación:

"Efecto de la Nitración de la Green Fluorescent Protein" Cecilia Chavarría, Mauricio Mastrogiovanni, José M. Souza, II Congreso Nacional de Biociencias, Montevideo, Uruguay, 4 al 7 de setiembre 2019.

Congreso Nacional de Biociencias-2022, 19 a 21 octubre 2022, Montevideo. "ROL DE LAS MODIFICACIONES OXIDATIVAS EN LA PROTEÍNA ALFA-SINUCLEÍNA" Ivagnes, Rodrigo; Chavarría, Cecilia; Piñeyro, Dolores M., Zeida, Ari, Mastrogiovanni, Mauricio; Ríos, Natalia; Souza, José M.

Congreso Nacional de Biociencias-2022, 19 a 21 octubre 2022, Montevideo. "CARACTERIZACIÓN DEL 5-METIL-1,4-DINITROIMIDAZOL (DNI) COMO NUEVO AGENTE NITRANTE MEDIADO POR LUZ" Rios, Natalia; Chavarría, Cecilia; Ivagnes, Rodrigo; Radi, Rafael; Souza, José M.

"Extracellular Alpha-Synuclein: Mechanisms for Glial Cell Internalization and Activation" Cecilia Chavarría, Rodrigo Ivagnes y José M. Souza. *Biomolecules* 2022, 12(5), 655; <https://doi.org/10.3390/biom12050655>.

"Photochemically-induced protein tyrosine nitration in vitro and in cellula by 5-methyl-1,4-dinitro-1H-imidazole (DNI): synthesis and biochemical characterization" Natalia Rios, Adrián Aicardo, Cecilia Chavarría, Rodrigo Ivagnes, Mauricio Mastrogiovanni, Rafael Radi, y José M Souza. *Free Radical Biology and Medicine* (2023); 209(Pt 1):116-126. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2023.09.038.

"Revisiting the role of 3-nitrotyrosine residues in the formation of alpha-synuclein oligomers and fibrils". Cecilia Chavarría, Rodrigo Ivagnes, Ari Zeida, María Dolores Piñeyro, José M. Souza. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. Enviado y en revision

Conclusiones y recomendaciones

Durante el proyecto del FCE se logró avanzar a los primeros objetivos del proyecto, sin poder conseguir los objetivos finales. Pudimos marcar los monómeros de α -syn y generar fibras marcadas, comenzar a estudiar su efecto en células SH-SY5Y e intentar su visualización por microscopía confocal. Quedan muchos puntos para continuar este trabajo y mejorar las condiciones experimentales para generar un marcaje más eficiente y potente que permita lograr una visualización por microscopía y seguir la interacción de la α -syn (monómeros, oligómeros y fibras). Los rendimientos bajos para la obtención de especies oligoméricas de la α -syn determinan buscar otros métodos para el marcaje de estas especies.

Referencias bibliográficas

1. Spillantini, M.G., et al., alpha-Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with lewy bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. 95(11): p. 6469-73.
2. Lashuel, H.A., et al., The many faces of alpha-synuclein: from structure and toxicity to therapeutic target. *Nat Rev Neurosci*, 2013. 14(1): p. 38-48.
3. Singleton, A.B., et al., alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science*, 2003. 302(5646): p. 841.
4. Taschenberger, G., et al., Aggregation of alphaSynuclein promotes progressive in vivo neurotoxicity in adult rat dopaminergic neurons. *Acta Neuropathol*, 2012. 123(5): p. 671-83.
5. Volpicelli-Daley, L.A., K.C. Luk, and V.M. Lee, Addition of exogenous alpha-synuclein preformed fibrils to primary neuronal cultures to seed recruitment of endogenous alpha-synuclein to Lewy body and Lewy neurite-like aggregates. *Nat Protoc*, 2014. 9(9): p. 2135-46.
6. Chavarría, C., et al., Impact of monomeric, oligomeric and fibrillar alpha-synuclein on astrocyte reactivity and toxicity to neurons. *Biochem J*, 2018. 475(19): p. 3153-3169.

Licenciamiento

Reconocimiento-NoComercial-Compartir Igual 4.0 Internacional. (CC BY-NC-SA)