

Clonación de la proteína α -sinucleína implicada en la Enfermedad de Parkinson

Heber Torres^a, Brenda González-Hernández^a, Azucena González-Horta^a y Dvorak Montiel-Condado^{a*}

^aLaboratorio de Ciencias Genómicas, FCB-UANL, Av. Universidad s/n, Ciudad Universitaria, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México.

*hebersco@hotmail.com.

Palabras clave: Parkinson, α -sinucleína, espectroscopía.

Introducción

La Enfermedad de Parkinson (EP) es una enfermedad neurodegenerativa y progresiva que comúnmente se presenta entre los 40 y 70 años de edad. Los síntomas característicos de esta enfermedad son: un estado de temblor en reposo, rigidez e inestabilidad postural¹. Si bien la EP se ha asociado a la degeneración y a la pérdida selectiva de neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra pars compacta (SNpc), también se ha comprobado que la acumulación de la proteína α -sinucleína mal plegada contribuye al desarrollo de la enfermedad, a través de la formación de agregados oligoméricos llamados Cuerpos de Lewy². Algunos estudios indican que la α -sinucleína se encuentra involucrada en el control del proceso sináptico en las neuronas y en la liberación de neurotransmisores³. La α -sinucleína nativa se encuentra en un estado desplegado y contiene tres regiones importantes: una región N-terminal anfipática y muy conservada con 11 repeticiones del péptido KTKEGV, una región central hidrofóbica llamada componente beta-no amiloide (NAC por sus siglas en inglés), y una región C-terminal ácida de carga negativa⁴. Se ha demostrado que la región N-terminal juega un papel muy importante en la translocación de la α -sinucleína a la membrana, ya que, cuando se encuentra alterada, es capaz de formar agregados oligoméricos, resultando en la formación de poros en la membrana y la muerte celular⁵. El estudio de la α -sinucleína se ha centrado principalmente en su capacidad de modificar su conformación estructural al entrar en contacto con membranas lipídicas; esta conformación puede tener un efecto nocivo para la célula⁶. Sin embargo, para el estudio de los mecanismos patogénicos dados por la formación de oligómeros de la α -sinucleína y la posterior desestabilización y/o la formación de poros en las membranas plasmáticas de las células dopaminérgicas, es necesario primero contar con un método de producción de la proteína caracterizada que nos permita realizar dichos estudios. Es por eso que en este trabajo nos enfocamos en la clonación de la secuencia que codifica para la proteína α -sinucleína humana recombinante tanto silvestre como con el cambio del aminoácido tirosina por triptófano en la posición 39 (39Y-W) en un vector de expresión, ya que la α -sinucleína 39Y-W permite un mejor seguimiento de la dinámica de interacción lípido-proteína por medio de la técnica de espectroscopía de fluorescencia⁷. Todo esto con la finalidad de que pueda ser expresada, purificada y posteriormente utilizada en estudios de interacción de la α -sinucleína con modelos de membranas lipídicas y dilucidar su mecanismo patogénico.

Metodología

Obtención de las Secuencias de la α -sinucleína silvestre y la α -sinucleína 39Y-W recombinantes

La secuencia nucleotídica de la isoforma canónica de la α -sinucleína humana silvestre se obtuvo por medio de bases de datos como UniProt y GenBak de *The National Center for Biotechnology* (NCBI). Así mismo se realizó el cambio del

codón codificante para tirosina en la posición 39 por aquel que codifica para triptófano (39Y-W).

Clonación de la secuencia de α -sinucleína silvestre y 39Y-W en un vector de expresión.

Las secuencias sintetizadas de la α -sinucleína silvestre y 39Y-W se clonaron en un vector de expresión seleccionado según los sitios de restricción adecuados para dicho vector, siempre verificando que no se modificara el marco de lectura abierto (ORF por sus siglas en inglés) de la proteína con la etiqueta de afinidad.

Transformación del vector de expresión conteniendo la α -sinucleína silvestre y 39 Y-W

Los plásmidos con las construcciones sintéticas de la α -sinucleína silvestre y 39Y-W se transformaron en células *E. coli* de la cepa adecuada para el vector de expresión.

Resultados y discusión

Se obtuvo la secuencia canónica de la α -sinucleína silvestre a partir de la base de datos del GenBank y se realizó el cambio del codón que codifica para la tirosina en la posición 39 (TAT) por el que codifica a triptófano (TGG) de manera bioinformática. El vector de expresión seleccionado para su clonación fue pGEX4T1, tomando en cuenta el protocolo utilizado por Choi (2002), quien expresó y purificó la α -sinucleína con la etiqueta de glutatión S-transferasa (GST) por pGEX. Se seleccionaron los sitios de restricción *SmaI* y *XhoI* de manera que no afectara el marco de lectura de las proteínas y se agregaron a la secuencia. Ambas secuencias se mandaron a sintetizar a la compañía GenScript. Las secuencias obtenidas fueron cortadas con las enzimas *SmaI* y *XhoI* al igual que el vector pGEX4T1 y se realizó una reacción de ligación para terminar el proceso de clonación. Finalmente fueron transformadas en *Escherichia coli* BL21 para su posterior expresión y purificación. La caracterización de la construcción se realizó por medio de una reacción de PCR, cuyos oligonucleótidos flanqueaban las secuencias de α -sinucleína clonadas en pGEX 4T1.

Conclusiones

La clonación de las secuencias que codifican para la proteína α -sinucleína humana recombinante tanto silvestre como con el cambio del aminoácido tirosina por triptófano en la posición 39 se realizó de forma exitosa al vector de expresión pGEX 4T1.

Referencias

1. Scott, T.R.; Netsky, M.G. *Int. J. Neurol.* **1961**, *2*, 51-60.
2. Olanow, C.; Warren, Patrik Brundin. *Mov. Dis.* **2013**, *28*, 1-5
3. Cheng, L.; Locke, C.; Davis. *J. Cell Biol.* **2011**, *194*, 921-935.
4. Bellucci, Arianna; Michela Zaltieri; Laura Navarria. *Brain Research.* **2012**, *1476*, 183-202
5. Bonini NM; Giasson BI. *Cell.* **2005**, *123*, 359-361.
6. Robotta, Marta; Patrick Brau; Bart van Rooijen; Vinod Subramaniam. *Chem. PhysChem.* **2011**, *2*, 267-269
7. Munishkina, Larissa A.; Anthony L. Fink. *Biochimica et Biophysica.* **2007**. *1768*, 1862-1885