

**MARCAJE SELECTIVO DE LA PROTEÍNA ALFA-SINUCLEÍNA CON CLORURO DE DANSILO EN EL EXTREMO N-TERMINAL****SELECTIVE LABELING OF ALPHA-SYNUCLEIN WITH DANSYL CHLORIDE AT N-TERMINAL SEGMENT**M.G. Quiroz-Vázquez¹, A. Chávez-Montes², A. González-Horta^{1*}¹Laboratorio de Ciencias Genómicas, FCB, Universidad Autónoma de Nuevo León. Av. Universidad s/n Cd. Universitaria 66451 México.²Laboratorio de Química Analítica, FCB, Universidad Autónoma de Nuevo León. Av. Universidad s/n Cd. Universitaria 66451 México.

Recibido 1 de Enero de 2016; Aceptado 26 de Junio de 2016

Resumen

La mayoría de las proteínas poseen en su secuencia residuos de triptófano susceptibles de ser usados como fluoróforos para su estudio por técnicas espectroscópicas sin embargo, la alfa-sinucleína no tiene esta característica, por lo que es necesario construir mutantes que contengan triptófanos en su secuencia o bien marcarla de manera extrínseca para poder contar con sondas que permitan su análisis por espectroscopía de fluorescencia. El objetivo del presente trabajo fue optimizar las condiciones experimentales para el marcaje selectivo de la alfa-sinucleína con cloruro de dansilo, una sonda sensible a la polaridad del entorno y que reacciona selectivamente con el grupo amino libre de las proteínas lo cual permitirá caracterizar las interacciones lípido-proteína o proteína-proteína de la alfa-sinucleína nativa en complejos lipoproteicos.

Palabras clave: alfa-sinucleína, espectroscopía de fluorescencia, cloruro de dansilo.

Abstract

Most proteins have tryptophan residues in their sequence that can be used as intrinsic fluorophores by spectroscopic techniques however, alpha-synuclein does not have this feature, so it is necessary to construct mutants that contain tryptophan residues or label extrinsically the protein to allow its analysis by fluorescence spectroscopy. The aim of this study was to optimize the experimental conditions for the selective labeling of alpha-synuclein with dansyl chloride, an environment sensitive probe that reacts selectively with free amino groups in proteins allowing characterization of lipid-protein interactions or protein-protein interactions of alpha-synuclein in lipoprotein complexes.

Keywords: alpha-synuclein, fluorescence spectroscopy, dansyl chloride.

1 Introducción

La alfa-sinucleína es una abundante proteína neuronal que se localiza principalmente en las terminales presinápticas y cuya unión a membranas juega un papel primordial en la formación de fibras de tipo amiloide. Estos agregados fibrilares definen varias enfermedades del sistema nervioso, entre ellas la enfermedad de Parkinson (EP) (Rang, 2008). Descubrimientos genéticos relacionan el padecimiento temprano de esta enfermedad a la triplicación del gen que codifica para la alfa-sinucleína y a 3 mutaciones puntuales (A30P, E46K, A53T). Ya sea de origen esporádico o genético, la enfermedad de Parkinson no solo se asocia a la presencia de esta proteína sino que también está implicado su estado conformacional.

Mientras que la alfa-sinucleína soluble se caracteriza por tener una estructura desplegada *in vitro*, es la forma agregada (fibras amiloides) la que se encuentra en los cuerpos de Lewy y en las neuritas característicos de la EP (Conway y col., 2000). Las interacciones con la membrana son de particular interés debido a que la proteína se localiza cerca de las vesículas sinápticas y de la membrana mitocondrial *in vivo*. La capacidad de la alfa-sinucleína para asociarse con la membrana se debe a su secuencia aminoacídica. Es una proteína de 140 aminoácidos y 14.5 kDa de masa molecular que comprende 3 dominios distintos: un segmento N-terminal catiónico, una región central hidrofóbica conocida como NAC (por sus siglas en inglés *non*

* Autora para la correspondencia. E-mail: azucena.gonzalezhr@uanl.edu.mx

amyloid beta component) y un segmento C-terminal de carácter ácido. En el análisis estructural de la alfa-sinucleína puede observarse que cuenta con 2 residuos de fenilalanina y 4 tirosinas localizadas en distintas regiones: Phe4 y Tyr39 se localizan en la región N-terminal, Phe94 en la región NAC y Tyr125, Tyr133 y Tyr136 en la región C-terminal (Bisaglia y col., 2009). No cuenta con residuos de triptófano en su secuencia. Dado que la tirosina es una sonda intrínseca insensible a la polaridad del entorno, es necesario construir mutantes que contengan triptófanos en su secuencia o bien marcar de manera extrínseca la proteína para poder contar con sondas que permitan su análisis por espectroscopía de fluorescencia. La caracterización de las interacciones lípido-proteína de la alfa-sinucleína por otras técnicas como microscopía de epifluorescencia o resonancia de spin electrónico ha requerido la introducción de sondas extrínsecas sin embargo, en todos los casos, ha sido necesario el empleo de la biología molecular para la introducción de residuos de cisteína que permitan la unión química de las sondas correspondientes o bien el cambio Tyr39Trp. En este contexto, el objetivo del presente trabajo fue el marcaje selectivo de la alfa-sinucleína con cloruro de dansilo, una sonda sensible a la polaridad del entorno y que reacciona selectivamente con el grupo amino libre de las proteínas permitiendo así, la caracterización de la interacción lípido-proteína o proteína-proteína de la alfa-sinucleína nativa en complejos lipoproteicos.

2 Parte experimental

2.1 Optimización de los parámetros experimentales para el marcaje en el segmento N-terminal de proteínas

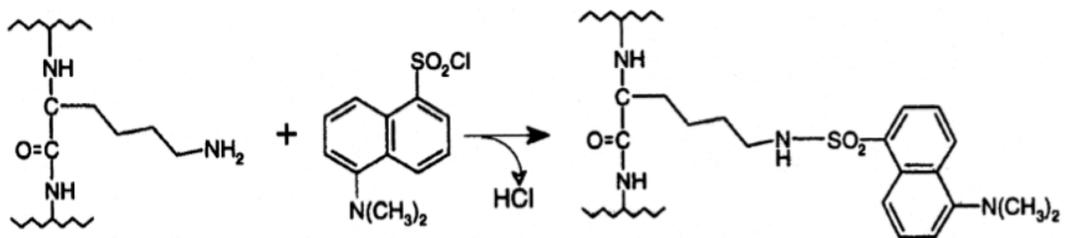
Para optimizar los parámetros experimentales del marcaje de proteínas en el extremo amino terminal

fue necesario emplear una proteína con triptófanos en su secuencia con el fin de monitorearla por espectroscopía de fluorescencia, para lo cual se empleó en la primera etapa de este trabajo la albúmina bovina. Se ha reportado que a un pH entre 9 y 10.5 la dansilación de proteínas ocurre favorablemente debido al marcaje de la mayoría de los aminoácidos, aminoras, imidazoles y fenoles (Seiler y col., 1970). El cloruro de dansilo es una sonda que reacciona con los grupos amino de acuerdo al Esquema 1.

Debido a que la derivatización con cloruro de dansilo implica que el grupo amino que participa en la reacción esté desprotonado, es necesario tener un pH ligeramente básico para que ocurra la reacción. Se probaron 3 valores de pH para evaluar con cual se lograba una mayor incorporación de la sonda fluorescente al extremo N-terminal de la proteína. La reacción de dansilación se realizó a pH de 8.5, 9.5 y 10.5. Se preparó una solución stock de cloruro de dansilo en dimetilformamida (DMF) a una concentración de 1 mg/mL. Una vez disuelta la sonda, se añadieron 81 μ L sobre una solución de albúmina preparada a una concentración 300 μ M empleando buffer CHES a los distintos pH a evaluar y se incubó durante 1.5 hr a 25° C en obscuridad y agitación constante. La reacción se detuvo disminuyendo el pH en dos unidades.

2.2 Cromatografía de exclusión molecular

Para eliminar el cloruro de dansilo no unido a la proteína se empleó una columna Superdex 200 con buffer Hepes 10 mM NaCl 100 mM pH 7 como eluyente recolectándose 90 fracciones. El perfil cromatográfico se monitoreó midiendo la absorbancia a 280 nm y 340 nm. Las fracciones correspondientes a la proteína dansilada se recolectaron y cuantificaron por el método de Bradford.



Esquema 1. Reacción del cloruro de dansilo con los residuos de lisina de una proteína (adaptado de Levi y González-Flecha, 2003).

2.3 Obtención de los espectros de emisión de fluorescencia de la proteína dansilada

Los espectros de emisión de fluorescencia de la proteína dansilada se obtuvieron en entorno acuoso empleando un espectrofluorímetro Perkin Elmer LS-45. Los espectros se recogieron a 25° C en una celda de 0.1 cm de paso óptico. La velocidad a la que se registraron los espectros fue de 1 nm/s con un ancho de rendija de excitación y emisión de 10 nm. Los espectros de fluorescencia de la proteína dansilada se obtuvieron utilizando una longitud de onda de excitación de 340 nm. La concentración de proteína empleada en la celda 71.5 µg/mL en buffer Hepes 10 mM pH 7 NaCl 100 mM.

2.4 Marcaje del segmento N-terminal de la alfa-sinucleína con cloruro de dansilo

Se marcaron 1.5 mg/mL [22.7 µM] de alfa-sinucleína disuelta en buffer CHES a pH 9.5 añadiendo 6 µL de cloruro de dansilo [1 mg/mL] en DMF incubando durante 1.5hr a 25°C en oscuridad y agitación constante. La reacción se detuvo disminuyendo el pH en dos unidades. La eliminación de la sonda no unida y los perfiles cromatográficos y electroforéticos se realizaron como se mencionó anteriormente.

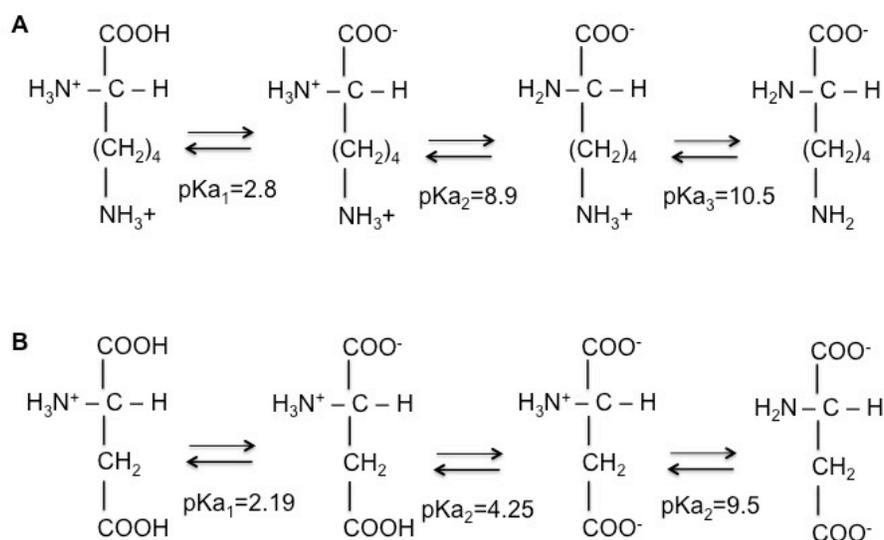
2.5 Obtención del perfil electroforético de la proteína marcada con cloruro de dansilo

El marcaje de la proteína se corroboró mediante su análisis electroforético en gel discontinuo empleando el gel concentrante al 4% y el de corrimiento al 8% de acrilamida al 30%. La electroforesis se realizó en un sistema OWL P8DS (Thermo-scientific) y las bandas se detectaron mediante tinción de coomassie. El marcaje fluorescente se corroboró mediante la exposición del gel a luz UV previo a la tinción con coomassie.

3 Resultados y discusión

3.1 Optimización de las condiciones del marcaje

Para encontrar las condiciones óptimas de reacción para el marcaje de la alfa-sinucleína, una proteína que no cuenta con triptófanos en su estructura primaria, se empleó como proteína modelo la albúmina, una proteína capaz de ser monitoreada por espectroscopía de fluorescencia debido a la presencia de residuos de triptófano en su secuencia, los cuales generan espectros de emisión con un pico máximo entorno a 340 nm una vez excitada la proteína a 280 nm (Lakowicz, 2006).



Esquema 2. Valores de pKa para los grupos ionizables de la lisina (A) y el ácido aspártico (B) presentes en la secuencia primaria de la albúmina sérica bovina.

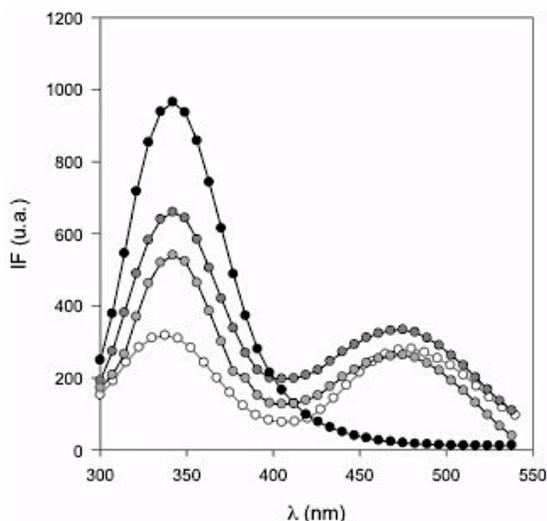


Figura 1. Espectros de emisión de fluorescencia de la albúmina sérica bovina y la albúmina dansilada registrados a una longitud de onda de excitación de 280 nm. Se muestra el efecto del pH sobre la incorporación de cloruro de dansilo en el extremo N-terminal de la albúmina. Albúmina sérica bovina sin marcar (●) y albúmina dansilada empleando un pH de 10.5 (●), pH 9.5 (○) y pH 8.5 (○).

Dados los valores de pKa de los grupos ϵ -amino de los residuos de lisina y del residuo de ácido aspártico (Esquema 2) correspondiente al residuo N-terminal de la secuencia primaria de la albúmina (Peters, 1977), estos grupos se encuentran protonados a un pH neutro, no siendo reactivos para la dansilación, por lo que el medio para que esta reacción ocurra debe ser ligeramente básico. Así pues, se eligieron 3 valores de pH (8.5, 9.5 y 10.5) para realizar la dansilación de la proteína y evaluar la cantidad de sonda incorporada.

En la Figura 1 se muestra la influencia del pH sobre la intensidad de fluorescencia debido a la

incorporación del dansilo a la albúmina. En la gráfica puede observarse que, tanto la albúmina sin marcar como el derivado dansilado a los tres valores de pH probados, muestran un espectro de emisión de fluorescencia característico de los residuos aromáticos con un máximo a 342 nm cuando se excitan a 280 nm. Puede observarse también, que la proteína dansilada presenta un segundo pico atribuible a la emisión de fluorescencia del dansilo con un máximo a 473 nm (Lakowicz, 2006).

Dado que el dansilo es una sonda que no debe ser excitada a 280 nm y que la intensidad de fluorescencia de la banda disminuye conforme ocurre la dansilación, puede decirse que algunos residuos aromáticos de la proteína en el estado excitado transfieren el exceso de energía a la sonda fluorescente debido a que el espectro de emisión de los residuos aromáticos de la proteína y el espectro de absorción del dansilo están centrados a 340 nm. La transferencia de energía entre fluorocromos sólo es posible si la distancia que los separa está entre 1-10 nm (Wu y col., 1994). Esta distancia se encuentra dentro de las dimensiones que presenta la molécula de albúmina (Ferrer y col., González-Flecha y col., 2003). El esquema 3 representa el origen de la emisión de las bandas observadas en la Figura 1 cuando se excita la proteína dansilada a 280 nm.

Una vez realizado el marcaje proteico se procedió a la cuantificación del mismo a partir de los espectros de absorción del dansilo en las muestras de proteína marcada y determinando su concentración mediante el coeficiente de extinción molar del dansilo a 340 nm ($\epsilon = 3370 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (Levi y col., 2003). Conocido este valor y calculando la cantidad de proteína mediante el método de Bradford (Olson, 2016) se obtuvieron las siguientes relaciones molares para los valores de pH evaluados:



Esquema 3. Mecanismo de transferencia de energía entre fluorocromos. El cilindro representa la molécula de albúmina y la estrella representa el dansilo unido a ella. Adaptado de Levi y González-Flecha (2003).

Tabla 1. Marcaje proteico obtenido a los pH empleados

pH	Dansilo/proteína (relación molar)	Fluorescencia max (u.a.)
8.5	0.6	473
9.5	1	473
10.5	1.2	470

Los valores recogidos en la tabla 1 muestran que un pH de 9.5 resulta óptimo para la dansilación de la albúmina en el extremo amino terminal, ya que bajo estas condiciones sólo se ha incorporado una molécula de dansilo por cada molécula de albúmina, preferentemente en el extremo N-terminal ya que el pI de los residuos de lisina es de 9.7 por lo que, al pH de 9.5 el grupo carboxilo estará desprotonado y el ϵ -amino de las lisinas protonado, no haciendo sensible este último grupo a la dansilación (Nelson y Cox, 2009). La albúmina sérica bovina en su estructura primaria, cuenta con el ácido aspártico como residuo N-terminal cuyo pI es de 6.87 por lo que a un pH de 9.5 tanto el grupo carboxilo como el grupo amino de este residuo estarán desprotonados sin embargo la incorporación de la sonda solo será en el extremo N-terminal de la proteína ya que el dansilo es una sonda que reacciona selectivamente con los grupos amino. A un pH de 8.5 se tendrá desprotonado solo cierto porcentaje de grupos amino del residuo de ácido aspártico y completamente protonados los grupos ϵ -amino de las lisinas. Mientras que, al pH de 10.5 se comienza el marcaje no solo en el extremo amino terminal de la albúmina sino que comienza a incorporarse sonda también en los extremos ϵ -amino de las lisinas ($pK_a = 10.53$), lo que supone que controlando de forma precisa el pH del medio donde se llevará a cabo la reacción puede seleccionarse el tipo de residuo donde se producirá el marcaje fluorescente de una proteína. Resultados similares han sido observados para el marcaje selectivo de otras proteínas como la SP-C del surfactante pulmonar (Plasencia y col., 2001) y el neuropéptido Sustancia P (SP) involucrado en varias funciones biológicas del sistema nervioso central y periférico (Ferrandiz y col., 1994). Una vez estandarizadas las condiciones de reacción necesarias para la dansilación de proteínas en el extremo N-terminal, se siguieron las condiciones descritas en la Parte Experimental para obtener una preparación de alfa-sinucleína marcada en la amina primaria del extremo N-terminal con cloruro de dansilo.

3.2 Alfa-sinucleína dansilada

La alfa-sinucleína posee 16 grupos susceptibles de ser modificados por el cloruro de dansilo, el grupo amino terminal de la proteína y los grupos ϵ -amino de las Lisinas 6, 10, 12, 21, 23, 32, 34, 43, 45, 58, 60, 80, 96, 97 y 102 (González-Horta, 2015). Debido a que las lisinas de esta proteína participan principalmente en la unión con membranas mediante interacciones electrostáticas (Stöckl y col., 2008), se optimizaron las condiciones de marcaje para modificar preferentemente sólo al grupo amino-terminal y no alterar esta capacidad de interacción de la proteína. La muestra fue para ello incubada con cloruro de dansilo a un pH de 9.5 durante 1.5hr a 25°C aplicándose posteriormente a una columna de Superdex 200 para eliminar el dansilo libre que no se unió a la alfa-sinucleína (Mayolo-Deloisa y col., 2012). En su estructura primaria, la alfa-sinucleína cuenta con una metionina como residuo N-terminal ($pI=5.75$) por lo que al pH de 9.5 solamente estará desprotonado el grupo amino de este residuo ($pK_a = 9.21$), permitiendo la incorporación de la sonda fluorescente sin que se vean afectados los residuos ϵ -amino de las lisinas ($pK_a = 10.5$), los cuales mantendrán su carácter básico, importante para las interacciones electrostáticas que establece la alfa-sinucleína al interactuar con bicapas fosfolipídicas.

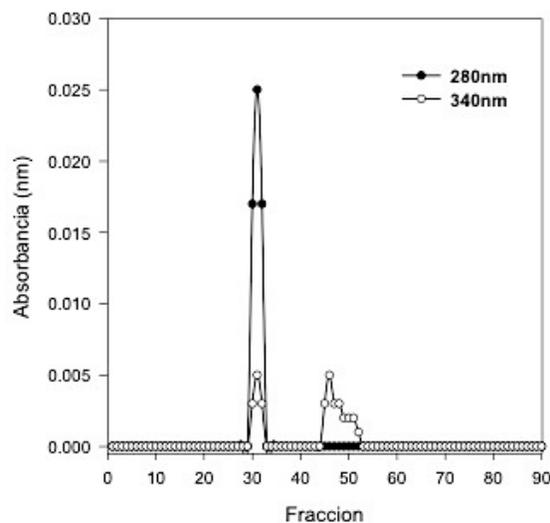


Figura 2. Perfil de elución de una muestra de alfa-sinucleína tratada con cloruro de dansilo en una columna cromatográfica Superdex 200. Los círculos negros corresponden a las medidas de absorbancia a 280 nm y los blancos a la absorbancia a 340 nm.

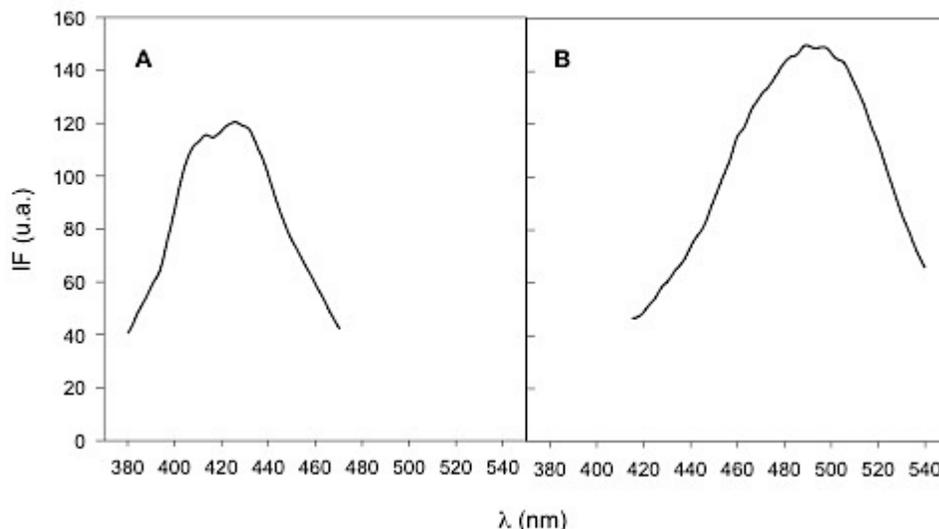


Figura 3. Espectros de emisión de fluorescencia de la alfa-sinucleína dansilada ($22.7 \mu\text{M}$) y del Cloruro de dansilo en buffer Hepes 10mM pH 7 conteniendo 100mM NaCl. La fluorescencia se representa en unidades arbitrarias.

Un procedimiento similar se utilizó para marcar el extremo amino-terminal de mutantes de cisteínas de la alfa-sinucleína empleando como sonda el 5-(2-iodoacetil)amino-etil-amino-naftalen-1-ácido sulfónico (Dns) con el fin de analizar los detalles cinéticos durante la formación del amiloide (Yap y col., 2011) y también para evaluar la interacción de la alfa-sinucleína con la sinfilina, una proteína presente en los cuerpos de Lewy característicos de los pacientes con Parkinson (Yuan-Yuan y col., 2010). En la Figura 2 se muestra el perfil de elución de la alfa-sinucleína tratada con cloruro de dansilo tras medir la absorción de las fracciones cromatográficas a 280 nm y 340 nm. El primer pico corresponde a la alfa-sinucleína marcada covalentemente con la sonda fluorescente mientras que el segundo pico corresponde al exceso de sonda que no se unió a la proteína. Las fracciones de proteína marcada se recogieron y cuantificaron para posteriormente realizar su espectro de emisión de fluorescencia.

En la Figura 3 se comparan los espectros de emisión de fluorescencia de la alfa-sinucleína dansilada y de la sonda libre en buffer. El espectro de la proteína-dansilada presenta un máximo de emisión en torno a 430 nm característico de un dansilo en entorno no polar mientras que la sonda en buffer presenta un máximo entorno a 490 nm (Lacowicz, 2009). En estudios realizados con otras proteínas dansiladas, se ha observado que cuando el fluoróforo se inserta en regiones hidrofóbicas de la membrana

se produce un cambio cualitativo y cuantitativo importante en sus propiedades fluorescentes, que incluye en la mayor parte de los casos, un incremento en el rendimiento cuántico de la emisión de fluorescencia del dansilo, así como un desplazamiento significativo de las longitudes de onda a las que se observa esa emisión a valores menores (desplazamiento al azul) (Schüman y col., 1997; Pérez-Payá y col., 1997). El hecho de que el fluoróforo unido a la alfa-sinucleína presente un máximo de emisión a menores longitudes de onda sugiere que el dansilo está protegido del efecto apagador del agua, lo que podría ocurrir al originarse la formación de agregados proteicos.

Yap y col., (2011) evaluaron los eventos que ocurren durante la formación de fibras amiloides en el segmento N y C-terminales de la alfa-sinucleína elaborando para ello, mutantes de cisteínas en diferentes posiciones (G7C, Y136C, V26C y L100C) y posteriormente realizando la derivatización con cloruro de dansilo, una sonda sensible al entorno. Estos autores encontraron que tras la agregación proteica, la fluorescencia del dansilo presenta cambios drásticos y residuo específicos. Se observó que la intensidad de fluorescencia global se incrementa entre 1.6 a 3 veces, presentándose además desplazamientos espectrales hacia el azul (menores longitudes de onda) entre 16 y 42 nm, indicando que todos los sitios dansilados fueron secuestrados del entorno acuoso a un ambiente más hidrofóbico. Estos autores

demonstraron que el dansilo localizado en el residuo 7, residuo alejado del centro amiloideo (NAC), resultó más sensible que los dansilos cercanos a la región NAC, pues presentó el mayor desplazamiento hacia menores longitudes de onda. Cuando se monitoreó la fluorescencia del dansilo 7, éste presentó una cinética de agregación temprana comparado con los dansilos localizados en los residuos 26 y 100, sugiriendo que la vía para la formación de amiloides, se desarrolla inicialmente a partir de las regiones desordenadas N- y C-terminales seguido por los residuos localizados en el centro hidrofóbico o NAC (Yap y col., 2011). Así pues, los espectros de emisión de fluorescencia de la alfa-sinucleína dansilada obtenidos en este trabajo sugieren que la proteína se encuentra en estado temprano de agregación ya que el tiempo promedio encontrado por Yap y colaboradores para que esto ocurra son 22 horas aproximadamente, lo cual se encuentra dentro del margen de tiempo empleado para el marcaje y el proceso cromatográfico.

En la Figura 4 se presenta el análisis electroforético de una muestra de alfa-sinucleína dansilada. La tinción con Coomassie muestra en los carriles 2 y 4 una banda con una movilidad electroforética en torno a 15 kDa de peso molecular que corresponden al monómero de alfa-sinucleína.

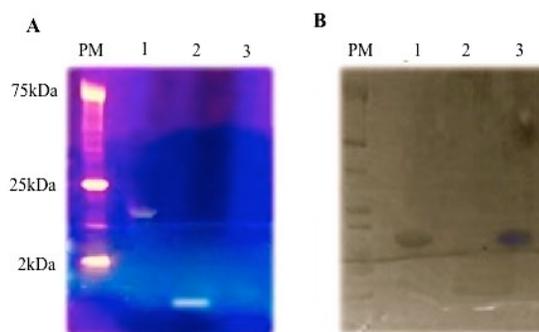


Figura 4. Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes. A) Fotografía del gel de electroforesis obtenida mediante transiluminación con lámpara ultravioleta previo a la tinción. Se muestra la alfa-sinucleína dansilada (carril 1) y cloruro de dansilo usado como control (carril 2). B) Fotografía del gel de electroforesis después de la tinción de Coomassie, el carril 1 corresponde a la alfa-sinucleína tratada con cloruro de dansilo y el carril 3 a la alfa-sinucleína control. En ambos geles se muestra el marcador de peso molecular (PM).

Cuando el gel se observa en un transiluminador ultravioleta aparece una banda fluorescente (carril 1) que coincide con la banda correspondiente a la proteína. Esto demuestra que el tratamiento ha permitido la incorporación del fluoróforo a la alfa-sinucleína. Nuevamente, el hecho de que el valor del peso molecular no se vea alterado da idea de que el proceso de agregación se encuentra todavía en etapas muy tempranas.

Conclusión

El control fino del pH de la reacción permite optimizar el marcaje de la proteína alfa-sinucleína en una sola posición, selectivamente en el grupo amino-terminal. La sonda unida covalentemente al extremo N-terminal de la alfa-sinucleína no se encuentra tan expuesta al entorno acuoso como la sonda libre. Esta metodología permitirá el estudio de interacciones lípido-proteína de la misma en complejos lipoproteicos, sin la necesidad de emplear la biología molecular para obtener mutantes con buenas características espectroscópicas. Sin embargo es importante considerar el tiempo de manejo de la muestra para evitar que ocurran eventos tempranos de agregación.

Agradecimientos

Este trabajo fue realizado con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología bajo el Proyecto No. C.B. 2014 236834. El primer autor agradece el apoyo del CONACYT por la beca otorgada para la realización del trabajo de Tesis de Licenciatura bajo el convenio 22936.

Referencias

- Bisaglia M, Mammi S, Bubbaco L. (2009) Structural insights on physiological functions and pathological effects of α -synuclein. *The FASEB Journal Review*, 23, 329-340.
- Conway K.A, Harper J.D, y Lansbury P.T. (2000). Fibrils formed *in vitro* from alpha-synuclein and two mutant forms linked to Parkinson's disease are typical amyloid. *Biochemistry* 39, 2552-2563.
- Ferrandiz, C, Perez-Paya, E, Braco, L, Abad, C. (1994). Gln5 selectively monodansylated substance P as sensitive tool for interaction

- studies with membranes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 203, 359-365.
- Ferrer M.L. Duchowicz R. Carrasco B. García de la Torre J. Acuña A.U. (2001). The conformation of serum albumin in solution: A combined phosphorescence depolarization-hydrodynamic modeling study. *Biophysical Journal* 80, 2422-2430.
- González Flecha F.L. Levi, V. (2003) Determination of the molecular size of BSA by fluorescence anisotropy. *Biochemistry and Molecular Biology Education* 31, 319-322.
- González-Horta, A. (2015). The interaction of Alpha-synuclein with membranes and its implication in Parkinson's disease: a literature review. *Natural Product Communications* 10, 1775-1778.
- Lakowicz, J.R. (2006). *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 3^a edition. University of Maryland School of Medicine, Baltimore, Maryland, USA pp 13- 67.
- Levi V. González Flecha L.F. (2003) Labeling of proteins with fluorescent probes. *Biochemistry and Molecular Biology Education* 31, 333-336.
- Mayolo-Deloisa K. Martínez L.M. Rito-Palomares M. (2012) Técnicas cromatográficas y su aplicación a estudios de cambios conformacionales, estabilidad y replegamiento de proteínas. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 11, 415-429.
- Nelson, D.K. Cox, M.M. (2009). *Lehninger Principios de Bioquímica*. Ediciones Omega 5^a edición.
- Olson, B.J. (2016) Assays for determination of protein concentration. *Current Protocols in Pharmacology* 73, A. 3A. 1- A. 3A. 32
- Pérez-Payá E. Dufourcq J. Braco L. Abad C. (1997) Structural characterisation of the natural membrane-bound state of melittin: a fluorescence study of a dansylated analogue. *Biochimica et Biophysica Acta* 1329, 223-236.
- Peters, T. (1977) Serum albumin: recent progress in the understanding of its structure and biosynthesis. *Clinical Chemistry* 23, 5-12.
- Plasencia, I. Cruz, A. López-Lacomba J.L. Casals, C. Pérez-Gil, J. (2001). Selective labeling of pulmonary surfactant protein SP-C in Organic Solution. *Analytical Biochemistry* 296, 49-56.
- Rang H.P. (2008). *Farmacología*. Elsevier pp 235-258.
- Schüman M. Dathe M. Wieprecht T. Beyermann M. Bienert M. (1997) The tendency of magainin to associate upon binding to phospholipid bilayers. *Biochemistry* 36, 4345-4351.
- Seiler N. (1970) Use of the dansyl reaction in biochemical analysis. *Methods of Biochemical Analysis* 18, 259-337.
- Stöckl M. Fischer P. Wanker E. Herrmann A. (2008) Alpha-synuclein selectively binds to anionic phospholipids embedded in liquid-disordered domains. *Journal of Molecular Biology* 375, 1394-1404.
- Wu A. Brand L. (1994). Resonance energy transfer. *Analytical Biochemistry* 218, 1-3.
- Yap T.L. Pfefferkorn C.M. Lee J.C. (2011) Residue-specific fluorescent probes of alpha-synuclein: detection of early events at the N- and C-termini during fibril assembly. *Biochemistry* 50, 1963-1965.
- Yuan-Yuan X. Chen-Jie. Z. Zi-Ren Z. Hong J. Mei-Xia Ch. Qing-Shan F. Ai-Xin S. Dong-Hai L. Hong-Yu, H. (2010). Interactions with synphilin-1 promotes inclusion formation of alpha-synuclein: mechanistic insights and pathological implication. *FASEB Journal* 24, 196-205.