



TÍTULO

**PREVENCIÓN DE LA FORMACIÓN DE FIBRAS AMILOIDES
POR LA CHAPERONINA CITOSOLICA EUCARIOTA (CCT)**

AUTORA

Ahudrey Leal Quintero

Directores
Curso

©

©

Esta edición electrónica ha sido realizada en 2012

Begoña Sot Sanz y José María Valpuesta

Máster Oficial en Biotecnología Avanzada

Ahudrey Leal Quintero

Para esta edición, la Universidad Internacional de Andalucía



Reconocimiento-No comercial-Sin obras derivadas

Usted es libre de:

- Copiar, distribuir y comunicar públicamente la obra.

Bajo las condiciones siguientes:

- **Reconocimiento.** Debe reconocer los créditos de la obra de la manera especificada por el autor o el licenciador (pero no de una manera que sugiera que tiene su apoyo o apoyan el uso que hace de su obra).
 - **No comercial.** No puede utilizar esta obra para fines comerciales.
 - **Sin obras derivadas.** No se puede alterar, transformar o generar una obra derivada a partir de esta obra.
-
- *Al reutilizar o distribuir la obra, tiene que dejar bien claro los términos de la licencia de esta obra.*
 - *Alguna de estas condiciones puede no aplicarse si se obtiene el permiso del titular de los derechos de autor.*
 - *Nada en esta licencia menoscaba o restringe los derechos morales del autor.*

UNIVERSIDAD INTERNACIONAL DE ANDALUCIA

UNIVERSIDAD DE MALAGA

CURSO 2010/2011

**PREVENCIÓN DE LA FORMACIÓN DE FIBRAS AMILOIDES POR LA
CHAPERONINA CITOSOLICA EUCARIOTA (CCT)**

Trabajo de investigación para optar al grado de Máster oficial en Biotecnología Avanzada

AHUDREY LEAL QUINTERO

DIRECTOR 1

Dr. Begoña Sot Sanz

DIRECTOR 2

Dr. Jose María Valpuesta

CENTRO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA

Madrid, España

2012

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Internacional de Andalucía por el apoyo brindado dentro de su programa de formación con el otorgamiento de la beca para la realización del máster.

A todo el personal docentes, administrativo, al personal de la escuela de postgrado en la Rábida (Huelva) y personal de la biblioteca, quienes me ayudaron y acompañaron durante la formación teórica y práctica de mis estudios.

Al Dr. Jose María Valpuesta y la Dr. Begoña Sot Sanz por su orientación, enseñanzas y paciencia durante la realización del trabajo de investigación.

Un agradecimiento especial a mí familia que siempre ha sido un apoyo incondicional y en todo momento ha propendido por mi bienestar.

A mis compañeros de máster y de convivencia en la Rábida que me permitieron compartir buenos momentos, conocer y aprender otras culturas.

A todas aquellas personas que de una u otro forma me apoyaron durante este maravilloso año, tiempo en que me permitieron conocer y aprender un poco más de la vida.

Gracias a todos.

CONTENIDO

INDICE DE ESQUEMAS	iv
INDICE DE FIGURAS	v
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MATERIALES Y METODOS	5
2.1. PURIFICACIÓN DE LA CHAPERONINA CITOSOLICA (CCT)	5
2.2. DETERMINACIÓN DE CONCENTRACIÓN DE PROTEINA POR MÉTODO DE BRADFORD	6
2.3. EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE SINUCLEÍNA A53T	7
2.4. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS- PAGE)	8
2.5. TINCIÓN CON AZUL DE COOMASIE	9
2.6. INDUCCIÓN DE FIBRAS AMILOIDES	9
2.7 FLUORESCENCIA DE TIOFLAVINA T (Th-T)	10
2.8 MICROSCOPIA ELECTRONICA DE TRANSMISIÓN	10
2.9 PURIFICACIÓN DE FIBRAS AMILOIDES	11
2.10 CARACTERIZACIÓN DE LA INTERACCIÓN DE FIBRAS Y CHAPERONINA CITOSOLICA (CCT)	11
2.11 CARACTERIZACIÓN DE LA INTERACCIÓN DEL MONOMERO DE SINUCLEINA A53T Y LA CHAPERONINA CITOSOLICA (CCT)	12
3. RESULTADOS	13
3.1. PURIFICACIÓN DE LA CHAPERONINA CITOSOLICA (CCT)	13
3.2. PURIFICACIÓN DE SINUCLEÍNA A53T	16
3.3. CINETICA DE FORMACIÓN DE FIBRAS AMILOIDES	19
3.4 DETERMINACIÓN DE LA INHIBICION DE LA AGREGACIÓN FIBRILAR POR CHAPERONINA CITOSOLICA (CCT)	20
3.5. PURIFICACIÓN DE FIBRAS AMILOIDES	24
3.6. CARACTERIZACIÓN DE LA INTERACCIÓN DE FIBRAS Y CHAPERONINA CITOSOLICA (CCT)	28
3.7 CARACTERIZACIÓN DE LA INTERACCIÓN DEL MONOMERO DE SINUCLEINA A53T Y LA CHAPERONINA CITOSOLICA (CCT)	29
4. DISCUSIÓN	31

INDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1. Procedimientos y resultados durante la purificación de CCT. a) gel SDS-PAGE fracciones gradiente sacarosa. b) Cromatograma Heparina- Gel SDS-PAGE. c) Cromatograma Superosa- Gel SDS-PAGE.....	15
Esquema 2. Procedimientos y resultados durante la purificación de Sinucleína A53T a) gel SDS-PAGE fracciones gradiente sacarosa. b) Cromatograma Q-Superose - Gel SDS-PAGE. c) Cromatograma Superdex 200- Gel SDS-PAGE	18
Esquema 3. Procedimientos y resultados durante la purificación de Fibras cortas de Sinucleína A53T	26
Esquema 4. Interacción de CCT con fibras cortas de SyA53T.....	28

INDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1. (a) Cinética de formación de fibras amiloides por fluorescencia de ThT y (b,c,d,e) micrografías de los puntos de la cinética señalados en la gráfica</i>	<i>19</i>
<i>Figura 2. (a) Evaluación de la formación e inhibición de fibras de Sinucleína A53T en presencia de 2,2 / 1,6 μM CCT con el nucleótido ATP y (b) Evaluación de la formación e inhibición de fibras de Sinucleína A53T en presencia de 3,5 / 1,6 μM CCT con el nucleótido ADP.....</i>	<i>21</i>
<i>Figura 3. Determinación de fibras amiloides por Microscopia electrónica de transmisión ..</i>	<i>22</i>
<i>Figura 4. Fotografía por microscopia electrónica (a) 3,5μM CCT + SyA53T + ADP, (b) 2,2μM CCT + SyA53T + ADP, (c) 1,6μM CCT + SyA53T + ATP, (d) 1,6μM CCT + SyA53T + ADP.....</i>	<i>23</i>
<i>Figura 5. Determinación de la pureza de fibras cortas por microscopia electrónica</i>	<i>27</i>
<i>Figura 6. Gel de SDS-PAGE 12% del precipitado de fibras cortas.....</i>	<i>27</i>
<i>Figura 7. Determinación de la presencia de CCT y SyA53T en cada una de las muestras por Gel Nativo 6,5%.....</i>	<i>30</i>
<i>Figura 8. Interacción entre CCT y el monómero de SyA53T</i>	<i>30</i>

1. INTRODUCCIÓN

Actualmente se conocen gran cantidad de enfermedades neurodegenerativas, siendo las más importantes por su frecuencia y/o gravedad el Alzheimer, Parkinson, Huntington y la esclerosis lateral amiotrófica. Se cree que son el resultado de procesos anormales como el mal plegamiento y agregación de las proteínas neuronales. Las proteínas defectuosamente procesadas se acumulan fácilmente cuando los mecanismos celulares para su eliminación son ineficaces (Arana and Teruel 2000). El Parkinson (PD) es una forma de enfermedad neurodegenerativa cerebral de los humanos, que está relacionada con la edad y afecta aproximadamente a 4 millones de personas en el mundo, con una mayor prevalencia en los hombres (Recchia, Debetto et al. 2004). Diferentes investigaciones han convergido en que la patogénesis de esta enfermedad se caracteriza por la agregación anormal de las proteínas que forman depósitos que contienen fibras amiloides insolubles (80 – 150 Å) con unas parecidas características morfológicas. Se ha vinculado al desarrollo del Parkinson a la proteína α -sinucleína, en particular a su mutante sinucleína A53T (SyA53T) (donde un residuo de Alc en la posición 53 ha sido sustituido por uno de Thr).

La sinucleína es una proteína de 140 aminoácidos con una masa molecular de 16kDa. Su estructura primaria se divide en tres dominios distintos: i. Residuos 10 a 60: Una región anfipática N-terminal dominada por cuatro repeticiones del residuo 11 incluyendo la secuencia consenso KTKEGV (George 2001). ii. Residuos 61 a 95: Región hidrofóbica central que incluye el componente no-amiloide (NAC), y que está involucrada en la agregación de la proteína (Uéda, Fukushima et al. 1993). iii. Residuos 96 a 140: Región con una alta acidez central y rica en prolina. Esta proteína se localiza en el cerebro y juega un papel clave en las funciones sinápticas; (Dev, van der Putten et al. 2003; Eriksen, Dawson et al. 2003). Es una proteína soluble no estructurada que tiene una mayor propensión a la agregación

debido a su dominio hidrofóbico (Murrell, Koller et al. 1997). Además, la sinucleína polimeriza formando fibras amiloides que se acumulan formando cuerpos de Lewy e inclusiones citoplasmáticas (Takeda, Hasegawa et al. 2006) éste fenómeno está asociado a procesos neurodegenerativos en sinucleinopatías. Estudios recientes sugieren que ambientes lipídicos promueven y aceleran también la agregación y el mal plegamiento de la sinucleína (Conway, Rochet et al. 2001; Lee, Daekyun et al. 2002).

Se ha sugerido que la mutación A53T, al adquirir una configuración de helice- α , hace más propensa la formación de agregados y filamentos, (Rochet, Conway et al. 2000) La proteína nativa en solución acuosa a altas concentraciones puede formar fibras amiloides, pero la tasa de proteofibrilación es mayor en los mutantes A53T(Conway, Lee et al. 2000; Volles, J. et al. 2002). El control de la formación de fibras amiloides está siendo estudiado con el uso de chaperonas moleculares, las cuales vuelven a plegar o promueven la degradación de proteínas mal plegadas por el proteosoma y se encargan de organizar cuando y donde se pliegan y despliegan las proteínas en la célula. Las chaperoninas son proteínas que asisten el plegamiento de otras proteínas, y se dividen en dos grupos: Las del grupo I. que se encuentra principalmente en las eubacterias y orgánulos eucarióticos de origen endosimbionte, y del grupo II, que están presentes en arqueobacterias y en el citosol de organismos eucariotas. (Valpuesta, Martín-Benito et al. 2002)

La chaperonina citosólica (CCT) es esencial para el crecimiento celular y ayuda en el plegamiento de proteínas en el citosol eucariota (Willison and Kubota 1994; Kubota, Hynes et al. 1995); (Lewis, Tian et al. 1996); (Stoldt, Rademacher et al. 1996); (Willison and Horwich 1996); (Cowan 1998; Willison 1999); (Leroux and Hartl 2000); (Carrascosa, Llorca et al. 2001); (Willison and Grantham 2001). CCT, se considera como la más compleja de todas las chaperoninas por su estructura

construida a partir de dos anillos idénticos, cada uno compuesto de una sola copia de las 8 diferentes subunidades, además varía de otras chaperoninas por su composición heterooligomérica (Martín-Benito, Grantham et al. 2007; Yébenes, Mesa et al. 2011), siendo este complejo heterooligomérico el homólogo eucariota de la chaperonina GroEL de *Escheria* (Gupta 1990), (Lewis, Hynes et al. 1992); (Rommelaere, Van Troys et al. 1993).

CCT actúa sobre las proteínas es a través de su capacidad de utilizar la energía producida por el ATP (Trifosfato de adenosina), de manera similar a la de GroEL (Melki and Cowan 1994); (Tian, Vainberg et al. 1995); (Farr, Scharl et al. 1997). Aproximadamente el 15% de las proteínas mal plegadas que son asistidas por CCT se encuentran en un rango molecular entre 30 – 60 KDa. Según (Thulasiraman, Yang et al. 1999) el 15% de la nueva síntesis de proteínas requiere la acción de CCT durante el plegado, por lo que el rango de proteínas desplegadas reconocidas por CCT es menor que el de la chaperonina GroEL siendo éste de un 30 a 50% de proteínas totales (Viitanen, Gatenby et al. 1992); (Horwich A, Low K et al. 1993).

La actividad de CCT se descubrió al observarse que es imprescindible para el plegamiento de la actina y la tubulina hace aproximadamente 29 años (Frydman, Nimmesgern et al. 1992); (Gao, Thomas et al. 1992); (Yaffe, Farr et al. 1992). Otras proteínas que participan en diversos procesos celulares son también asistidas en el plegamiento, entre ellas: $G\alpha$ -transducina, (involucrada en la fototransducción la retina), la ciclina E (implicada en el control del ciclo celular), y la luciferasa. Otras proteínas que son plegadas por CCT son ciertas proteínas virales como el virus de Epstein, proteína nuclear (EBNA-3), la cápside del virus del hepatitis B y el retrovirus tipo D poliproteína Gag (Valpuesta, Martín-Benito et al. 2002). También se ha demostrado que CCT interacciona con la cochaperona Prefoldina (PFD) trabajando en conjunto en los procesos de plegamiento de las

proteínas (Siegert, Leroux et al. 2000). Otros estudios reportan que CCT interactúa con Hsp70 ya sea directamente (Feldman, Thulasiraman et al. 1999) o a través de la interacción con el sistema Hsp70/Hsp90 (Gebauer, Melki et al. 1998)

Estos antecedentes y los resultados obtenidos sobre la capacidad de la chaperonina CCT cooperando con otra chaperona denominada Hsp70 en el bloqueo de la agregación toxica de la Huntingtina con poli-Q extendida (Tam, Geller et al. 2006), además de los recientes resultados de inhibición de la agregación de α -sinucleína y su mutante A53T por acción de la chaperona Hsp70 (Donmez, Arun et al. 2012) han llevado a proponer la posible acción de CCT en el proceso de agregación fibrilar de la SyA53T determinando la inhibición o reducción del desarrollo y formación de fibras, como también la capacidad de unirse a la proteína amiloide.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1. PURIFICACIÓN DE LA CHAPERONINA CITOSOLICA (CCT)

CCT se purificó a partir de un extracto de testículos de toro, siguiendo la metodología de (Martin-Benito, Boskovic et al. 2002). El tejido se homogeneizó en una solución de tampón H (20 mM Tris-HCl pH 7,35, 10 mM KCl, 1mM EDTA, 1mM Ditioneitol, inhibidores de proteasas (1mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo, más el Complejo inhibidor ROCHE (1 píldora/33,37 ml de muestra), utilizando una batidora (Oster® 12 Speed Blender) a 8 rpm durante 3 minutos. El homogenizado se filtró y posteriormente se realizó un rompimiento celular usando un torno. El extracto final se centrifugó (centrifuga Sorvall, rotor SS34) a 16000 rpm durante 25 minutos a 4°C para eliminar lisosomas y mitocondrias. El sobrenadante I, se centrifugo otra vez (Beckman rotor 50.2 TI) a 34000 rpm durante 1 h a 4°C, para eliminar ribosomas, fosfolípidos, lipoproteínas y componentes subcelulares. El sobrenadante II, con la fracción citosólica se filtró y seguidamente se precipitó con sulfato amónico ($\text{SO}_4(\text{NH}_2)_2$) al 30% de saturación durante 30 minutos a 4°C, posteriormente se centrifugó a 15000 rpm durante 30 minutos a 4°C (centrifuga Sorvall, rotor SS34). el sobrenadante III se recuperó y se volvió a precipitar con $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ al 55% de saturación durante 17 hs. Al finalizar la precipitación, se centrifugó a 15000 rpm durante 30 minutos a 4°C (Sorvall, rotor SS34), y se desecho el sobrenadante y conservó el precipitado. Éste se resuspendio en la solución tampón A (150mM NaCl; 5mM MgCl_2 ; 50mM Tris pH 7,35; 10% glicerol, 1mM Ditioneitol) complementada con inhibidores (1mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo), incubando en hielo durante 30 minutos para facilitar la disolución. Seguidamente se dializó en la solución tampón A durante 2 hs con un cambio de 1 h. La solución dializada se cargó en un gradiente de sacarosa del 10% al 40% (p/v) a partir de un gradiente discontinuo de 13 disoluciones,

cargándose 2 ml de la muestra dializada por cada tubo de gradiente y centrifugando (rotor SW28), a 28000 rpm, durante 64 hs a 4°C.

CCT migró dentro de las capas de sacarosa entre el 30 y el 40%, siendo recogidas con la ayuda de una bomba peristáltica y colector de fracciones. Para seleccionar las fracciones que contienen CCT, éstas se evaluaron en un gel SDS PAGE 12%. Las fracciones que presentaron banda en un rango 55 – 62 kDa se dializo nuevamente con la solución A durante toda la noche. La muestra dializada se pasó por un filtro de 22 μm y posteriormente se sometió a una cromatografía de afinidad en una columna de Heparine (HiTrap™ 5ml) eluída mediante una serie de pasos entre la solución tampón A y la solución tampón B (1M NaCl; 2,5mM MgCl_2 ; 50mM Tris pH 7,35; 10% glicerol; 1mM Ditiotretitol, 1mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo), conservando sólo las fracciones que eludieron a un 40% NaCl y evaluadas en un gel SDS-PAGE 12 %. Las fracciones positivas se juntaron y se pasaron por una cromatografía de filtración en una columna de Superose™ 6 Prep grade. Las fracciones se evaluaron en un gel SDS PAGE 12%, seleccionando finalmente las que presentaron el grupo de banda característica de CCT. La concentración de la proteína se determino por el método de Bradford.

2.2. DETERMINACIÓN DE CONCENTRACIÓN DE PROTEINA POR MÉTODO DE BRADFORD

A partir de una curva de calibración con 0 – 10 $\mu\text{g/ml}$ de albumina de suero toro (BSA) en agua. Se mezcló 10 μl de cada concentración de BSA y 1 – 2 μl muestra de proteína con 1ml de solución de Bradford (BIO-RAD) diluido 5 veces en agua destilada, respetivamente. Se incubó durante 2 min y se midió la absorbancia en espectroscopio UV- visible a 595nm. Las concentraciones de BSA y muestras de proteína se evaluaron por duplicado, realizándose una media entre mediciones para la construcción de la curva patrón con los valores de absorbancia

de BSA. El valor de absorbancia obtenido para CCT se interpoló en la recta patrón para calcular su concentración, considerando el factor de dilución de la CCT.

2.3. EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE SINUCLEÍNA A53T

Para la expresión de Sinucleína A53T recombinante se adaptó el procedimiento de (Hoyer, Antony et al. 2002). La proteína se expresó en *Escherichia coli* BL21, las cuales se transformaron con el plásmido de expresión en bacterias pT7-7 que contenía la secuencia de SyA53T.

Transformación de Bacterias

Se tomaron 100 μ l de células competentes BL-21 en un tubo estéril, junto con 1 μ l de plásmido pT7-7-SyA53T. Se incubó en hielo durante 30 minutos, posteriormente realizó un choque térmico a 42°C durante 90 segundos y finalmente se incubó en hielo durante 5-10 minutos. Se añadió 900 μ l de medio Luria Bertani (LB) y se incubó a 37 °C en agitación por 1 h. Las bacterias transformadas se centrifugaron durante 2 minutos a 10000 rpm, se eliminó una parte del sobrenadante, dejando una mínima cantidad con la cual se resuspendió el precipitado y se sembró en placas de Agar-LB con antibiótico (100 μ g/ml Ampicilina). Las placas se incubaron durante 20h a 37°C.

Expresión y purificación de Sinucleína A53T recombinante

La inducción de la expresión y purificación de la proteína recombinante se realizó en varios pasos, tal como se describe a continuación: (i) 4L de medio LB suplementado con ampicilina (100 μ g/ml) se inocularon con 40 ml precultivo de BL21 conteniendo el plásmido pT7-7-SyA53T. Las bacterias crecieron con agitación a 37°C hasta alcanzar una densidad óptica de 0,6. Para inducir la expresión de proteína se agregó isopropyl-beta-D-tiogalactopiranosas (IPTG) a una concentración final de 1mM y se incubó durante 4 hs en las anteriores

condiciones. (ii) Se centrifugó durante 20 min a 5000 rpm a 4°C (Rotor F10-6X500) para eliminar medio LB. Se resuspendió el precipitado I en 10 ml de solución tampón de lisis (10mM Tris pH 8, 1mM EDTA, 1mM pMSF, 1 píldora complejo inhibidor (ROCHE), mínima cantidad de lisozima y DNasa). (iii) La suspensión bacteriana se lisó mediante sonicación en 3 ciclos de 5 min y luego se centrifugó a 18000 rpm durante 45 minutos (Sorvall rotor SS34). El sobrenadante I se conservó y se hirvió durante 30 min. Después se volvió a centrifugar a 18000 rpm por 30 min, conservando el sobrenadante II. (iv) El sobrenadante II se precipitó con sulfato de amonio al 60% de saturación (0,36g/ml) durante 3 hs, y luego se centrifugó a 13500 rpm a 4 °C durante 30 minutos. (v) El precipitado II, se resuspendió en 25mM Tris- HCl pH 7,5. Se realizó una cromatografía de intercambio iónico en una columna Q-Superose (HiTrapTm de 5 ml). La proteína se eluyó con un gradiente de la solución tampón B (25mM Tris-HCl pH 7,5, 1M NaCl), conservando sólo las fracciones que eluyeron a 0,3 M de NaCl para ser evaluadas en un Gel SDS- PAGE al 12%; (vi) Las fracciones positivas del gel se juntaron y se concentraron en un volumen final de 5ml. Seguidamente se realizó una cromatografía de filtración en gel en una columna Superdex 200 previamente equilibrada con la solución tampón GF (25mM Tris HCl pH 7,5). Las fracciones se evaluaron en un gel SDS PAGE 12%, seleccionando finalmente las que presentaron una banda de Sinucleína pura; La concentración de la proteína se determinó midiendo la Absorbancia a 275 nm, con un $\epsilon_{275nm} = 5600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

2.4. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS- PAGE)

Se utilizaron geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalantes (SDS-PAGE) a una concentración de 10 - 12%. Como gel de resolución 3,84% acrilamida, 0,122% Bis-acrilamida, 120mM Tris- HCL pH 6,8, 0,1% SDS, 0,1 % persulfato de amonio, 0,1% TEMED y como gel concentrador 12% de acrilamida/bis-acrilamida, 375mM Tris-HCl pH8, 8, 0.1% dodecil sulfato de sodio

(SDS), 0,1 % persulfato de amonio, 0,04% TEMED. Las muestras de proteína se mezclaron con tampón de carga 4X en una relación 3:1, y se incubaron a 90°C durante 5 minutos. Luego se cargaron en el gel SDS-PAGE previamente colocado en un equipo de electroforesis con tampón de electroforesis (25mM Tris- HCl pH 8,3, 250mM glicina, 0,1% SDS). Para identificar la banda de interés se utilizó un marcador comercial Precision Plus Protein™ Dual Color Standards #161-0374.

2.5. TINCIÓN CON AZUL DE COOMASIE

Al finalizar la electroforesis, el gel SDS-PAGE se sumergió en solución de Azul Coomasie (0,25 % de azul brillante de Coomasie R250; 10 % ácido acético; 45 % metanol) durante 4 hs a temperatura ambiente y agitación suave. La solución de Coomasie eliminó y se agregó al gel solución de destañido de tinción (10% ácido acético; 45% metanol); Se dejó en incubación durante 4 hs a temperatura ambiente y agitación suave.

2.6. INDUCCIÓN DE FIBRAS AMILOIDES

Se adaptó la técnica de (Conway, Harper et al. 2000) para la formación de fibras amiloides con SyA53T. Se utilizaron tubos de polipropileno con fondo cónico. Una solución con 25mM Tris pH 7,6; 150mM NaCl; 5mM MgCl₂; 1mM DTT; 10% Glicerol; 56mM KCl se incubó con 35 μM SyA53T y 10mM ATP o 1mM ADP respectivamente, en presencia o ausencia de (i) 3,5 μM CCT, (ii) 2,20 μM CCT, (iii) 1,60 μM CCT, (iv) 56mM rodanasa, con agitación constante a 37°C durante 12 hs. La formación de fibras y su cinética se determinó por fluorescencia de Tioflavina T y mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM).

2.7 FLUORESCENCIA DE TIOFLAVINA T (Th-T)

Se adaptó el protocolo de Bourhim, Kruzel et al. (2006). Para cada una de las muestras de los ensayos de formación de fibras amiloides se tomaron alícuotas de 5 μ l cada 2 hs, que se diluyeron en 145 μ l de Tioflavina T 40 μ M. La fluorescencia de Th-T fué medida inmediatamente después de formar la solución. Se utilizó una longitud de onda de excitación de 440nm. y slits (ExEm) de 5nm. Se obtuvo un espectro de emisión de fluorescencia entre 450 – 600 nm. La longitud de onda a la cual se evaluó la fluorescencia de Th-T fué de 490nm. Los datos se procesaron y analizaron usando el programa Sigmaplot 11.0.

2.8 MICROSCOPIA ELECTRONICA DE TRANSMISIÓN

Rejillas H26 Cu/Rh, previamente cubiertas con carbón y cargadas positiva y negativamente (\pm) al vacío se incubaron durante 15 minutos con 7 μ l de cada una de las muestras, dejando la cara con carbón en contacto directo con la solución. Las rejillas se limpiaron cuidadosamente para eliminar el exceso de muestra, pasando la cara con carbón sobre una solución tampón (25mM Tris pH 7,6; 150mM NaCl; 5mM MgCl₂; 1mM DTT; 10% Glicerol); El exceso de solución se extrajo con papel de filtro, y luego se colocaron las rejillas invertidas sobre 6 μ l de Acetato de Uranilo 2%, dejándolo en incubación por 1 min y secando el exceso con papel filtro. Las rejillas se observaron en un microscopio electrónico de transmisión JEOL 1200EX-II (Martin-Benito, Boskovic et al. 2002) a 100 Kvolt. Se fotografiaron campos visuales representativos a 20- 100K de aumento.

2.9 PURIFICACIÓN DE FIBRAS AMILOIDES

La formación de las fibras se realizó tal como se describió en el apartado 2.6, a partir de una mezcla de SyA53T con 1mM ADP y la solución tampón. Se fue midiendo la fluorescencia de Th-T cada hora hasta obtener un valor entre 500 a 700 u.a., siendo el punto identificado en la cinética con formación de fibras cortas. Para la purificación se adaptó la metodología de Rostagno and Ghiso 2009, como se describe a continuación. Se añadió 1% Triton X-100 y se incubó 15 min a temperatura ambiente. Después se centrifugó a 57000 rpm durante 60 min a 10°C. El precipitado obtenido se resuspendió en tampón 25mM Tris pH 7,6; 150mM NaCl; 5mM MgCl₂; 10% Glicerol; 1mM DTT; 56mM KCl, 1% Tritón X-100 y se centrifugó a 57000 rpm por 60 min a 10°C, para eliminar el detergente. El precipitado se lavó en el mismo tampón y se centrifugó una vez a iguales condiciones.

Para las diferentes centrifugaciones se utilizó un rotor Beckman TLA 120.1. El precipitado final se resuspendió y se analizó mediante fluorescencia Th-T y microscopía electrónica de transmisión. Finalmente se congeló por inmersión en nitrógeno líquido y se conservó a -70°C.

2.10 CARACTERIZACIÓN DE LA INTERACCIÓN DE FIBRAS Y CHAPERONINA CITOSOLICA (CCT)

Fibras cortas de SyA53T \approx 3,5 μ m fueron incubadas en presencia de 0,4 μ m CCT, se dejaron a temperatura ambiente durante 30 minutos. Luego se centrifugaron a 57000 rpm durante 60 minutos a 10°C. El precipitado final se resuspendió en solución tampón (25mM Tris pH 7,6; 150mM NaCl; 5mM MgCl₂;

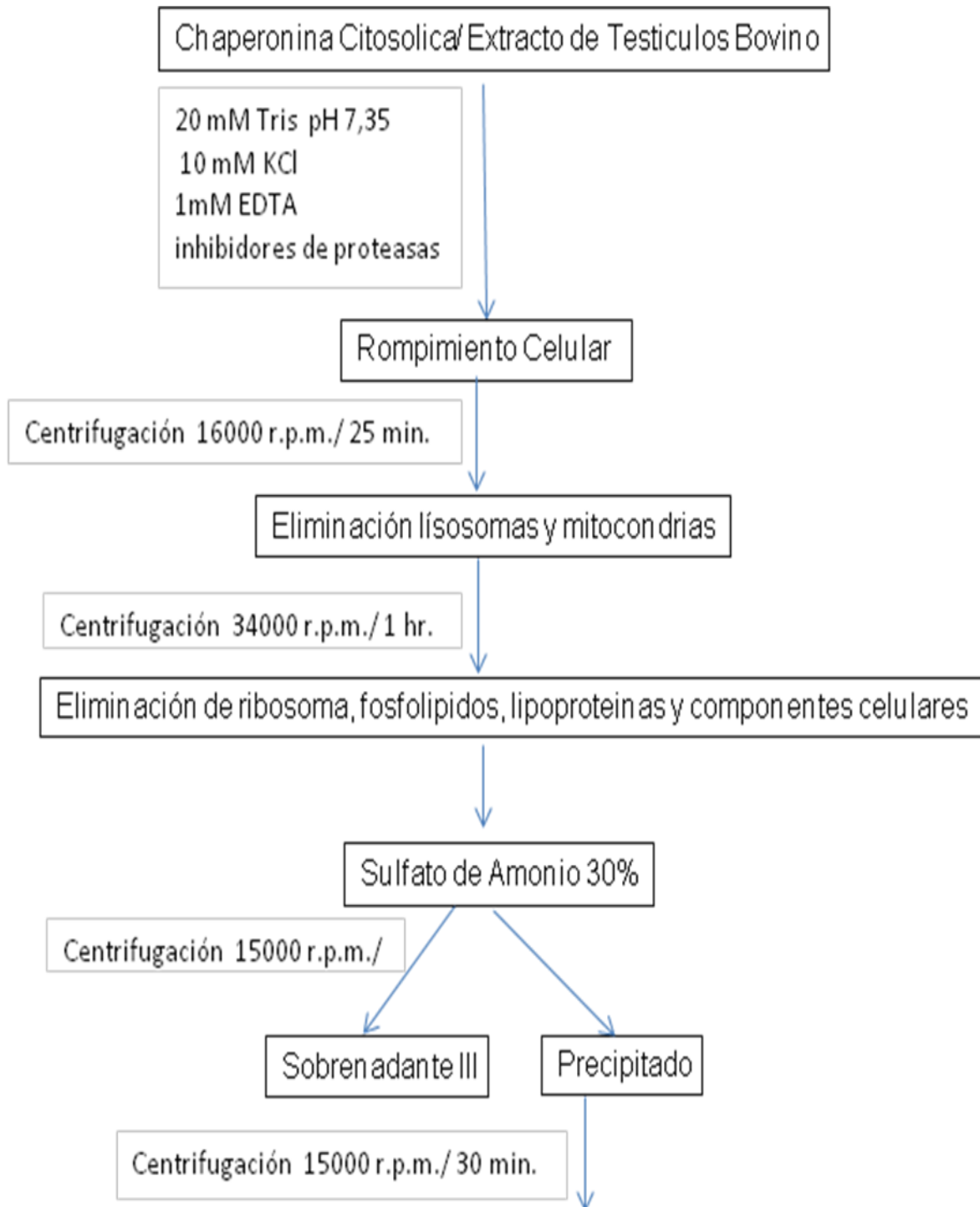
10% Glicerol; 1mM DTT; 56mM KCl) y evaluado junto al sobrenadante en un gel SDS-PAGE 12%, como también mediante microscopía electrónica de transmisión.

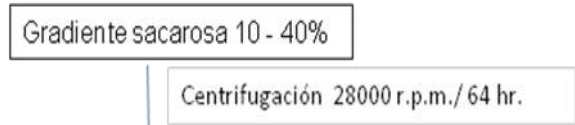
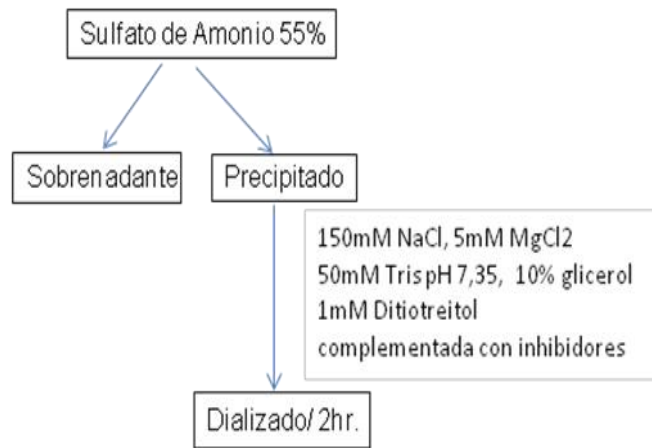
2.11 CARACTERIZACIÓN DE LA INTERACCIÓN DEL MONOMERO DE SINUCLEINA A53T Y LA CHAPERONINA CITOSOLICA (CCT)

Se adaptó la técnica de (Cuellar, Martín-Benito et al. 2008). Partiendo de una razón molar de 1:10 se incubó 1 μ m CCT en presencia de (i) 10 μ m Sinucleína con y sin agitación constante, (ii) 10 μ m Sinucleína desnaturizada y sin agitación. Se dejaron a temperatura ambiente durante 30 minutos, luego se realizó una electroforesis nativa utilizando geles de acrilamida 6,5% (w/v) que se corrieron a 90- 100 V. Las bandas de chaperonina – Sinucleína separadas en el gel se tiñeron con Bio-Safe Coomasie (BIO-RAD) posteriormente eliminado. Cada una de los pocillos fue cortado al nivel de la banda de CCT, luego se deshidrataron a 90°C durante cinco minutos y se rehidrataron con el tampón de carga para electroforesis desnaturizante. Las muestras se hirvieron durante 5 minutos y se cargaron posteriormente en un gel a 12% (w/v) SDS-PAGE. Finalizada la electroforesis los geles se tiñeron con azul de Coomasie, siguiendo el protocolo descrito en el apartado 2.5.

3. RESULTADOS

3.1. PURIFICACIÓN DE LA CHAPERONINA CITOSOLICA (CCT)

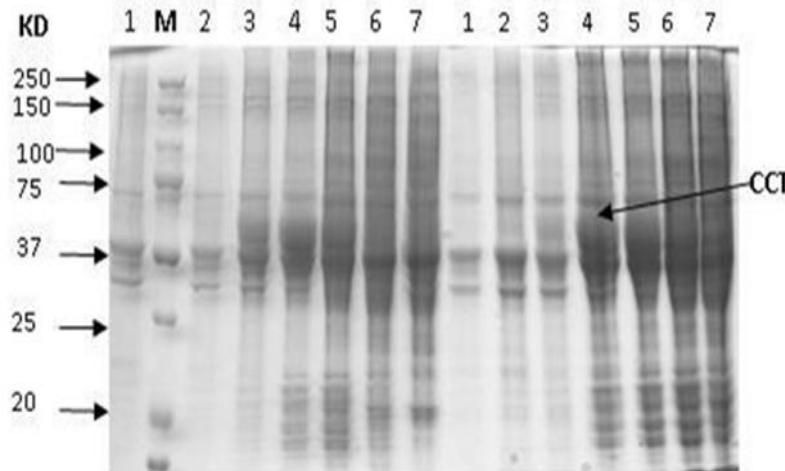
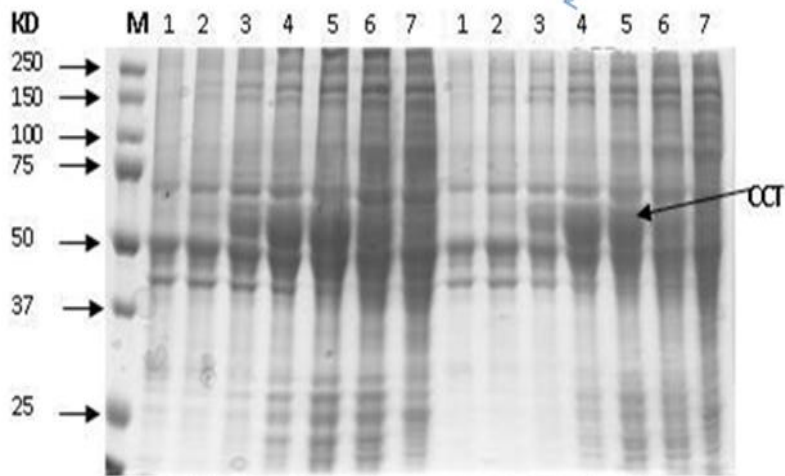


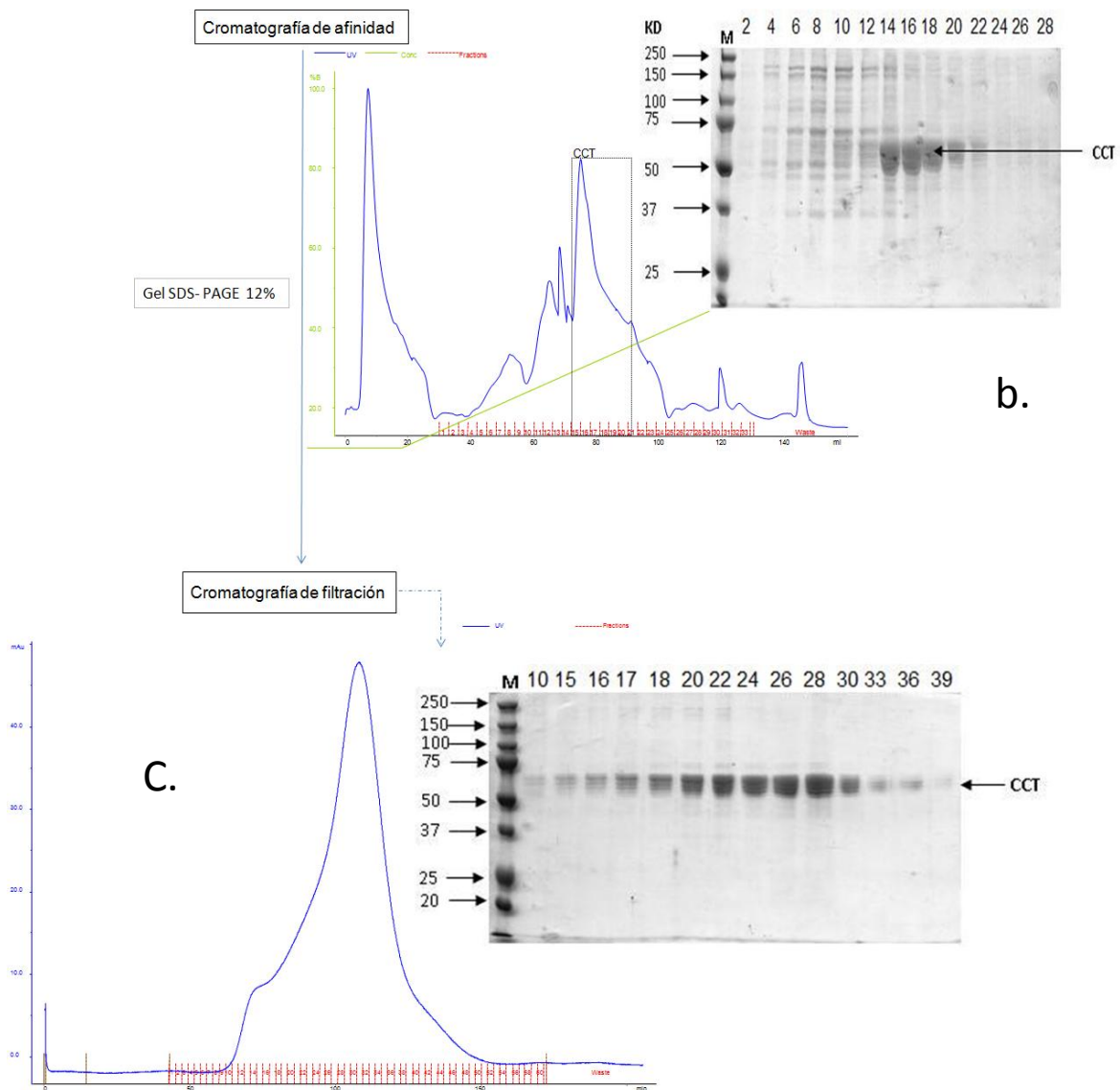


Recolección de fracciones

Gel SDS-PAGE 12%
Dialisis/ O.N.

a.





Esquema 1. Procedimientos y resultados durante la purificación de CCT. a) gel SDS-PAGE fracciones gradiente sacarosa. b) Cromatograma Heparina- Gel SDS-PAGE. c) Cromatograma Superosa- Gel SDS-PAGE

Para el desarrollo de los experimentos de formación de fibras y su inhibición por la acción de CCT, se requería contar con proteínas puras y homogéneas. Por tanto se procedió inicialmente a la purificación de CCT, como también a la expresión y purificación de SyA53T.

La Chaperonina CCT se purificó de testículos de toro con el uso de técnicas bioquímicas comunes: precipitación con sulfato de amonio a 30% y 55%, un gradiente de sacarosa del 10 – 40% y dos cromatografías Heparine y Superose.

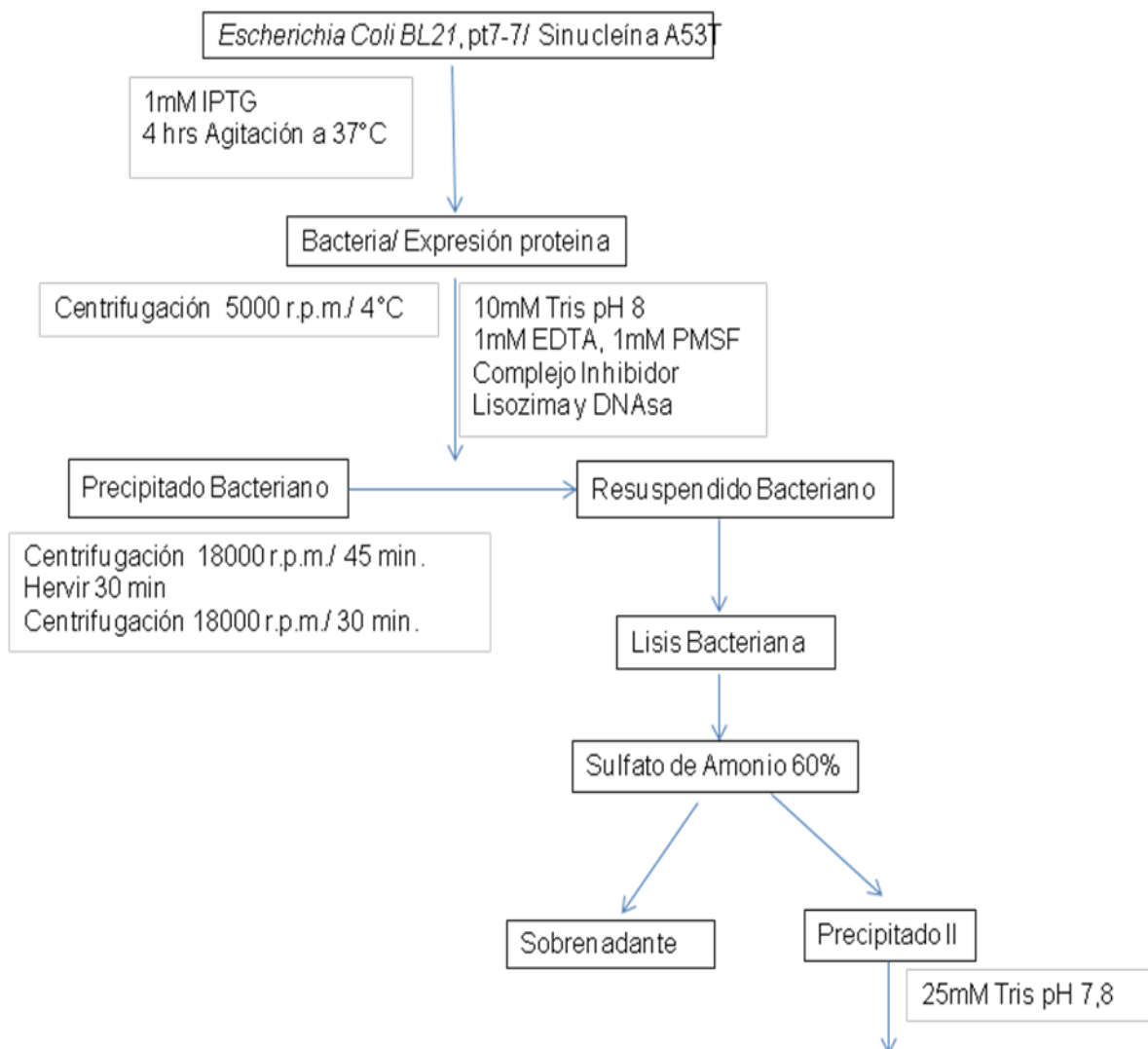
Según los resultados obtenidos en el gel SDS realizado a las fracciones colectadas del gradiente de sacarosa se seleccionaron solo las que presentaron una banda entre 55 – 60 kDa sin presencia de gran cantidad de contaminantes (ver esquema 1-a). Dicha selección al pasar por la cromatografía de afinidad nos presentó una señal de CCT eluída a un 0,4M de NaCl. Las alícuotas obtenidas a este porcentaje fueron evaluadas en un SDS-PAGE 12%, obteniendo chaperonina pura a 60 kDa (Ver esquema 1- b). Las fracciones más puras obtenidas en la columna de Heparina fueron finalmente purificadas en una cromatografía de exclusión por tamaño, la cual presentó un pico único de CCT en el cromatograma. El producto fue evaluado en un gel SDS-PAGE dando como resultado en las fracciones del 20 al 30 (Ver esquema 1- c) proteína a una concentración de 12,2 mg/ml, pura y homogénea. La CCT obtenida se concentró hasta un volumen final de 300 μ l.

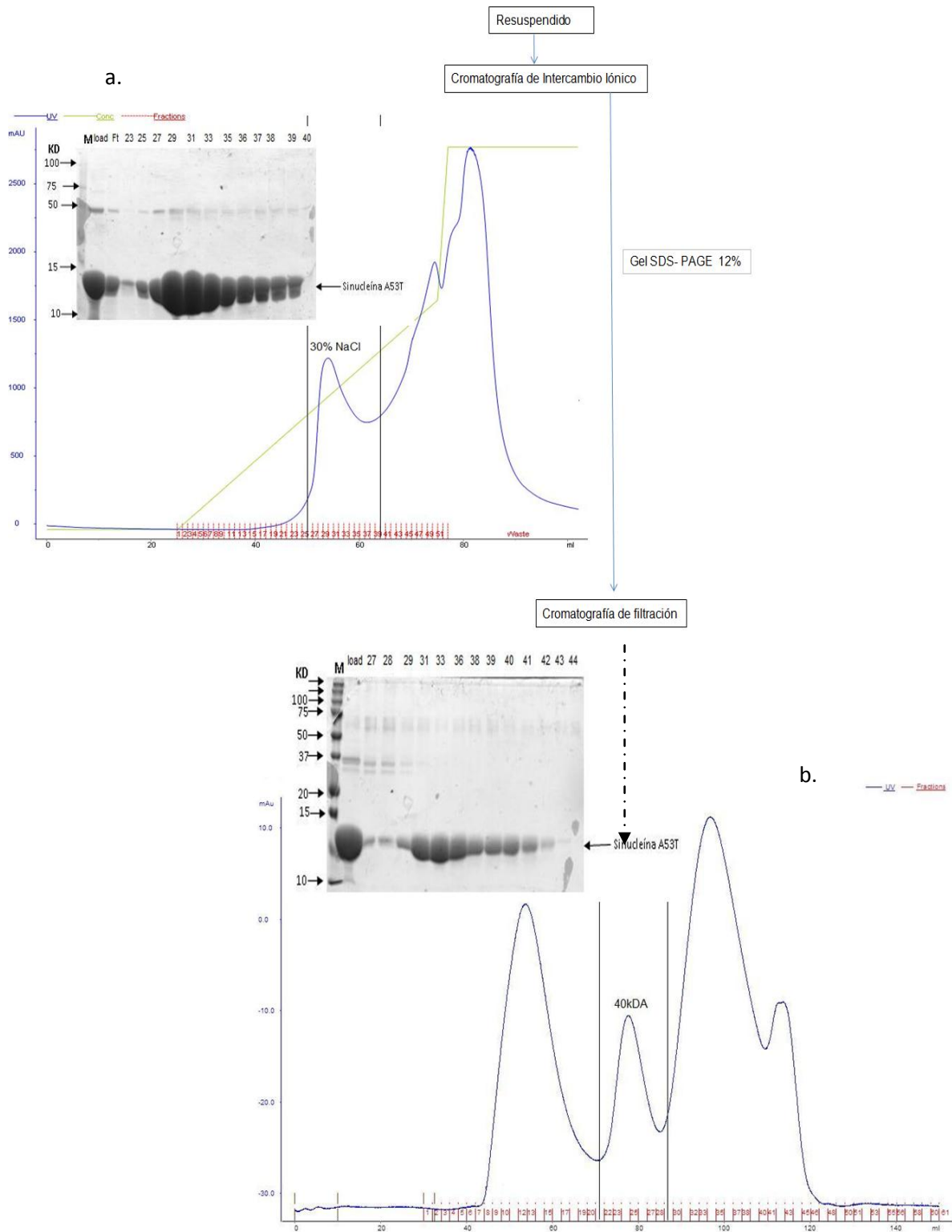
3.2. PURIFICACIÓN DE SINUCLEÍNA A53T

Se realizó la expresión de la proteína recombinante en bacterias *BL21* con el plásmido pT7-7, que ya tenía incorporado la secuencia completa para la proteína.

En el esquema 2 se observa el procedimiento utilizado para la expresión y purificación de la proteína, que es una modificación de la técnica descrita por Hoyer *et al* (2002). En la cromatografía de intercambio iónico se presenta una señal al 30% de NaCl, donde se recolectaron las fracciones del 23 al 49. Posteriormente se analizaron en un gel SDS-PAGE 12%, dando como resultado bandas de proteína entre un rango de 15 – 10 KD con la presencia de un contaminante a un nivel de 50 kDa (ver esquema 2-a). Se seleccionaron las fracciones más puras, desde la 26 a la 39, las cuales se pasaron por una cromatografía de filtración en gel donde se logró purificar totalmente la proteína,

como se puede apreciar en las bandas del carril 30 al 41 en el gel SDS-PAGE 12% del esquema 2-b. La señal obtenida en el cromatograma nos muestra una proteína que eluye a un nivel de 40 kDa, ya que se encuentra en su forma desplegada. Se determinó la concentración por espectrofotometría midiendo la absorbancia a 275nm de longitud de onda, teniendo en cuenta el coeficiente de extinción molar $5600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Hoyer *et al.*, 2002). Se logró purificar 2,4 ml de SyA53T a una concentración de 16,94 mg/ml partiendo de 4L de bacteria *BL21* en medio LB inducida con 1mM de IPTG.





Esquema 2. Procedimientos y resultados durante la purificación de Sinucleína A53T a) gel SDS-PAGE fracciones gradiente sacarosa. b) Cromatograma Q-Superose - Gel SDS-PAGE. c) Cromatograma Superdex 200- Gel SDS-PAGE

3.3. CINÉTICA DE FORMACIÓN DE FIBRAS AMILOIDES

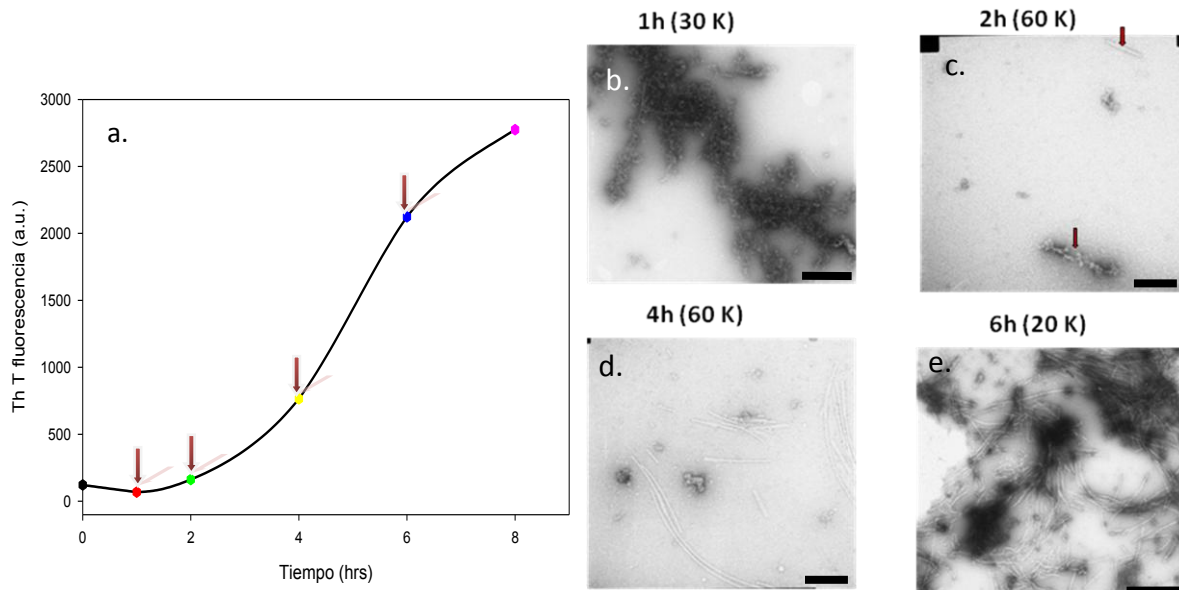


Figura 1. (a) Cinética de formación de fibras amiloides por fluorescencia de ThT y (b,c,d,e) micrografías de los puntos de la cinética señalados en la gráfica. Escala barra: d y c = 100nm; b = 200nm; e = 200nm

La SyA53T fue incubada (35 μ M A53T; 10mM ATP; 56mM KCl; 0,35 mM SDS) en condiciones adecuadas de pH, temperatura y agitación con el fin de conocer la cinética de formación de fibras amiloides in vitro por la medida de la fluorescencia del fluoróforo Th-T. Éste, al unirse a los amiloides, va incrementando la intensidad de la fluorescencia (Naiki, Higuchi et al. 1989); (LeVine and Scholten 1999). La figura 1a muestra la cinética de fibrilación representada por una curva sigmoideal con una fase de nucleación, otra de agregación acelerada y una reducción significativa en la fase de latencia, compatible con las diferentes cinéticas anteriormente publicadas (Wood, Wypych et al. 1999). Durante las 2 primeras hs, correspondientes a la fase de latencia, se observaron agregados amorfos (ver figura 1b- 1c). Durante el comienzo de la fase exponencial, alrededor de las 4h de fibrilación (ver figura 1d) se observó la formación de fibras cortas, las cuales continuarán su desarrollo y crecimiento hasta las 6h (figura 1e) con la formación de fibras largas sueltas o racimos. Se mantuvieron las condiciones durante 8 hs, tiempo en que se alcanza un estado de latencia final debido a la

saturación por la presencia de mayor cantidad de fibras completamente desarrolladas.

3.4 DETERMINACIÓN DE LA INHIBICIÓN DE LA AGREGACIÓN FIBRILAR POR CHAPERONINA CITOSÓLICA (CCT)

Después de haber evaluado la cinética de las fibras amiloides, se realizaron pruebas de inhibición de su crecimiento y desarrollo por la chaperonina citosólica. Como control se utilizó la proteína Rodanasa, con el fin de ver si la respuesta obtenida era por el efecto de tener una proteína en presencia de la Sinucleína A53T. Se dejaron incubando durante 10 hs a 37°C y agitación constante las diferentes muestras evaluadas. Para la medida de la fluorescencia con el fluoróforo Th-T se tomaron alícuotas cada 2 hs, y al llegar al punto de saturación de la Sinucleína A53T se paró la reacción.

Para la inhibición de la formación de fibras se evaluaron las siguientes muestras:

- i. 35 μ M SyA53T + 1mM ADP o 10mM ATP
- ii. 35 μ M Sinucleína A53T + 1mM ADP o 10mM ATP + 100 μ M Rodanasa
- iii. 35 μ M Sinucleína A53T + 3.5 / 2,2 / 1,6 μ M CCT + 1mM ADP o 10mM ATP
- iv. 3.5 μ M CCT + 1mM ADP o 10mM ATP

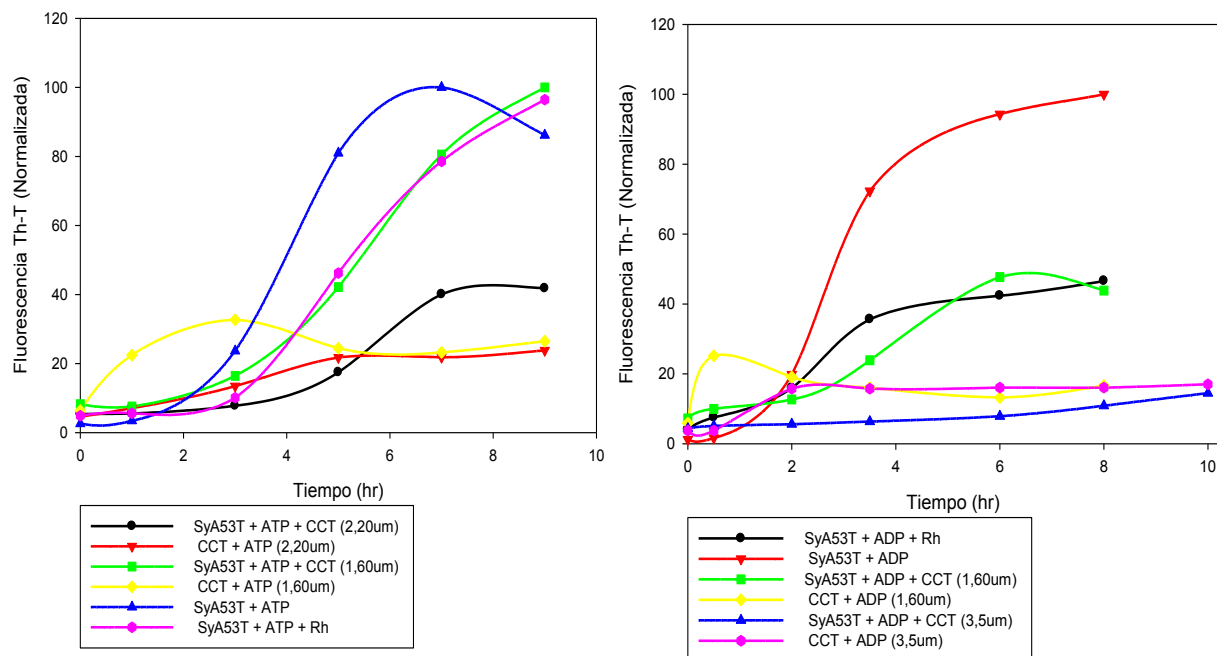


Figura 2. (a) Evaluación de la formación e inhibición de fibras de Sinucleína A53T en presencia de 2,2 / 1,6 μM CCT con el nucleótido ATP y **(b)** Evaluación de la formación e inhibición de fibras de Sinucleína A53T en presencia de 3,5 / 1,6 μM CCT con el nucleótido ADP

La formación de fibras amiloides por SyA53T no se vio afectada por la presencia de una proteína en su medio como podemos ver en la Fig. 2a (líneas azul y morado y en 2b líneas negra y roja). La curva sigmoidal para SyA53T + Rodanasa con el nucleótido ATP o ADP muestra una progresión temporal desde unos niveles bajos al inicio, ya que aun no se ha dado la formación de fibras por lo cual la unión del fluoroforo Th-T es indetectable continuando con una aceleración (fase exponencial) hasta llegar a una saturación a un tiempo máximo de 9 hs. Este tipo de curva se obtuvo también para la SyA53T + Nucleótido ATP o ADP en los diferentes experimentos realizados. Se analizaron alícuotas de las muestras por microscopia electrónica con el fin de observar el tipo de fibra desarrollada por la SyA53T en presencia o ausencia de Rodanasa, encontrándose gran cantidad de fibras largas sueltas y formando racimos entre ellas como también agregados amorfos alineados (Figura 3).

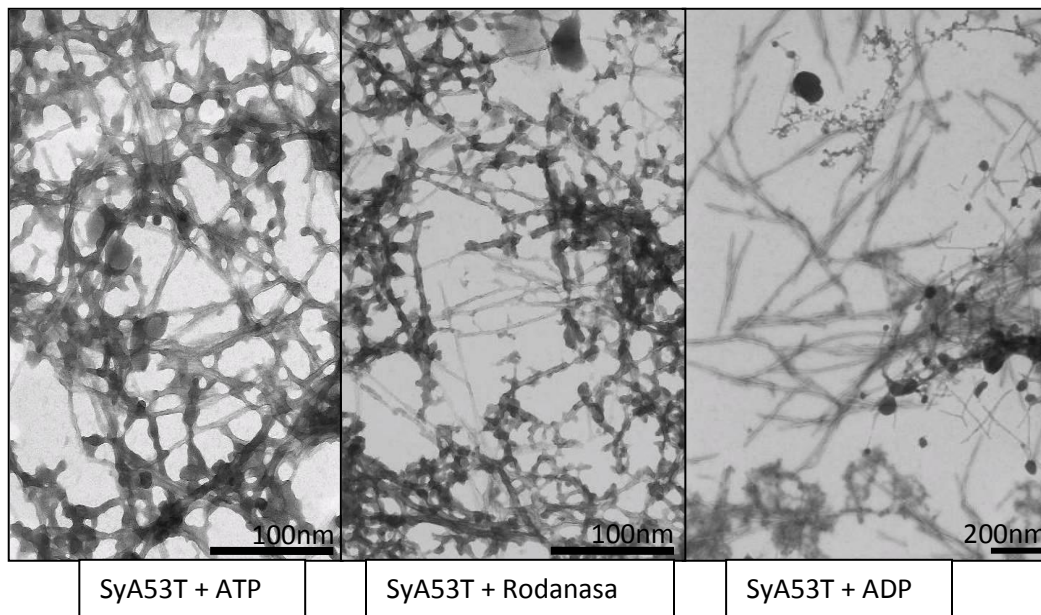


Figura 3. Determinación de fibras amiloides por Microscopia electrónica de transmisión

. La figura 2 (a-b) nos muestra diferencias significativas entre la formación de fibras por SyA53T en presencia y ausencia de CCT a diferentes concentraciones, ya que la unión del fluoróforo Th-T es poco detectable. Para $3,5\mu\text{M}$ CCT + ADP se obtuvo menor fluorescencia debido a que la chaperonina (figura 2b, línea negra) reduce la formación de fibras, y las que se forman son cortas (figura 4a). Sin embargo, La acción de $2,2\mu\text{M}$ CCT + ATP sobre la formación de fibras fue constante durante las 5 primeras hs, luego hay un aumento de la fluorescencia (ver figura 2a, línea negra), lo que nos indica que la chaperonina posiblemente forma agregados y reduce su capacidad de acción sobre las fibras de SyA53T. Sin embargo, la cantidad y longitud de las fibras es mucho menor que en ausencia de CCT (ver figura 4b). Se evaluó una concentración menor de CCT ($1,6\mu\text{M}$) a iguales condiciones de las pruebas anteriores en cuanto a incubación y relación de concentración de la Sinucleína A53T y la Rodanasa, con los nucleótidos ATP y ADP respectivamente. La figura 2a línea verde, nos muestra la curva de SyA53T +ATP + CCT con valores de fluorescencia similares a los leídos para el control con Rodanasa (Figura 2a línea morada), lo cual nos indica que a una concentración baja de chaperonina su efecto sobre las fibras es casi nulo, a diferencia de la

acción de $1,6\mu\text{M}$ CCT con Sinucleina y ADP donde el efecto durante las 5 primeras hs de incubación se observó una baja detección del fluoroforo Th-T (ver figura 2b, línea verde), posiblemente por la poca formación y crecimiento de las fibras. A partir de 6 a 10 hs se evidenció un aumento de la fluorescencia para dicha muestra llegando a valores similares obtenidos en Sinucleina A53T sola (Figura 2b línea roja) en 5 hs de incubación.

Se tomaron alícuotas luego de la incubación durante 10 hs para ser analizadas por microscopia electrónica donde se observaron estructuras típicas de fibras amiloides diferentes para cada concentración y nucleótido. La figura 4a nos muestra una fibra corta (flecha azul) desarrollada por SyA53T en presencia de la chaperonina a una concentración de $3,5\mu\text{M}$. Después de 10 hs de incubación, se puede apreciar en la misma figura a CCT (flecha roja) rodeando la fibra y sobre ella aparentemente unida, la figura 4b nos permite apreciar los agregados amorfos que se crean sobre una fibra larga en racimo al incubar durante 10 hs la proteína amiloide en presencia de $2,2\mu\text{M}$ CCT en presencia de ADP.

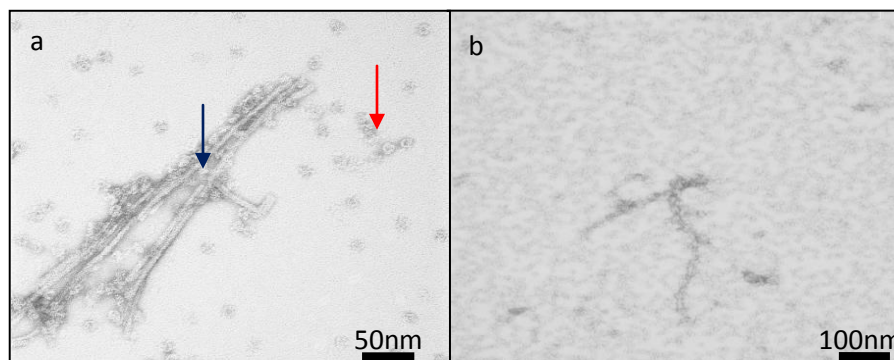


Figura 4. Fotografía por microscopia electrónica **(a)** $3,5\mu\text{M}$ CCT + SyA53T + ADP, **(b)** $2,2\mu\text{M}$ CCT + SyA53T + ADP.

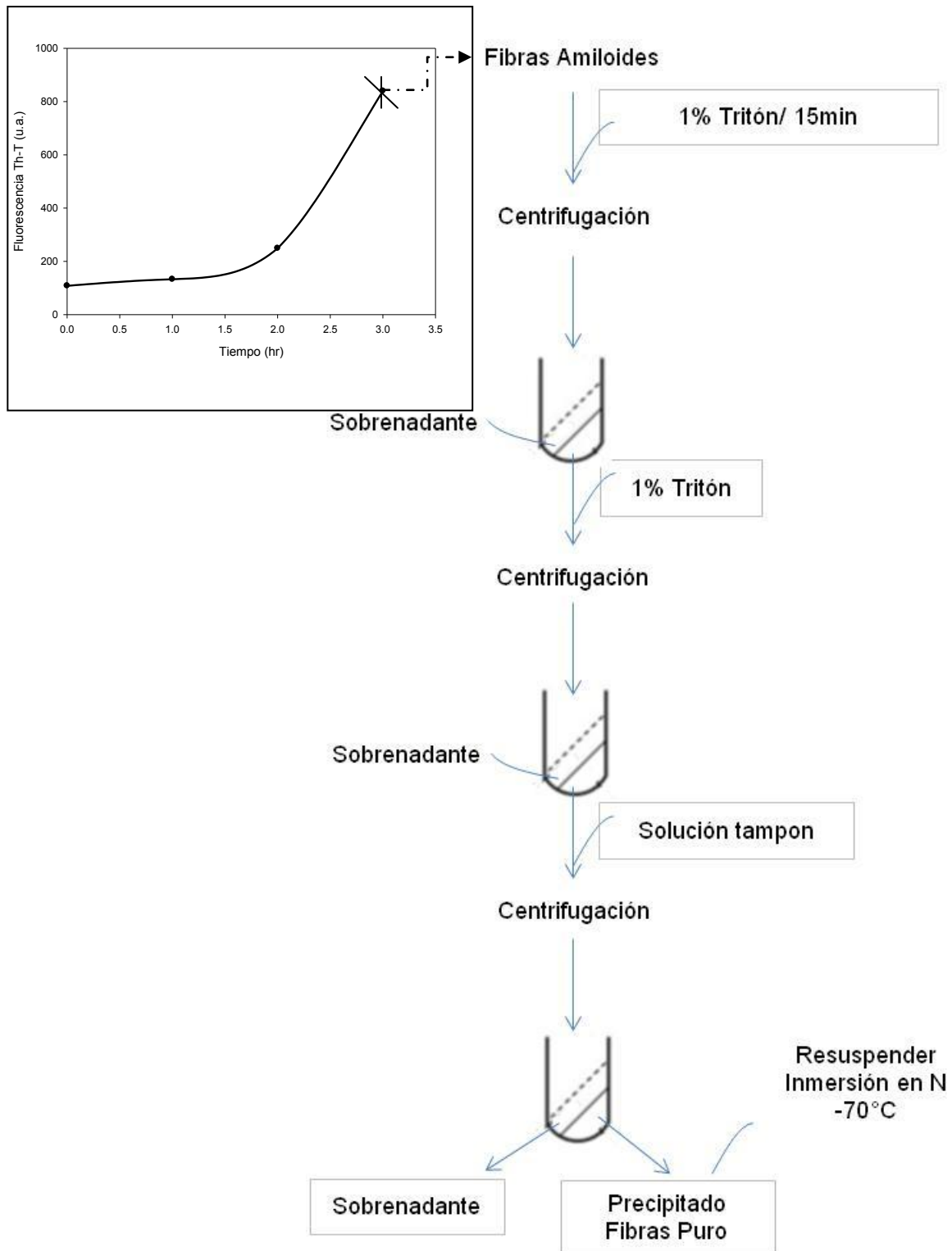
3.5. PURIFICACIÓN DE FIBRAS AMILOIDES

Con el fin de determinar la unión entre las fibras y la chaperonina CCT como también la formación de complejos entre ellas se requería contar con un volumen considerable de fibras amiloides sin presencia de agregados y monómero de SyA53T, por lo que se investigaron los procedimientos clásicos para analizar los depósitos de amiloides, los cuales en general incluyen purificación física combinada con diferentes métodos de solubilización. La metodología ha sido adaptada de los protocolos existentes para estudiar lesiones amiloides (Rostagno *et al* 2009), mezclando las fibras cortas con diferentes concentraciones de detergente y tiempos de exposición, como se describe a continuación:

- (i) 0,5% SDS por 10 min a 4°C, luego 2 centrifugaciones a 14000 rpm por 30 min a 4°C.
- (ii) 1% tritón por 15 min a 4°C, luego 3 centrifugaciones a 57000 rpm por 60 min a 4°C.
- (iii) 2% tritón por 15 min a temperatura ambiente, centrifugación a 57000 rpm por 60 min a 10°C, 2% tritón por 15 min a temperatura ambiente, luego 3 centrifugaciones a 57000 rpm por 60 min a 10°C.
- (iv) 1% tritón por 30 min a temperatura ambiente, centrifugación a 57000 rpm por 60 min a 10°C, 1% tritón por 10 min a temperatura ambiente, luego 2 centrifugaciones a 57000 rpm por 60 min a 10°C.
- (v) 1% tritón por 15 min a temperatura ambiente, centrifugación a 57000 rpm por 60 min a 10°C, 1% tritón por 15 min a temperatura ambiente, luego 2 centrifugaciones a 57000 rpm por 60 min a 10°C.
- (vi) 1% tritón por 15 min a temperatura ambiente, centrifugación a 57000 rpm por 60 min a 10°C, 1% tritón luego 2 centrifugaciones a 57000 rpm por 60 min a 10°C.

- (vii) 0,5% tritón por 15 min a temperatura ambiente, centrifugación a 57000 rpm por 60 min a 10°C, 0,5% tritón por 15 min a temperatura ambiente, luego 2 centrifugaciones a 57000 rpm por 60 min a 10°C.

Al observar por microscopia electrónica el precipitado final en cada uno de los experimentos se observó la pureza de las fibras cortas obtenidas, en algunos casos no muy puros, ya que aun presentaban agregados amorfos que no se logro solubilizar y/o separar durante los ciclos de centrifugación con detergente. El esquema 3 nos muestra cada unos de los pasos del procedimiento establecido finalmente para la purificación de fibras cortas puras.



Esquema 3. Procedimientos y resultados durante la purificación de Fibras cortas de Sinucleína A53T

Alícuotas de las fibras antes y después de la purificación se evaluaron mediante microscopía electrónica con la técnica de tinción negativa con acetato de Uranilo y se tomaron fotografías. La figura 5a muestra las fibras antes de iniciar la purificación donde se encontró agregados (flecha roja) rodeando pequeñas fibras (flecha azul) desarrolladas durante la incubación, al aplicar la separación física por ultra centrifugación con 1% Triton se logró separar los agregados y monómero remanente de SyA53T de las fibras cortas como se puede apreciar en la figura 5b, y figura 5c donde se observan agregados presentes en el sobrenadante final.

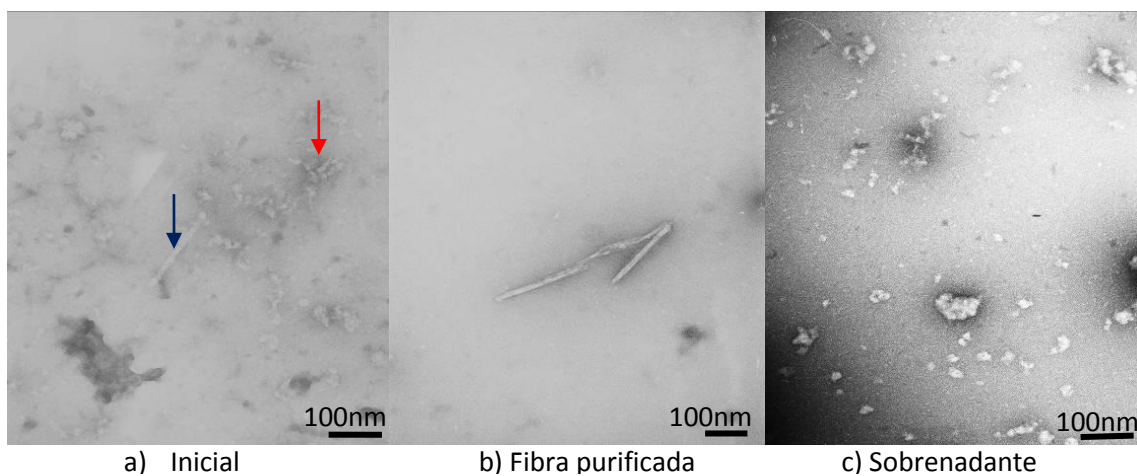


Figura 5. Determinación de la pureza de fibras cortas por microscopía electrónica

Se realizó un gel SDS-PAGE 12% con el precipitado de fibras cortas puro con el fin de observar que no hubiese contaminación remanente o adquirida durante el proceso de purificación. El gel muestra la aparición de una banda única, del tamaño descrito para monómeros de α -sinucleína y no aparece otra banda, aún cargando más cantidad.

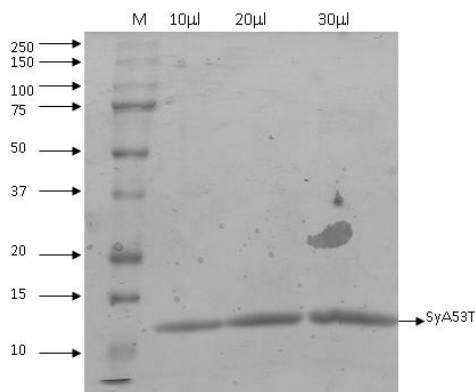
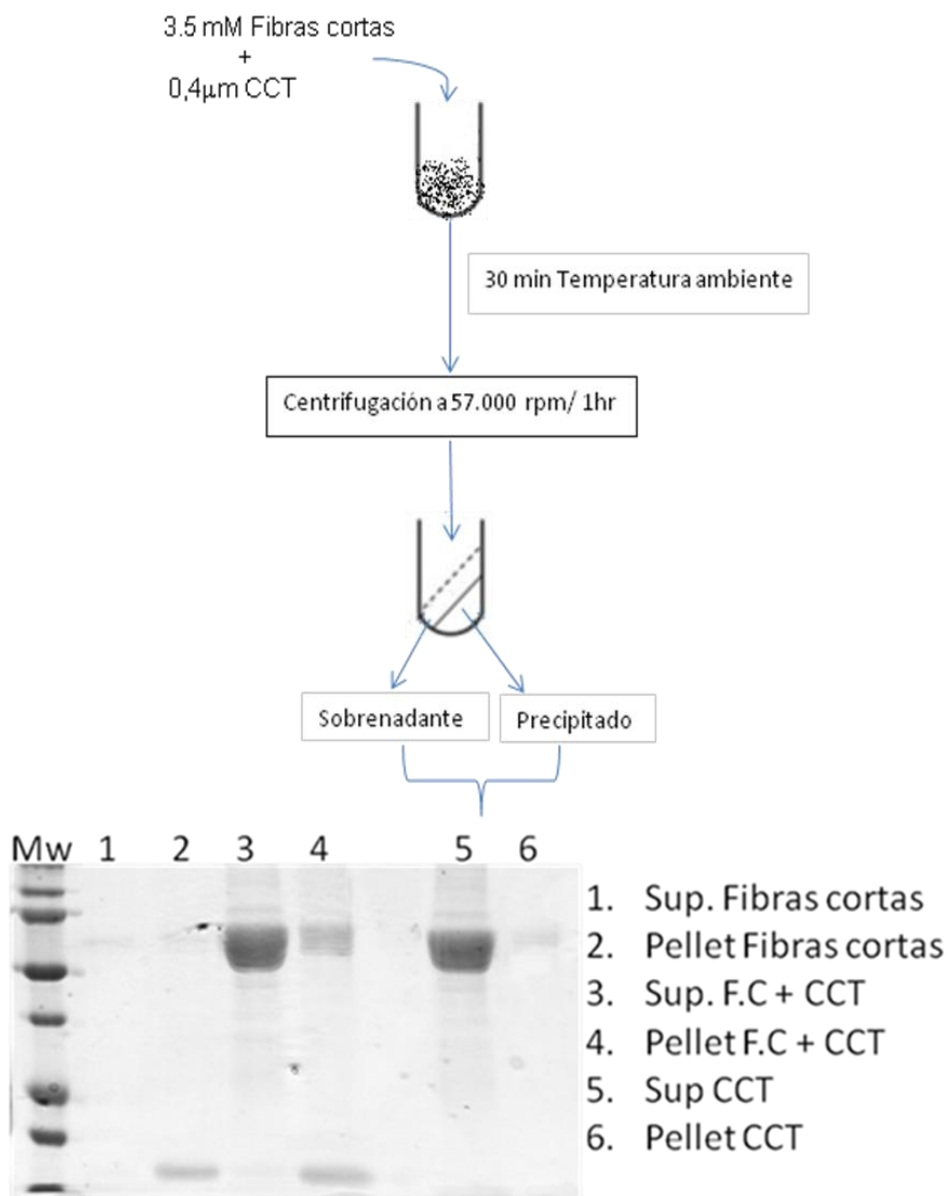


Figura 6. Gel de SDS-PAGE 12% del precipitado de fibras cortas

3.6. CARACTERIZACIÓN DE LA INTERACCIÓN DE FIBRAS Y CHAPERONINA CITOSOLICA (CCT)



Esquema 4. Interacción de CCT con fibras cortas de SyA53T

Se evaluó la unión de la chaperonina citosólica a las fibras cortas incubándolas durante 30 minutos a temperatura ambiente sin agitación, posteriormente fueron centrifugadas y analizadas por un gel de SDS-PAGE 12%

con el fin de analizar cualitativamente si hay unión entre la chaperonina y las fibras amiloides (ver esquema 4) el cual nos presenta para el precipitado de fibra sola en el carril 2 una banda con una moralidad aparente de 15-10kDa. En cuanto al sobrenadante de esta muestra en el carril 1, no se evidenció la presencia de ninguna banda lo que indica que las fibras caen completamente al precipitado. El precipitado de las fibras cortas en presencia de CCT refleja la formación de dos bandas en el carril 4, la primera a un peso de 60kD reportada anteriormente como CCT la cual es de un tamaño e intensidad mayor que la banda obtenida del precipitado de la muestra de CCT sola en el carril 6, este aumento se debió a que la chaperonina citosólica si se une a las fibras cortas durante la incubación. Por consiguiente cuando no hay fibras no se evidencia CCT en el sedimento ya que se queda prácticamente toda en el sobrenadante (ver esquema 3, carril 5). La unión se cuantificó analizando el gel con el software ImageJ 1.32 con el que se puede cuantificar los pixeles de cada banda asumiendo que son un indicador del % CCT unida a las fibras, según lo obtenido en cada carril se tiene un 20% de unión lo que corresponde a $0,08\mu\text{M}$ de CCT unida a las fibras amiloides y $0,32\mu\text{M}$ de CCT sin unirse durante la incubación

3.7 CARACTERIZACIÓN DE LA INTERACCIÓN DEL MONOMERO DE SINUCLEINA A53T Y LA CHAPERONINA CITOSOLICA (CCT)

Para determinar si se presenta una interacción intermolecular entre CCT y el monómero SyA53T, se incubaron las proteínas a una relación molar de 1:10 con agitación y sin agitación, también se evaluó con SyA53T desnaturalizada sin agitación. A continuación se resolvió la mezcla en un gel de poliacrilamida nativo. El oligómero CCT con un peso molecular de 960 kDa, migró con una movilidad diferente a SyA53T $\approx 16\text{kDa}$ (Figura 7). La banda de CCT, se escindió y se corrió en un gel de acrilamida desnaturalizante, el carril 2 corresponde al control de

movilidad para CCT y los carriles 3, 5, 6 y 8 corresponden al control de movilidad para Sinucleína teniendo en cuenta los tratamientos. (Ver figura 8).

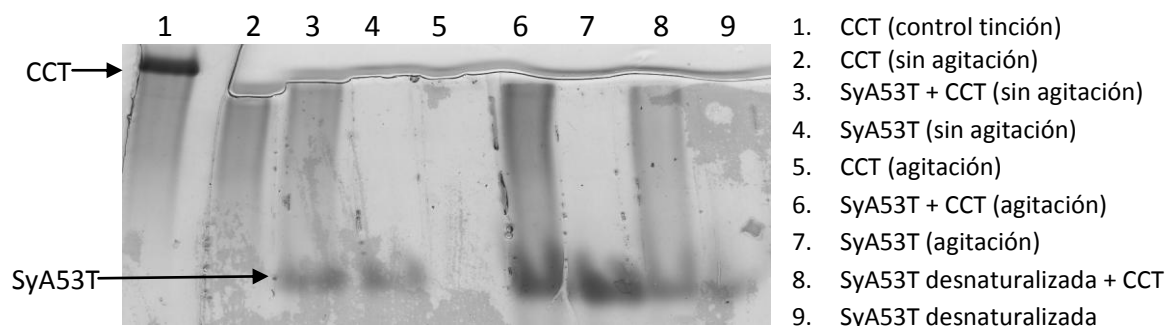


Figura 7. Determinación de la presencia de CCT y SyA53T en cada una de las muestras por Gel Nativo 6,5%

Al migrar las muestras en el gel SDS-PAGE se manifestó la formación de una única banda a 60kD en los carriles 4, 7 y 9 (figura 8) pertenecientes a la incubación del monómero y la chaperonina. Al no haber una banda a 16kD la cual sería de la Sinucleína que se hubiera unido a la chaperonina, y solo observar la formación de la banda correspondiente a CCT nos indica que no existe interacción alguna entre las proteínas.

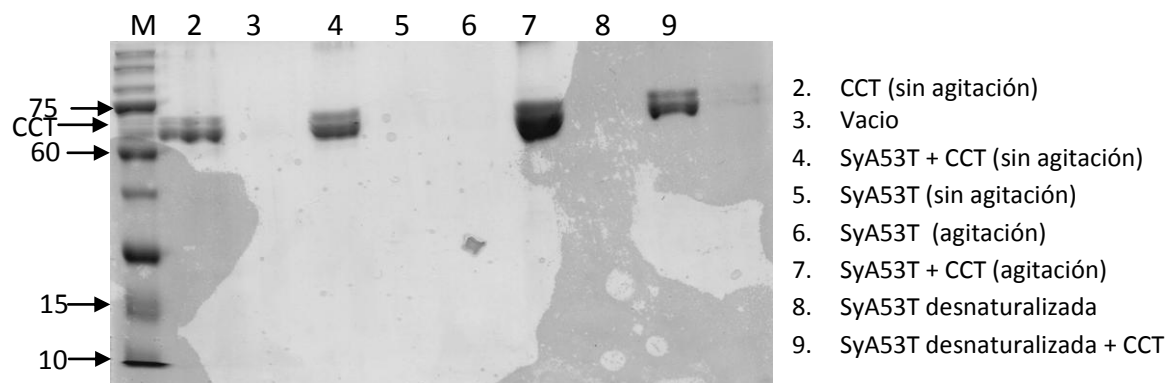


Figura 8. Interacción entre CCT y el monómero de SyA53T

Todos los experimentos reportados en este trabajo de investigación fueron realizados varias veces manteniendo las condiciones establecidas en materiales y métodos, con el fin de tener replicas consecutivas de las pruebas que nos permitieran ver si los resultados obtenidos eran constantes.

4. DISCUSIÓN

El objetivo de este trabajo de investigación es determinar la capacidad de inhibición de la formación de fibras amiloides de Sinucleína A53T por la chaperonina citosólica, por lo que fue necesaria la purificación de la proteína amiloide como también de CCT a una concentración adecuada para los ensayos realizados durante el trabajo. La chaperonina CCT se purificó siguiendo el protocolo propuesto por (Martin-Benito et al. 2002). Como puede observarse en la cromatografía de afinidad (esquema 1b), CCT eluye a 40% de sal (0,4M NaCl), rango en el cual el pico correspondiente a CCT se superpone a una señal de proteína que eluye a menor concentración de sal. Esto redujo las fracciones con CCT pura recogida durante esta etapa. Se propone en futuras purificaciones aumentar el volumen del gradiente de NaCl para lograr separar las dos señales, permitiendo una mejor purificación de la chaperonina.

Al tener las proteínas purificadas a concentraciones adecuadas se inició con el estudio del objetivo propuesto en este trabajo, y partiendo del conocimiento de que muchos factores pueden inducir la agregación y la formación de fibras de Sinucleína (Hashimoto, Hsu et al. 1998), se indujo en condiciones *in vitro* esta capacidad de fibrilación de la proteína con el fin de conocer su cinética durante el desarrollo y crecimiento de fibras amiloides. Al asumir el incremento de la intensidad de la fluorescencia emitida por el fluoroforo Th-T como un indicador de la presencia y/o formación de fibras, el comportamiento obtenido nos refleja una curva sigmoideal (figura 1a) donde se identifican claramente tres fases, de latencia, de crecimiento y de saturación. Estudios anteriores han reportado este mismo comportamiento sigmoideal durante el proceso de fibrilogenesis de la Sinucleína, como también de su mutante A53T (Naiki et al, 1989; Wood et al, 1999). En ellos se define la cinética como un proceso dependiente de la tasa de

nucleación de la proteína, ya que durante el desarrollo y crecimiento de las fibras se presenta un mecanismo de nucleación siendo el tiempo en que la solución sub-saturada de la proteína amiloide va produciendo agregados para continuar con un mecanismo de elongación donde se ha iniciado la formación y crecimiento de las fibras. Según Wood et al (1999) el mutante A53T tiene una fase de elongación acelerada, lo que es consecuente con lo obtenido en nuestra investigación ya que se consigue la saturación o máxima producción de fibras en 12 hs de incubación. En cambio, con α -Sinucleína wt se produce a las 48h de incubación según pruebas realizadas anteriormente por la Dra. Begoña Sot Sanz. El análisis por microscopia electrónica de alícuotas tomadas cada 2 hs nos permitió observar y/o corroborar la presencia de agregados amorfos de proteína (fase adaptación), fibras cortas durante el inicio de la fase exponencial y fibras largas formando racimos cuando se ha logrado el máximo de elongación, llegando así a la fase estacionaria. Por lo tanto, la proteína purificada durante este trabajo de fin máster tiene la capacidad de producir fibras amiloides, así como de reproducir la cinética de formación de fibras amiloides de Sinucleína A53T descrita por otros laboratorios.

Conociendo la capacidad de fibrilación in vitro de SyA53T, se prosiguió con la evaluación de la acción de la chaperonina citosólica sobre dicho proceso. Las concentraciones de CCT evaluadas presentaron diferencias demostrativas, siendo la de 3,5 μ M CCT y ADP la que mayor efecto tuvo sobre la reducción en la formación y crecimiento de fibras amiloides, ya que la curva obtenida (figura 2b, línea azul) no presentó una fase de elongación acelerada, etapa reportada anteriormente en la cinética en la cual ya se evidencia gran cantidad de fibras. Al observar por microscopia electrónica alícuotas tomadas a las 10 h de incubación se presenciaron a 100K de amplificación pequeñas fibras rodeadas de CCT coincidiendo con las fibras observadas en el análisis microscópico realizado al inicio de la fase exponencial en la cinética de fibrilación. Se podría decir que al

estar presente la chaperonina CCT a dicha concentración en el medio, la Sinucleína A53T se mantiene entre la parte final del mecanismo de nucleación y el inicio del mecanismo de elongación. Éste efecto decrece al disminuir la concentración de CCT utilizada. A $1.6 \mu\text{M}$ CCT y ADP (figura 2b, línea verde) alarga la fase de nucleación, y aunque existe aumento de fluorescencia, ésta no llega a los niveles de sinucleína sola. Éste hecho queda demostrado por microscopía electrónica, ya que se observa pocas fibras largas. En conclusión, CCT “congela” el proceso de elongación en los momentos iniciales. Éste efecto es dependiente de la concentración, demostrándose que es un efecto específico que probablemente depende de la unión entre CCT y sinucleína (monómero, agregado o fibra).

Cuando se utilizó el nucleótido ATP en vez de ADP también se observó efecto inhibitor de la formación de fibras por CCT a $2.2 \mu\text{M}$ CCT. Sin embargo, el efecto de $1,60 \mu\text{M}$ CCT + ATP sobre el proceso de fibrilación fue casi nulo, obteniendo una curva (figura 2a, línea verde) con una fase exponencial acelerada después de 2 hs de incubación como ocurre cuando se tiene SyA53T en ausencia de la chaperonina citosólica, aunque en este caso la fase de elongación es más lenta. Por tanto, en presencia de ATP, CCT disminuye su efecto sobre la fibrilación de la sinucleína. Dado que la unión e hidrólisis de ATP producen el plegamiento y la liberación del sustrato, que volverá a unirse tras la hidrólisis, si no está plegado correctamente cuando CCT esté unida a ADP, estos resultados muestran que CCT no es capaz de “plegar” la Sinucleína. Su efecto inhibitor de la formación fibrilar debe ser por tanto a que a la unión de CCT no permite la elongación de las fibras. En cuanto a los ensayos de inhibición de la formación de fibras hace falta evaluar la acción de la concentración de $3,5 \mu\text{M}$ CCT con el nucleótido ATP y la concentración de $2,2 \mu\text{M}$ CCT con el nucleótido ADP incubándolos con la concentración de Sinucleína establecida ($35 \mu\text{M}$) para identificar si mejora o reduce su capacidad de reducir e inhibir la formación de fibras amiloides.

Los resultados obtenidos en cuanto a la acción de CCT sobre proteínas amiloides patogénicas coinciden con los reportados por Tam et al. (2006), quienes han mostrado que CCT interacciona físicamente con la huntingtina (htt) e inhibe su agregación por la unión temprana con precursores de fibras amiloides, tales como monómeros y/u oligómeros pequeños. Además, Behends et al 2006 han demostrado que en presencia de CCT la huntingtina únicamente forma fibras cortas, sugiriendo que CCT inhibe el crecimiento de fibras al bloquear la adición de nuevos monómeros, efecto que estuvo condicionado a la concentración coincidiendo con los resultados obtenidos en este trabajo de investigación. Esta forma de inhibición puede ser debida a que CCT une a los monómeros o a los extremos de las fibras al inicio de su formación. Tal como muestra los resultados obtenidos durante el desarrollo de la investigación (figura 8), no existe interacción entre CCT y SyA53T monómero.

Para evaluar la unión de la chaperonina citosólica a las fibras cortas, primero se procedió a la purificación de las mismas, probando diferentes concentraciones de detergentes y tiempo de exposición basándonos en anteriores estudios (Rostagno *et al* 2009). Se logró diseñar un protocolo de purificación (ver esquema 3) de fibras cortas obtenidas *in vitro*, las cuales fueron separadas completamente de los agregados y monómero de proteína. Al realizar la prueba de purificación con SDS como disolvente se observó la precipitación del mismo al entrar en contacto con el KCl presente en la solución tampón usada para generar las fibras, por lo que este tratamiento fue descartado y se continuó evaluando las condiciones con Triton X-100. Se seleccionó 10°C como la temperatura para realizar los ciclos de centrifugación ya que el detergente, al estar a bajas temperaturas (4°C), presento aglomeración bajando su capacidad de acción. Al observar alícuotas del precipitado obtenido por el protocolo seleccionado se

evidenció la presencia de fibras cortas puras y en el sobrenadante se observaron los agregados y monómero de proteína retirado.

Los experimentos de co-precipitación de CCT y fibras cortas demuestran que posiblemente se forme un complejo chaperonina-fibra. Dicho complejo se intentó observar por microscopia electrónica tomando alícuotas del precipitado de fibras + CCT, pero no fue posible identificar claramente el complejo ya que se tenía alrededor una cantidad considerable de CCT, por lo que se debe mejorar la técnica de purificación del complejo de tal forma que se pueda obtener únicamente las fibras con CCT unidas para ser analizadas por microscopia.

El grupo de investigación continuará con el trabajo desarrollando un protocolo de purificación con gradientes de sacarosa o glicerol para poder ver los complejos formados entre la chaperonina citosólica y las fibras amiloides de Sinucleína A53T. También se deben realizar pruebas que nos permitan cuantificar claramente el porcentaje de unión evaluando diferentes concentraciones de CCT. Recientes estudios reportan a la chaperona Hsp70 con la capacidad de actuar sobre los agregados y proceso de fibrilación de α -sinucleína como también de su mutante A53T (Donmez et al, 2012). Igualmente hay trabajos previos de la cooperación de CCT con el sistema de Hsp70 actuando de manera clave en la defensa celular contra el mal plegamiento de proteínas amiloides (Behends et al, 2006). Estos antecedentes y los resultados reportados en esta investigación llevan en un futuro a continuar analizando la cooperación de CCT con otras chaperonas en la inhibición de la agregación fibrilar.

BIBLIOGRAFIA

- Arana, J. M. S. D. and F. M. Teruel (2000). Enfermedades neurodegenerativas.
- Bourhim, M., M. Kruzel, et al. (2006). "Linear quantitation of Abeta aggregation using Thioflavin T: Reduction in fibril formation by colostrinin." *J Neurosci Methods*.
- Carrascosa, J. L., O. Llorca, et al. (2001). "Structural comparison of prokaryotic and eukaryotic chaperonins." *Micron* 32(1): 43-50.
- Conway, K. A., J. D. Harper, et al. (2000). "Fibrils formed in vitro from alpha-synuclein and two mutant forms linked to Parkinson's disease are typical amyloid." *Biochemistry* 39(10): 2552-63.
- Conway, K. A., S. J. Lee, et al. (2000). "Accelerated oligomerization by Parkinson's disease linked alpha-synuclein mutants." *Ann N Y Acad Sci* 920: 42-5.
- Conway, K. A., J. C. Rochet, et al. (2001). "Kinetic stabilization of the alpha-synuclein protofibril by a dopamine-alpha-synuclein adduct." *Science* 294(5545): 1346-9.
- Cowan, N. J. (1998). "Mammalian cytosolic chaperonin." *Methods Enzymol* 290: 230-241.
- Cuellar, J., J. Martin-Benito, et al. (2008). "The structure of CCT-Hsc70 NBD suggests a mechanism for Hsp70 delivery of substrates to the chaperonin." *Nat Struct Mol Biol* 15(8): 858-64.
- Dev, K. K., H. van der Putten, et al. (2003). "Part I: Parkin-associated proteins and Parkinson's disease." *Neuropharmacology* 45(1): 1-13.
- Donmez, G., A. Arun, et al. (2012). "SIRT1 Protects against α -Synuclein Aggregation by Activating Molecular Chaperones." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 32: 124-32.
- Eriksen, J. L., T. M. Dawson, et al. (2003). "Caught in the Act: α -Synuclein Is the Culprit in Parkinson's Disease." *Neuron* 40(3): 453-456.

- Farr, G. W., E. C. Scharl, et al. (1997). "Chaperonin-mediated folding in the eukaryotic cytosol proceeds through rounds of release of native and nonnative forms." *Cell* 89(6): 927-37.
- Feldman, D. E., V. Thulasiraman, et al. (1999). "Formation of the VHL-elongin BC tumor suppressor complex is mediated by the chaperonin TRiC." *Mol Cell* 4(6): 1051-1061.
- Frydman, J., E. Nimmesgern, et al. (1992). "Function in protein folding of TRiC, a cytosolic ring complex containing TCP-1 and structurally related subunits." *EMBO journal (Print)* 11(13): 4767-4778.
- Gao, Y., J. O. Thomas, et al. (1992). "A cytoplasmic chaperonin that catalyzes beta-actin folding." *Cell* 69(6): 1043-50.
- Gebauer, M., R. Melki, et al. (1998). "The chaperone cofactor Hop/p60 interacts with the cytosolic chaperonin-containing TCP-1 and affects its nucleotide exchange and protein folding activities." *J Biol Chem* 273(45): 29475-80.
- George, J. M. (2001). "Protein family review The synucleins." *Genome*: 1-6.
- Gupta, R. S. (1990). "Sequence and structural homology between a mouse T-complex protein TCP-1 and the 'chaperonin' family of bacterial (GroEL, 60-65 kDa heat shock antigen) and eukaryotic proteins." *Biochem Int* 20(4): 833-41.
- Hashimoto, M., L. J. Hsu, et al. (1998). "Human recombinant NACP/alpha-synuclein is aggregated and fibrillated in vitro: relevance for Lewy body disease." *Brain Res* 799(2): 301-6.
- Horwich A, L., B. Low K, et al. (1993). "Folding in vivo of bacterial cytoplasmic proteins : role of GroEL." *Cell (Cambridge)* 74(5): 909-917.
- Hoyer, W., T. Antony, et al. (2002). "Dependence of α -Synuclein Aggregate Morphology on Solution Conditions." *Journal of Molecular Biology* 322: 383-393.
- Kubota, H., G. Hynes, et al. (1995). "The chaperonin containing t-complex polypeptide (TCP-1): Multisubunit machinery assisting in protein folding and assembly in the eukaryotic cytosol." *Eur. J. Biochem* 230: 3-16.

- Lee, Daekyun, et al. (2002). α -Synuclein exhibits competitive interaction between calmodulin and synthetic membranes. Oxford, ROYAUME-UNI, Wiley-Blackwell.
- Leroux, M. R. and E. U. Hartl (2000). " Protein folding: Versatility of the cytosolic chaperonin TRiC/CCT." *Curr. Biol* 10: R260-264.
- LeVine, H., 3rd and J. D. Scholten (1999). "Screening for pharmacologic inhibitors of amyloid fibril formation." *Methods Enzymol* 309: 467-76.
- Lewis, S. A., G. Tian, et al. (1996). "Chaperonin-mediated folding of actin and tubulin." *Cell BioL* 132: 1-4.
- Lewis, V. A., G. M. Hynes, et al. (1992). "T-complex polypeptide-1 is a subunit of a heteromeric particle in the eukaryotic cytosol." *Nature* 358(6383): 249-52.
- Martin-Benito, J., J. Boskovic, et al. (2002). "Structure of eukaryotic prefoldin and of its complexes with unfolded actin and the cytosolic chaperonin CCT." *Embo Journal* 21(23): 6377-6386.
- Martín-Benito, J., J. Grantham, et al. (2007). "The inter-ring arrangement of the cytosolic chaperonin CCT." *EMBO reports* 8: 252-7.
- Melki, R. and N. J. Cowan (1994). "Facilitated folding of actins and tubulins occurs via a nucleotide-dependent interaction between cytoplasmic chaperonin and distinctive folding intermediates." *Mol Cell Biol* 14(5): 2895-904.
- Murrell, J. R., D. Koller, et al. (1997). "Familial Multiple-System Tauopathy with Presenile Dementia Is Localized to Chromosome 17." *The American Journal of Human Genetics* 61(5): 1131-1138.
- Naiki, H., K. Higuchi, et al. (1989). "Fluorometric determination of amyloid fibrils in vitro using the fluorescent dye, thioflavin T1." *Anal Biochem* 177(2): 244-9.
- Recchia, A., P. Debetto, et al. (2004). "Alpha-synuclein and Parkinson's disease." *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 18: 617-26.
- Rochet, J. C., K. A. Conway, et al. (2000). "Inhibition of fibrillization and accumulation of prefibrillar oligomers in mixtures of human and mouse-synuclein." *Biochemistry* 39(35): 10619-10626.

- Rommelaere, H., M. Van Troys, et al. (1993). "Eukaryotic cytosolic chaperonin contains t-complex polypeptide A and seven related subunits." *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(24): 11975-11979.
- Rostagno, A. and J. Ghiso (2009). "Isolation and biochemical characterization of amyloid plaques and paired helical filaments." *Curr Protoc Cell Biol* Chapter 3: Unit 3.33 3.33.1-33.
- Sanchez, E. R. and R. E. Erickson (1985). "Expression of the *Tep-1* locus of the mouse during early embryogenesis." *J. Embryol. Exp. Morphol* 89: 113-122.
- Schoehn, G., M. Hayes, et al. (2000). "Domain rotations between open, closed and bullet-shaped forms of the thermosome, an archaeal chaperonin." *J Mol Biol* 301(2): 323-332.
- Siegert, R., M. R. Leroux, et al. (2000). "Structure of the molecular chaperone prefoldin: Unique interaction of multiple coiled coil tentacles with unfolded proteins." *Cell* 103(4): 621-632.
- Silver, L. M., K. Artzt, et al. (1979). "A major testicular cell protein specified by a mouse T/t complex gene." *Cell BioL* 17: 275-284.
- Stoldt, V., E. Rademacher, et al. (1996). "The CCT eukaryotic chaperonin subunits of *Saccharomyces cerevisiae* and other yeasts " *Yeast* 12: 523-529.
- Takeda, A., T. Hasegawa, et al. (2006). "Mechanisms of neuronal death in synucleinopathy." *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2006.
- Tam, S., R. Geller, et al. (2006). "The chaperonin TRiC controls polyglutamine aggregation and toxicity through subunit-specific interactions." *Nature cell biology* 8: 1155-62.
- Thulasiraman, V., C. F. Yang, et al. (1999). "In Vivo Newly Translated Polypeptides Are Sequestered In A Protected Folding Environment." *EMBO journal (Print)* 18(1): 85-95.
- Tian, G., I. E. Vainberg, et al. (1995). "Specificity in chaperonin-mediated protein folding." *Nature* 375(6528): 250-3.
- Uéda, K., H. Fukushima, et al. (1993). "Molecular cloning of cDNA encoding an unrecognized component of amyloid in Alzheimer disease." *Proceedings of*

- the National Academy of Sciences of the United States of America 90: 11282-6.
- Valpuesta, J. M., J. Martín-Benito, et al. (2002). "Structure and function of a protein folding machine: the eukaryotic cytosolic chaperonin CCT." *FEBS letters* 529: 11-6.
- Viitanen, P. V., A. A. Gatenby, et al. (1992). "Purified chaperonin 60 (groEL) interacts with the nonnative states of a multitude of *Escherichia coli* proteins." *Protein Science* 1(3): 363-369.
- Volles, M. J., et al. (2002). Vesicle permeabilization by protofibrillar α -synuclein is sensitive to Parkinson's disease-linked mutations and occurs by a pore-like mechanism. Washington, DC, ETATS-UNIS, American Chemical Society.
- Willison, K. R. (1999). "Composition and function of the eukaryotic cytosolic chaperonin-containing TCP- 1. In "Molecular Chaperones and Folding Catalysts: Regulation, Cellular Function and Mechanisms"." B. Bukau, Ed(Harwood Academic Publishers, Amsterdam.): 555-671.
- Willison, K. R., K. Dudley, et al. (1986). "Molecular cloning and sequence analysis of a haploid expressed gene encoding t complex polypeptide 1." *Cell Biol* 44: 727-738.
- Willison, K. R. and J. Grantham (2001). "The roles of cytosolic chaperonin CCT in normal eukaryotic cell growth. In "Molecular Chaperones: Frontiers in Molecular Biology"." E Land, Ed(Oxford University Press, Oxford, UK.): 90-118.
- Willison, K. R. and A. L. Horwich (1996). "Structure and function of chaperonins in archaeobacteria and eukaryotic cytosol. In "The Chaperonins"." R, J. Ellis, Ed.(Academic Press, San Diego.): 107-136.
- Willison, K. R. and H. Kubota (1994). "The structure, function, and genetics of the chaperonin-containing TCP-1 (CCT) in eukaryotic cytosol. In "The Biology of Heatshock Proteins and Molecular Chaperones"." Spring Harbor Laboratory Press, New York.: 299-312.

- Wood, S. J., J. Wypych, et al. (1999). "alpha-synuclein fibrillogenesis is nucleation-dependent. Implications for the pathogenesis of Parkinson's disease." *J Biol Chem* 274(28): 19509-12.
- Yaffe, M. B., G. W. Farr, et al. (1992). "TCP1 complex is a molecular chaperone in tubulin biogenesis." *Nature* 358(6383): 245-8.
- Yébenes, H., P. Mesa, et al. (2011). "Chaperonins: two rings for folding." *Trends in biochemical sciences*: 1-9.