

Caracterización estructural de oligómeros del A β (25-35) y sus mutantes y evaluación de su efecto sobre la viabilidad en cultivo celular

José Alejandro Cerna Ornelas^a, Ana Esther Estrada Rodríguez^a, Herminia Guadalupe Martínez Rodríguez^a, Román Vidal Tamayo Ramírez^b y Viviana Chantal Zomosa Signoret^{a*}

^aDepartamento de Bioquímica y Medicina Molecular, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, Av. Francisco I. Madero y Dr. Aguirre Pequeño, Mitrás Centro, Monterrey, México.

^bDepartamento de Ciencias Básicas, Universidad de Monterrey, Av. Ignacio Morones Prieto y Jesús M. Garza, Monterrey, México.

* vivizomo@gmail.com

Palabras clave: Enfermedad de Alzheimer, Péptido β -amiloide, agregación, viabilidad celular.

Introducción

La enfermedad de Alzheimer (EA) se caracteriza por la formación de placas amiloides compuestas principalmente por el péptido β -amiloide (A β). Este péptido puede estar compuesto por hasta 43 aminoácidos y ha sido demostrado que tiene un papel importante en la enfermedad al causar la muerte celular. Estos efectos son debido a sus propiedades de agregación, siendo los oligómeros solubles los agentes tóxicos más relacionados a la aparición y progresión de la EA, por lo que la formación de estos oligómeros puede considerarse como un blanco para el desarrollo de estrategias terapéuticas para evitar y/o retrasar el progreso de la EA. La secuencia aminoacídica del péptido A β es esencial para su agregación. En este trabajo se utilizó la variante del péptido A β (25-35), que contiene un fragmento hidrofóbico implicado en la agregación. Se diseñaron tres mutantes a partir del péptido silvestre, a cada mutante se le hizo un cambio de aminoácido en diferente posición: A30W, K28A y M35C, con la finalidad de evaluar el papel de los aminoácidos sustituidos en las propiedades de agregación y evaluar también el efecto de las mutantes sobre la viabilidad en cultivo celular¹.

Parte experimental

La agregación de los péptidos se realizó en PBS 1X y NaOH 0.2 M a una concentración 40 μ M, en condiciones de agitación a 37°C por 0 y 12 h, estos agregados fueron caracterizados por microscopía de fuerza atómica (AFM) con la modalidad de contacto intermitente y se realizó el análisis de rugosidad. Para los ensayos de viabilidad se trataron células de la línea celular C6 de glioblastoma de rata con péptidos agregados en las condiciones ya descritas, por 96 h, los efectos sobre la viabilidad fueron evaluados midiendo la actividad de luciferasa, para lo que se utiliza el ATP celular. Para evaluar si los agregados eran internalizados en las células se realizaron extracciones de proteínas intracelulares y por western blot se detectó la presencia de oligómeros del A β en dichos extractos.

Resultados y discusión

En la caracterización por AFM se observaron agregados en el péptido silvestre (wt) que formaban fibrillas cortas desde el tiempo de 0 h, esta longitud de las fibrillas no cambió en el segundo tiempo, se presentó un ligero aumento en la rugosidad, indicando que posiblemente a mayores tiempos de agregación se aumente el tamaño de las fibrillas. En la mutante A30W se observó la formación de agregados redondos a las 0 h y fibrillas

cortas a las 12 h, la rugosidad aumentó casi tres veces en el segundo tiempo, pero por modelado molecular se espera que estas fibrillas no aumenten de longitud respecto al tiempo de agregación, debido al impedimento estérico generado por el residuo de la alanina¹. En la mutante K28A se observaron agregados amorfos a las 0 h, mismos que aumentaron de tamaño a las 12 h, la rugosidad fue mayor en estos agregados, sin embargo, por modelado molecular se espera que no se lleguen a formar fibrillas por el cambio de cargas generado en esta mutante¹. En la mutante M35C se observó formación de fibrillas cortas a las 0 h y a las 12 h se observó una dispersión homogénea, la rugosidad de estos agregados fue más cercana al péptido wt, esto concuerda con lo obtenido por modelado molecular, ya que no se observan diferencias en la agregación de esta mutante en comparación con el péptido A β wt y por lo tanto es posible que esta mutante llegue a formar fibrillas en tiempos posteriores de agregación¹.

En los ensayos de viabilidad no se observaron diferencias significativas al comparar los efectos sobre la viabilidad de las mutantes con el péptido A β wt, que ya se ha reportado que disminuye la viabilidad celular a las 24 h². En los ensayos de western blot se observó la presencia de bandas con peso de entre 30 KDa y 60 KDa en los extractos proteicos de células tratadas con los distintos péptidos, estas bandas son menores a 64 KDa, por lo que se consideran agregados con bajo peso molecular³ y se indica que estos se internalizan en las células.

Conclusiones

Las mutaciones puntuales en el péptido A β (25-35), A30W y K28A provocan un efecto distinto sobre las características estructurales de los agregados formados. Además, se observó que los agregados oligoméricos del péptido A β (25-35) y sus variantes pueden ser citotóxicos por su internalización en las células.

Referencias

1. Estrada-Rodríguez, A. E.; Valdéz-Pérez, D.; Ruíz-García, J.; Treviño-Garza, A.; Gómez-Martínez, A. M.; Martínez-Rodríguez, H. G.; Rivas-Estilla, A. M.; Vidaltamayo, R.; Zomosa-Signoret, V. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*. 2018, 1-17.
2. Fan, S.; Zhang, B.; Luan, P.; Gu, B.; Wan, Q.; Huang, X.; Liao, W.; Liu, J. *BioMed Research International*. 2015, 2015, 1-9.
3. Mainardi, M.; Di Garbo, A.; Caleo, M.; Berardi, N.; Sale, A.; Maffei, L. *Frontiers in aging neuroscience*. 2014, 6, 1.