

# AGREGACIÓN DE ALFA-SINUCLÉINA Y DEGENERACIÓN PARKINSONIANA

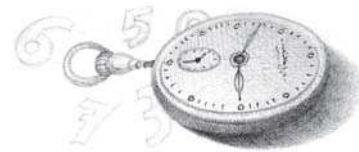
Emilio Fernández Espejo.

Universidad de Sevilla, Departamento de Fisiología Médica y Biofísica, Facultad de Medicina

\*Autor para remitir la correspondencia: Emilio Fernández Espejo

Laboratorio de Neurología Molecular y Neurofisiología (BIO127), Departamento de Fisiología Médica y Biofísica, Facultad de Medicina.

Av. Sánchez Pizjuán 4, 41009 Sevilla. E-mail: efespejo@us.es; Tel. 954556584, Fax 954551769.



La  $\alpha$ -sinucleína es la proteína principal de los cuerpos de Lewy, marcador anatomopatológico de la enfermedad de Parkinson. Dicha proteína puede ver alterada su conformación y adquirir capacidad autoagregante, lo que se relaciona con el depósito de agregados proteínicos en las neuronas y podría constituir un factor fisiopatológico importante en dicha enfermedad. Los agregados poseen fibrillas de  $\alpha$ -sinucleína alterada, y las moléculas se encuentran unidas entre sí por enlaces no covalentes y covalentes. La formación de enlaces no covalentes se relaciona con el aumento de la concentración de  $\alpha$ -sinucleína, daño mitocondrial, desestabilización neuronal, y fosforilación en el residuo de serina 129 de la molécula. Los enlaces covalentes se relacionan con fenómenos oxidativos que actúan sobre la molécula, principalmente peroxidación y nitrosilación de los residuos de tirosina 39, 125, 133 y 136. En mi laboratorio se ha detectado un aumento de la nitrosilación en los residuos de tirosina 125/136 en la  $\alpha$ -sinucleína sérica de enfermos de Parkinson. El estudio de esta proteína puede arrojar luz sobre los procesos moleculares que subyacen en muchas enfermedades neurodegenerativas del tipo  $\alpha$ -sinucleinopatías.

## La alfa-sinucleína

La  $\alpha$ -sinucleína es una proteína de 140 aminoácidos, con tres regiones diferenciadas. El extremo amino terminal está cargado positivamente, el segmento hidrofóbico central, entre los residuos 61 a 90 (también llamado el componente no-amiloideo o NAC), y el extremo carboxilo que está cargado negativamente (Uversky, 2007). Es una proteína de unión a lípidos como lo indica la repetición en el extremo amino de la secuencia “de fijación lipídica” KTKEGV. La  $\alpha$ -sinucleína posee cuatro residuos de tirosina, uno (Y39) cerca del extremo amino y tres (Y125, Y133, e Y136) cerca del extremo carboxilo. La figura 1 muestra un esquema de la proteína. El monómero proteico adopta una conformación colapsada alrededor del centro hidrofóbico, y antes se creía que cuando la proteína se unía a membranas o vesículas con fosfolípidos asumía una estructura alfa-helicoidal (Ueda y cols., 1993). En 2011 se detectó que la  $\alpha$ -sinucleína fisiológica no se encuentra en forma monomérica sino oligomérica, formando tetrámeros, y que en ellos cada cadena adopta una conformación alfa-helicoidal (Bartels y cols., 2011; Wang y cols., 2011). Estos tetrámeros se forman por uniones ditirosínicas entre las cadenas (Figura 1), y con dicha disposición espacial se localiza la proteína en las neuronas (principalmente en los terminales presinápticos), pero también en líquido cefalorraquídeo, espacio extracelular neuronal y sangre (Emmanouilidou y cols., 2011). En sangre el 99% se encuentra unida a la membrana de los glóbulos rojos y el resto en plasma (Barbour y cols., 2008). La existencia de  $\alpha$ -sinucleína en diversos fluidos se relaciona con el hecho que dicha proteína puede segregarse por las neuronas al medio extracelular y transportarse de neurona en neurona, fenómeno que podría estar involucrado en la progresión de la neurodegeneración en la enfermedad de Parkinson (EP).

## Las alfa-sinucleinopatías

La EP se incluye actualmente en el grupo de las llamadas  $\alpha$ -sinucleinopatías, lo que resalta la importancia patogénica de esta proteína. Este grupo de enfermedades incluye a la enfermedad de Parkinson, demencia de cuerpos de Lewy (CL), atrofia multisistémica y enfermedad de Alzheimer. Todas tienen en común el depósito anormal de  $\alpha$ -sinucleína en el citoplasma o neuritas de neuronas o de células gliales. En la enfermedad de Parkinson y en la demencia de cuerpo de Lewy, los depósitos de  $\alpha$ -sinucleína constituyen el componente principal de los cuerpos de Lewy y de las neuritas distróficas o de Lewy.

## Los cuerpos de Lewy

Los cuerpos de Lewy son agregados intraneuronales anormales de proteínas. Aparecen como masas esféricas que desplazan al resto de componentes celulares. Se han descrito dos

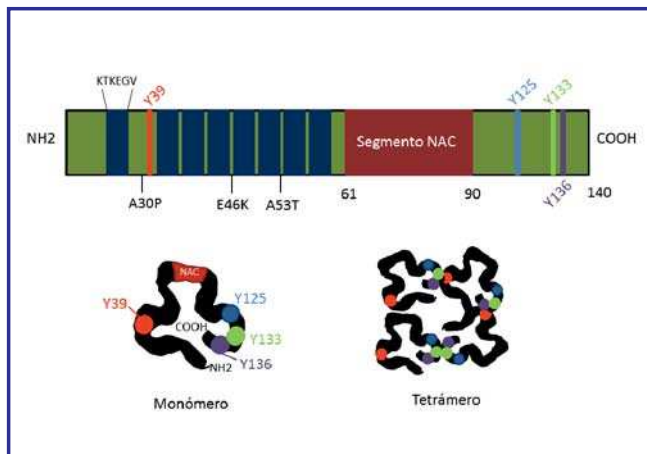
variedades: la forma clásica, que es una inclusión eosinofílica con un centro denso del que irradian fibrillas de 10 nm de diámetro y cuyo componente estructural primario es la  $\alpha$ -sinucleína (además en los CL se identifican otras proteínas como ubiquitina, parkina y neurofilamentos), y la forma cortical. La forma cortical se define peor, es más densa y carece del halo fibrilar, si bien su composición proteica es la misma. Las neuritas de Lewy son formaciones proteínicas en el neuropilo que cuentan en su composición con  $\alpha$ -sinucleína, y son similares a los CL. Se sabe que los cuerpos de Lewy se deben a la agregación de la  $\alpha$ -sinucleína, y las etapas de formación de estos agregados proteínicos anormales comprenden:

1. Aparición de monómeros de  $\alpha$ -sinucleína en disposición beta-helicoidal, o protofibrillas.
2. Formación de oligómeros de las protofibrillas.
3. Formación de fibrillas amiloides.
4. Agregación de las fibrillas en forma de cuerpo de Lewy.

En la enfermedad de Parkinson, tres mutaciones de la proteína (A30P, E46K, A53T) así como multiplicaciones del gen SNCA que codifica la  $\alpha$ -sinucleína se relacionan con mayor formación de protofibrillas y con EP familiar autosómica dominante (Hardy y cols., 2009). La agregación de la  $\alpha$ -sinucleína en los cuerpos de Lewy puede ser no covalente o covalente (Shults, 2006). En la agregación no covalente se observan fibrillas de  $\alpha$ -sinucleína como bastones de 5-10 nm de diámetro (Fink, 2006), similares a las radiaciones de los CL. Estas fibrillas son insolubles y presentan una estructura beta-helicoidal (Nielsen y cols., 2001). Estudios *in vitro* indican que diversos factores, como la concentración de proteína y un pH más ácido, favorecen la formación de las fibrillas (Lee y cols., 2007), y que el proceso se basa en la nucleación (Shahi y cols., 2007), incluso alrededor de una sola molécula de  $\alpha$ -sinucleína (Fink, 2006). En la agregación covalente se forman uniones cruzadas principalmente entre los residuos de tirosina de las moléculas. El estrés oxidativo juega un papel fundamental en la formación covalente de enlaces cruzados, así como metales como el hierro que aceleran la formación de fibrillas amiloides.

## Agregación no covalente de la $\alpha$ -sinucleína

La  $\alpha$ -sinucleína fisiológica, en conformación tetramérica alfa-helicoidal, puede ver modificada su estructura en diversas condiciones patológicas. Como se ha descrito *in vitro*, ello ocasionaría la aparición de monómeros en disposición de hélice beta, que poseen alta auto-capacidad proagregante y pueden formar agregados proteínicos. Estos agregados se localizan en las neuronas en forma más o menos dispersa o bien formando las



**Figura 1. La proteína  $\alpha$ -sinucleína.** Arriba: estructura general de la proteína, donde se indican los segmentos de “unión a lípidos” en azul, el segmento hidrofóbico NAC (componente no amiloideo) en marrón, y los distintos residuos de tirosina (residuos Y). Se distinguen también los residuos con mutaciones (A30P, E46K, A53T) asociadas a un mayor riesgo de padecer la enfermedad de Parkinson (A, alanina; P, prolina; E, glutamato; K, lisina; T, treonina). Abajo izquierda: estructura plegada del monómero, colapsado sobre el segmento NAC, con los residuos de tirosina en color. Abajo derecha: tetrámero con cuatro moléculas de  $\alpha$ -sinucleína unidas entre sí por residuos de tirosina.

inclusiones características de la EP o cuerpos de Lewy.

El segmento hidrofóbico de la molécula es fundamental para la formación de agregados pues, en modelos de *Drosophila*, la sobreexpresión de  $\alpha$ -sinucleína sin segmento hidrofóbico no se acompaña de agregación proteica (Periquet y cols., 2007). Es interesante saber que la dopamina y sus metabolitos favorecen la agregación de  $\alpha$ -sinucleína, lo que se podría relacionar con la especial vulnerabilidad de las neuronas dopaminérgicas en la EP (Conway y cols., 2001). Otro factor proagregante importante es la concentración citosólica de  $\alpha$ -sinucleína, pues un aumento de la misma favorece la agregación, y se ha demostrado, mediante estudios de genómica, que la expresión del gen SNCA y del ARN de  $\alpha$ -sinucleína está incrementada en la EP (Jowaed y cols., 2010). El exceso de  $\alpha$ -sinucleína también altera la normal funcionalidad mitocondrial, afectando a los complejos mitocondriales I y IV (Devi y cols., 2008). De hecho, se detecta  $\alpha$ -sinucleína en las mitocondrias, cuyas membranas son muy ricas en cardiolipinas que fijan  $\alpha$ -sinucleína (Nakamura y cols., 2011). La alteración mitocondrial ejercería un “círculo vicioso” pues origina la excesiva formación de especies reactivas de oxígeno, cuyo efecto oxidativo favorecería la agregación covalente de  $\alpha$ -sinucleína y a su vez un mayor daño mitocondrial (Betarbet y cols., 2006). La agregación también se puede relacionar con un defecto de la degradación de  $\alpha$ -sinucleína. Se ha postulado que existe un defecto de autofagia mediada por chaperonas y, por tanto, de la degradación de  $\alpha$ -sinucleína que conduce a la agregación proteica en la EP (Lee y cols., 2004).

La agregación *per se* ejerce un efecto de desestabilización neuronal, cuya repercusión en el daño y muerte neuronal no se conoce adecuadamente. Los agregados proteináceos de  $\alpha$ -sinucleína alteran el normal citoesqueleto neuronal, disminuyendo la polimerización de tubulina (Chen y cols., 2007). Además, el segmento NAC de la molécula interacciona directamente con la tubulina, alterando su capacidad polimerizante. También ocasionan una excesiva fosforilación de la proteína tau del citoesqueleto (Rajput y cols., 2006). Este último hecho se exagera si además existen defectos de la enzima LRRK2 (*Leucine-rich repeat kinase 2*), lo que da lugar a mayor desestabilización de la red microtubular, formación de neuritas tipo Lewy y retracción neurítica. La LRRK2 participa en la remodelación del citoesqueleto, a través de un dominio GTPasa, y es codificada por el gen PARK8, cuyas variantes se asocian a un mayor riesgo a sufrir la EP (Rajput y cols., 2006).

Otras modificaciones estructurales de la  $\alpha$ -sinucleína que pueden facilitar su agregación son la fosforilación y la ubiquitinación. La proteína depositada en los cuerpos de Lewy suele estar

fosforilada en el residuo de serina 129 (Anderson y cols., 2006), y ello facilita la agregación proteica (Fujiwara y cols., 2002). Es de interés que la  $\alpha$ -sinucleína circulante suele estar normalmente fosforilada, pero si ello sucede en el residuo de serina-129 se facilita su agregación (Foulds y cols., 2011). Se ha descrito también defectos en la ubiquitinación, lo que podría dificultar la normal degradación de la proteína por los proteosomas neuronales (Masuda y Tanaka, 2010).

### Agregación covalente oxidativa de la $\alpha$ -sinucleína

El estrés oxidativo puede modificar la estructura de la  $\alpha$ -sinucleína facilitando su agregación. El estrés oxidativo es aquella situación del organismo donde los mecanismos antioxidantes son inadecuados para eliminar las especies reactivas de oxígeno (ERO) o de nitrógeno (ERN), bien por exceso de producción de ERO/ERN o por defecto de actividad antioxidante, o ambos (Hallwell y Gutteridge, 1999; Jenner, 2003).

En el caso del estrés oxidativo de tipo peroxidativo, o sea, por exceso de peróxido de hidrógeno, sucede la agregación covalente de  $\alpha$ -sinucleína (Olteanu y Pielak, 2004). Este tipo de estrés ocurre en el interior de la mitocondria neuronal, en la cadena de citocromos, y se debe a exceso de formación de ión superóxido, que se convierte en  $H_2O_2$  por medio de la superóxido dismutasa (SOD). Los cambios estructurales dependen de las tirosinas (Y) de la molécula. La Y39 es esencial para la formación de fibrillas (Ulrih y cols., 2008), pero no se requiere para la posterior formación de agregado covalente. En este caso parece que la agregación final en forma de cuerpo de Lewy depende más de los residuos cerca del extremo carboxilo (Y125, Y133, Y136). Se sospecha que el  $H_2O_2$  puede escapar hacia el citosol neuronal gracias a poros creados por la acción deletérea de los agregados de  $\alpha$ -sinucleína, agravando el proceso oxidativo (Shigenaga y cols., 1994).

Otro tipo de estrés oxidativo que altera la conformación de la  $\alpha$ -sinucleína es el nitrosativo. La nitrosilación de proteínas en residuos de tirosina, dando lugar a proteínas 3-nitrotirosinadas, es una modificación oxidativa de proteínas secundaria al exceso de actividad de óxido nítrico. En la EP se ha demostrado la presencia de residuos de tirosina nitrados en los principales componentes proteicos de los cuerpos de Lewy, o sea los neurofilamentos y la alfa-sinucleína (Ischiropoulos, 2009). En nuestro laboratorio se ha demostrado que hay signos de estrés nitrosativo selectivo en sangre de los enfermos de Parkinson, y dicho estrés nitrosativo ocasiona un cambio en el perfil de nitrosilación de tirosinas de la  $\alpha$ -sinucleína sérica. Así hay mayor nitrosilación de residuos de tirosina en posiciones 125 y 136 (Y125/136) respecto a los niveles de residuos nitrados en tirosina en posición 39 (Y39), en enfermos con EP temprana (Fernández y cols., 2013). Se sabe que los residuos de  $\alpha$ -sinucleína pueden nitrarse de modo diferencial dando lugar a diversos efectos. Así, por ejemplo, la nitrosilación localizada en Y39 ocasiona una unión reducida de  $\alpha$ -sinucleína a vesículas y un descenso en la tasa de degradación de la proteína (Hodara y cols., 2004). La nitrosilación excesiva de residuos de tirosina 125/136 aumenta la agregación de la  $\alpha$ -sinucleína (Paxinou y cols., 2001), de modo que ello nos permite proponer la hipótesis que el cambio nitrosativo detectado en el suero de los enfermos podría jugar un papel patogénico en la agregación parkinsoniana (Fernández y cols., 2013).

En resumen, los enlaces covalentes se relacionan con fenómenos oxidativos que actúan sobre la molécula de  $\alpha$ -sinucleína, principalmente peroxidación y nitrosilación de los residuos de tirosina 39, 125, 133 y 136. La nitrosilación en residuos Y125 e Y136 parece estar aumentada en la sangre de los enfermos de Parkinson, lo que podría representar un factor fisiopatológico de la EP.

### Agradecimientos

El autor agradece la revisión del manuscrito realizada por la doctora Lucía Tabares (Universidad de Sevilla) y el doctor José Chacón (Hospital Infanta Luisa de Sevilla). También agradece la colaboración científica de los doctores José Manuel García Moreno y Ángel Martín de Pablos (Hospital Macarena de Sevilla), y la excelente ayuda técnica de Mara Guerra y Silvia Castellano (Universidad de

Sevilla). El trabajo de investigación ha sido subvencionado por la Junta de Andalucía (BIO127), y el Ministerio de Sanidad (RETICS, RD06/001/002; RD06/010/1007; Instituto Carlos III, cofinanciado con FEDER).

### Bibliografía.

- Anderson JP y cols. (2006) Phosphorylation of Ser-129 is the dominant pathological modification of  $\alpha$ -synuclein in familial and sporadic Lewy body disease. *J Biol Chem* 281: 29739–29752.
- Barbour R y cols (2008) Red blood cells are the major source of alpha-synuclein in blood. *Neurodegener Dis* 5(2):55-59.
- Bartels T, Choi JG, Selkoe DJ (2011)  $\alpha$ -Synuclein occurs physiologically as a helically folded tetramer that resists aggregation. *Nature* 477(7362):107-110.
- Betarbet R y cols (2006) Intersecting pathways to neurodegeneration in Parkinson's disease: effects of the pesticide rotenone on DJ-1, alpha-synuclein, and the ubiquitin-proteasome system. *Neurobiol Dis* 22(2):404-420.
- Chen L y cols. (2007) Oligomeric alpha-synuclein inhibits tubulin polymerization. *Biochem Biophys Res Commun* 356(3):548-553.
- Conway KA, Rochet JC, Bieganski RM, Lansbury PT Jr (2001) Kinetic stabilization of the alpha-synuclein protofibril by a dopamine-alpha-synuclein adduct. *Science* 294:1346-1349.
- Devi L, Raghavendran V, Prabhu BM, Avadhani NG, Anandatheerthavarada HK (2008) Mitochondrial import and accumulation of alpha-synuclein impair complex I in human dopaminergic neuronal cultures and Parkinson disease brain. *J Biol Chem* 283(14):9089-9100.
- Emmanouilidou E y cols (2011) Assessment of  $\alpha$ -synuclein secretion in mouse and human brain parenchyma. *PLoS One* 6(7):e22225.
- Fernández E, García-Moreno JM, Pablos AM, Chacón J (2013) May the Evaluation of Nitrosative Stress Through Selective Increase of 3-Nitrotyrosine Proteins Other Than Nitroalbumin and Dominant Tyrosine-125/136 Nitrosylation of Serum  $\alpha$ -Synuclein Serve for Diagnosis of Sporadic Parkinson's Disease? *Antioxid Redox Signal*. doi:10.1089/ars.2013.5250.
- Fink AL (2006) The aggregation and fibrillation of  $\alpha$ -synuclein. *Acc Chem Res* 39: 628-634.
- Foulds PG y cols. (2011) Phosphorylated  $\alpha$ -synuclein can be detected in blood plasma and is potentially a useful biomarker for Parkinson's disease. *FASEB J* 25(12):4127-37.
- Fujiwara H y cols. (2002) Alpha-Synuclein is phosphorylated in alpha-synucleinopathy lesions. *Nat Cell Biol* 4: 160–164.
- Hallwell B, Gutteridge JMC (1999) *Free radicals in biology and Medicine*. Nueva York: Oxford Press.
- Hardy J, Lewis P, Revesz T, Lees A, Paisan-Ruiz C (2009) The genetics of Parkinson's syndromes: a critical review. *Curr Opin Genet Dev* 19(3):254-265.
- Hodara R y cols. (2004) Functional consequences of alpha-synuclein tyrosine nitration: diminished binding to lipid vesicles and increased fibril formation. *J Biol Chem* 279(46):47746-47753.
- Ischiropoulos H (2009) Protein tyrosine nitrosylation--an update. *Arch Biochem Biophys* 484:117-121, 2009.
- Jenner P (2003) Oxidative stress in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 53:S26-36.
- Jowaed A, Schmitt I, Kaut O, Wüllner U (2010) Methylation regulates alpha-synuclein expression and is decreased in Parkinson's disease patients' brains. *J Neurosci* 30(18):6355-6359.
- Lee HJ, Khoshaghideh F, Patel S, Lee SJ (2004) Clearance of alpha-synuclein oligomeric intermediates via the lysosomal degradation pathway. *J Neurosci* 24(8):1888-1896.
- Lee CC, Nayak A, Sethuraman A, Belfort G, Mcrae GJ (2007) A three-stage kinetic model of amyloid fibrillation. *Biophys J* 92: 3448-3458.
- Matsuda N, Tanaka K (2010) Does impairment of the ubiquitin-proteasome system or the autophagy-lysosome pathway predispose individuals to neurodegenerative disorders such as Parkinson's disease? *J Alzheimers Dis* 19: 1–9.
- Nakamura K y cols (2011) Direct membrane association drives mitochondrial fission by the Parkinson disease-associated protein alpha-synuclein. *J Biol Chem* 286(23):20710-20726.
- Nielsen L y cols (2001) Effect of environmental factors on the kinetics of insulin fibril formation: Elucidation of the molecular mechanism. *Biochemistry* 40: 6036-6046.
- Olteanu A, Pielak GJ (2004) Peroxidative aggregation of  $\alpha$ -synuclein requires tyrosines. *Protein Sci* 13: 2852-2856.
- Paxinou E y cols (2001) Induction of alpha-synuclein aggregation by intracellular nitrate insult. *J Neurosci* 21(20):8053-8061.
- Periquet M, Fulga T, Myllykangas L, Schlossmacher MG, Feany MB (2007) Aggregated alpha-synuclein mediates dopaminergic neurotoxicity in vivo. *J Neurosci* 27(12):3338-3346.
- Rajput A y cols (2006) Parkinsonism, Lrrk2 G2019S, and tau neuropathology. *Neurology* 67(8):1506-1508.
- Shahi P, Sharma R, Sanger S, Kumar I, Jolly RS (2007) Formation of amyloid fibrils via longitudinal growth of oligomers. *Biochemistry* 46: 7365-7373.
- Shigenaga MK, Hagen TM, Ames BN (1994) Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:10771-10778.
- Shults CW (2006) Lewy bodies. *Proc Natl Acad Sci USA* 103(6):1661-1668.
- Ueda K y cols. (1993) Molecular cloning of cDNA encoding an unrecognized component of amyloid in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 90(23):11282-11286.
- Ulrih NP, Barry CH, Fink AL (2008) Impact of Tyr to Ala mutations on  $\alpha$ -synuclein fibrillation and structural properties. *Biochim Biophys Acta* 1782: 581-585.
- Uversky VN (2007) Neuropathology, biochemistry, and biophysics of alpha-synuclein aggregation. *J Neurochem* 103(1):17-37.
- Wang W y cols (2011) A soluble  $\alpha$ -synuclein construct forms a dynamic tetramer. *Proc Natl Acad Sci USA* 108(43):17797-17802.

