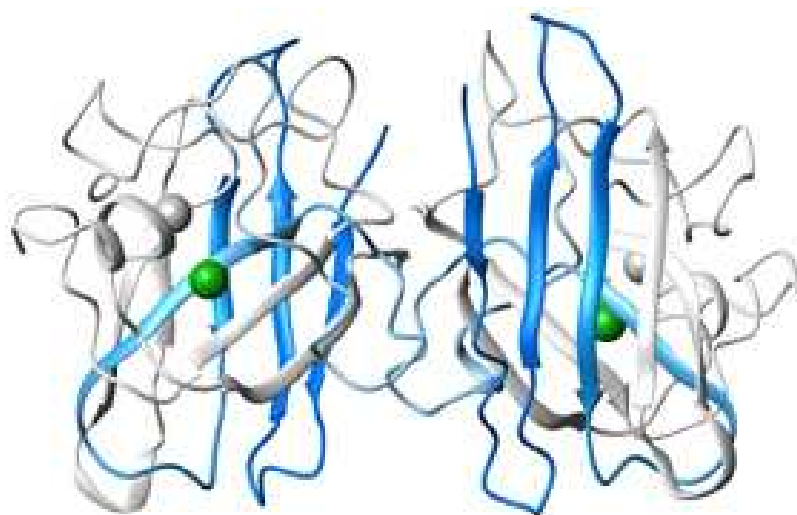


***Búsqueda de isoformas
tejido específicas de la
Cu/Zn Superóxido
Dismutasa humana
mutante G93A***



María José Lista

Tutora: Dra. Mónica Marin

1.0 RESUMEN

Las denominadas enfermedades conformacionales constituyen un grupo de patologías asociadas al mal plegamiento de alguna proteína particular. Entre estas se encuentran ciertas enfermedades neurodegenerativas como la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA), Alzheimer, Parkinson, etc. La ELA se caracteriza por la pérdida selectiva de las motoneuronas de la médula espinal y la corteza motora, que lleva a una parálisis muscular progresiva. Un 90% de los casos clínicos de ELA son del tipo esporádicos (SALS), mientras que el 10% restante son pacientes con antecedentes familiares para dicha enfermedad (FALS). Dentro de este grupo, entre un 20-25% han sido asociados a mutaciones en el gen *sod1* que codifica para la proteína Cu/Zn Superóxido Dismutasa, y se han observado agregados proteicos insolubles de esta proteína en el cerebro y en la médula espinal. Debido a que la hSOD es una enzima que se encuentra altamente expresada en todos los tejidos de manera soluble, nos planteamos la interrogante de porque la aparición de estos agregados parece estar relacionada con el lugar de biosíntesis. En este proyecto se propuso profundizar el estudio de la agregación de proteínas tejido-específica sintetizadas *in vivo*, utilizando como modelo la Cu/Zn SOD humana hSOD G93A sintetizada en diferentes tejidos de rata. Para ello, se extrajeron proteínas de distintos tejidos de rata hSOD G93A, se fraccionaron de acuerdo a la solubilidad, y se evaluó el reparto de la hSOD en las fracciones de proteínas solubles e insolubles. Las proteínas extraídas fueron analizadas mediante electroforesis en una y dos dimensiones y el perfil de la hSOD se analizó mediante western blot. En el perfil electroforético bidimensional se identificaron spots característicos de algunos tejidos correspondientes al Sistema Nervioso Central.

2.0 ÍNDICE

1.0 RESUMEN	1
2.0 ÍNDICE	2
3.0 INTRODUCCIÓN	3
3.1- Enfermedades Conformacionales (PCDs: Protein Conformational Diseases)	3
3.2- La Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA)	4
3.3- Cu/Zn- Superóxido Dismutasa (Cu/Zn-SOD)	6
3.4- Antecedentes	8
4.0 OBJETIVOS	9
4.1- OBJETIVO GENERAL	9
4.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS	9
5.0 MATERIALES y MÉTODOS	10
5.1- Obtención de los órganos de rata transgénica hSOD G93A	10
5.2- Extractos proteicos de los diferentes tejidos	10
5.3- Separación de fracciones soluble e insoluble	10
5.4- Cuantificación de proteínas	10
5.5- Electroforesis de proteínas en una dimensión (SDS-PAGE)	11
5.6- Electroforesis de proteínas en dos dimensiones (2D)	11
5.7- Western Blot en una y dos dimensiones	11
6.0 RESULTADOS y DISCUSIÓN	13
6.1 Cuantificación de proteínas	13
6.2 Análisis de proteínas por electroforesis SDS-PAGE	17
6.3 Identificación de la Cu/Zn SOD mediante Western Blot (WB)	18
6.4 Análisis del perfil electroforético en dos dimensiones (2D), e identificación por Western Blot de la hSOD (2D-WB)	20
7.0 CONCLUSIONES	26
8.0 PERSPECTIVAS	26
9.0 ANEXO	27
10.0 BIBLIOGRAFÍA	28

3.0 INTRODUCCIÓN

3.1-Enfermedades Conformacionales (PCDs: Protein Conformational Diseases)

En los últimos años se han identificado ciertas patologías, entre las cuales se encuentran varias enfermedades neurodegenerativas, asociadas al mal plegamiento de una proteína en particular. A este grupo de enfermedades se las ha denominado conjuntamente *enfermedades conformacionales*. Entre estas se destacan: Alzheimer, encefalopatías espongiiformes, Parkinson, Esclerosis Lateral Amiotrófica, etc.

En ellas, se presenta un cambio en la estructura secundaria o terciaria de una o más proteínas asociadas con la enfermedad. Las causas de estas enfermedades no han sido establecidas pero se ha propuesto que podrían deberse a una ganancia de función tóxica o a la pérdida de la función biológica normal de la proteína (Soto 2001). Las alteraciones en la conformación de las proteínas podrían deberse por ejemplo, a mutaciones en la estructura primaria de las proteínas involucradas, a variaciones en las modificaciones post-traduccionales, etc., lo cual llevaría en muchos casos la formación de agregados insolubles en las células (Ciechanover and Brundin 2003).

La aparición de estos agregados en los tejidos afectados no ha podido dilucidarse si surge como consecuencia de la enfermedad o es una de las posibles causas de la misma (Soto 2001).

En general los agregados proteicos insolubles en las llamadas PCDs no se producen en todos los tejidos donde se expresa dicha proteína, sino que la agregación se encuentra asociada a un tejido en particular. Por ejemplo en la enfermedad de Parkinson se observan agregados proteicos insolubles de la proteína α -sinucleína en el citoplasma de células gliales, formando los cuerpos de Lewy (Hoyer, Antony et al. 2002). Otro ejemplo de agregación tejido-específica se observa en la enfermedad de Alzheimer en donde se visualizan agregados de la proteína β -amiloide ($A\beta$) en el cerebro y no en otros tejidos (Jucker and Walker 2011). A pesar de los avances en la investigación de estas enfermedades, aún no se conocen los mecanismos involucrados en la

formación de los agregados proteicos, ni como estos se relacionan con las diferentes patologías denominadas conformacionales (Soto 2001).

En las últimas décadas se han generado modelos animales para el estudio de algunas de estas enfermedades. Los modelos animales desarrollados presentan comportamientos similares a los observados en pacientes que sufren de estas enfermedades. Su estudio ha puesto en evidencia el importante rol de un mal plegamiento con la concomitante agregación proteica en estas patologías.

3.2- La Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA)

La ELA, también conocida como enfermedad de Charcoff, fue descrita primeramente por Aran en 1848 y posteriormente por Charcoff y Joffroy en 1869 (Andersen 2006). Es una enfermedad neurodegenerativa caracterizada por la pérdida selectiva de las motoneuronas de la médula espinal y la corteza motora, que provoca parálisis muscular progresiva (Bruijn, Miller et al. 2004).

La forma en que se presenta la enfermedad se clasifica en: FALS para casos en los que existen antecedentes familiares y SALS para los casos esporádicos, en los cuales no hay antecedentes en la familia. Excepto por casos atípicos de ELA, la forma familiar de esta patología es clínicamente indistinguible de los casos esporádicos (Kunst 2004). Los casos esporádicos representan un 90% del total y en estos se desconocen las causas de la enfermedad. El 10% restante corresponde a los casos familiares, entre los cuales un 20 y un 25% han sido relacionados a mutaciones en el gen *sod1* que codifica para la enzima Cu/Zn-Superóxido Dismutasa (Cu/Zn-SOD) (Barbosa, Cerqueira et al. 2010), (Gagliardi, Cova et al. 2010), (Estevez, Crow et al. 1999).

Aunque se desconocen los mecanismos por los cuales la SOD1 se relaciona con la degeneración de las motoneuronas, se han propuesto dos mecanismos principales: 1) que las mutaciones en el gen *sod1* inducen un cambio conformacional en esta enzima que lleva a la agregación; 2) que se debe al daño oxidativo derivado de las formas oxidantes de la SOD1. En apoyo a esta hipótesis algunos autores muestran que tanto en los modelos animales como

en pacientes de ELA hay presencia de nitrotirosinas y peroxidación lipídica (Bosco, Morfini et al. 2010),(Rakhit and Chakrabartty 2006),(Andersen 2006). Existen evidencias que muestran que la citotoxicidad que sufren las motoneuronas se debe a una ganancia de función tóxica de la SOD1 más que a una pérdida de la función dismutasa de esta misma, ya que los ratones knockout para SOD1 no desarrollan la enfermedad (Bosco, Morfini et al. 2010). Se ha propuesto que una posible ganancia de función podría ser la generación de radicales libres, o la formación de isoformas de la enzima deficientes de zinc, que desestabilizan la estructura de la proteína (Rakhit, Cunningham et al. 2002).

Se han identificado aproximadamente 131 mutaciones en el gen *sod1* que codifica para esta enzima (Furukawa, Kaneko et al 2010). Entre estas 108 corresponden a mutaciones que llevan a un cambio de aminoácido en al menos 64 posiciones distintas, conservándose el largo total de la cadena polipeptídica, sin embargo también se han identificado cambios en el marco de lectura, inserciones o deleciones. Entre estas se encuentra la mutación G93A. La mutación G93A debilita la estructura de la proteína haciéndola más propensa a la agregación(Furukawa and O'Halloran 2005).

Se ha evidenciado la presencia de agregados proteicos insolubles en pacientes con ELA familiar asociado a mutaciones en la SOD citosólica, similares a los encontrados en otras patologías neurodegenerativas como el Alzheimer, Parkinson y encefalopatías espongiformes. Esto llevó a muchos investigadores a clasificar esta patología como una enfermedad conformacional, debida al mal plegamiento y a la formación de agregados fibrilares de varias proteínas, en particular de la Cu/Zn-SOD (Valentine, Doucette et al. 2005). Si bien la SOD es una proteína que se encuentra altamente expresada en todo el organismo, la formación de estos agregados se ha visto solamente en el sistema nervioso, a pesar de que las concentraciones de esta enzima en otros tejidos como ser hígado o riñón son superiores que en la médula espinal, por ejemplo (Kunst 2004), (Watanabe, Dykes-Hoberg et al. 2001). Asimismo se ha propuesto que la acumulación de los agregados proteicos insolubles de la SOD1 inhiben el transporte axonal y la funcionalidad mitocondrial, contribuyendo de esta forma a la muerte de las motoneuronas (Furukawa, Kaneko et al. 2008).

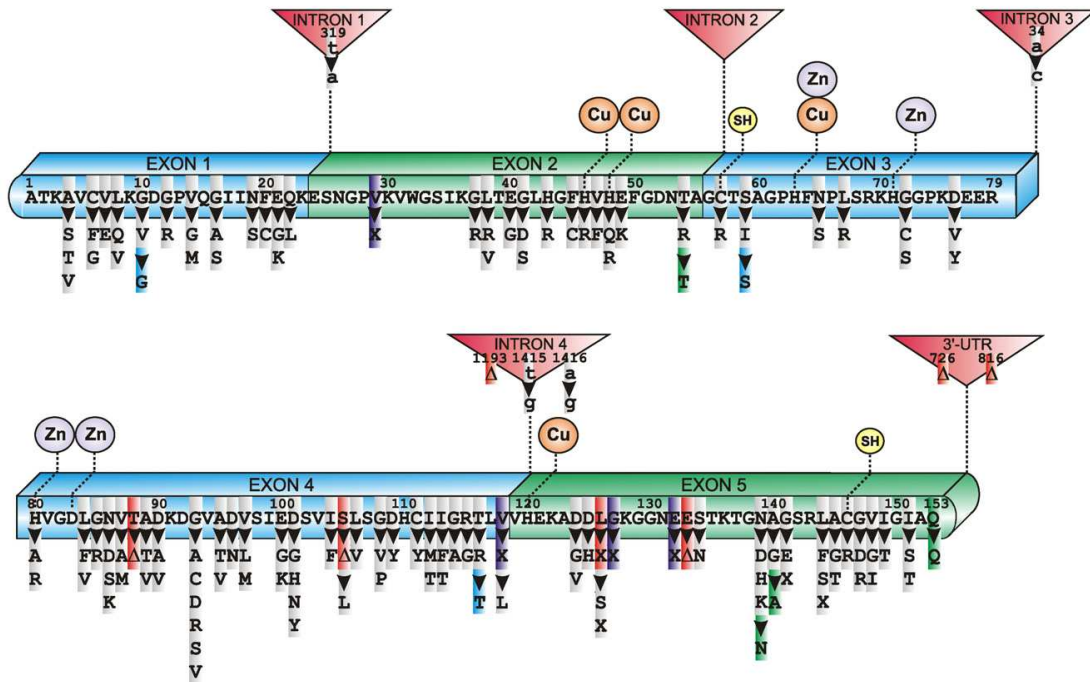


Figura 1. Diagrama esquemático de la secuencia del gen *sod1*. En el esquema se muestran los exones, intrones, sitios de unión a los iones metálicos, ubicación de los puentes disulfuro y la ubicación de las distintas mutaciones asociadas a sELA y fELA. En gris se representan las mutaciones sin sentido, en violeta las inserciones, en rojo las deleciones y en azul/verde las mutaciones sinónimas (Turner and Talbot 2008).

3.3- Cu/Zn- Superóxido Dismutasa (Cu/Zn-SOD)

La Cu/Zn Superóxido Dismutasa es una enzima antioxidante que se encarga de dismutar el radical superóxido a peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular (Yamakura and Suzuki 1980).

El gen *sod1* que codifica para esta enzima está constituido por cinco exones y cuatro intrones. La mayoría de las mutaciones encontradas se hallan en los exones cuatro y cinco y en general implican un cambio de aminoácido.

La Cu/Zn-SOD es una metaloenzima homodimérica que ha sido encontrada en el citosol, núcleo, peroxisoma y espacio mitocondrial intermembrana de células eucariotas, así como también en el espacio periplásmico de células procariotas. Presenta un plegamiento de tipo inmunoglobulina. Está presente en la mayoría de los organismos eucariotas y su secuencia aminoacídica está altamente

conservada, sugiriendo que esta enzima desempeña un rol muy importante en la homeostasis celular.

Cada monómero de 16 kDa se compone de 153 aminoácidos, dos iones metálicos, Cu^{2+} y Zn^{2+} y un puente disulfuro interno entre las cisteínas 57 y 146, el que tendría una importancia a nivel estructural y también funcional (Valentine, Doucette et al. 2005). Cada monómero se estructura formando ocho hojas β que juntas forman un barril β y dos grandes loops funcionalmente importantes, el loop electrostático (que comprende los residuos 122-143) y el loop zinc (que abarca los residuos 49-84). El homodímero se encuentra estabilizado por numerosos puentes de hidrógeno. La dimerización disminuye la accesibilidad de solventes con la interfase del dímero aumentando la estabilidad de la enzima. La SOD es una de las proteínas más estables que se conoce. Presenta una T_m cercana a la temperatura de ebullición (85-95 °C), y se ha determinado que incluso en 4 M de cloruro de guanidinio y 8 M de urea la enzima mantiene su actividad (Rakhit and Chakrabarty 2006). Presenta al menos cuatro modificaciones post-traduccionales: la dimerización, la inserción del cobre y del zinc y la formación del puente disulfuro.

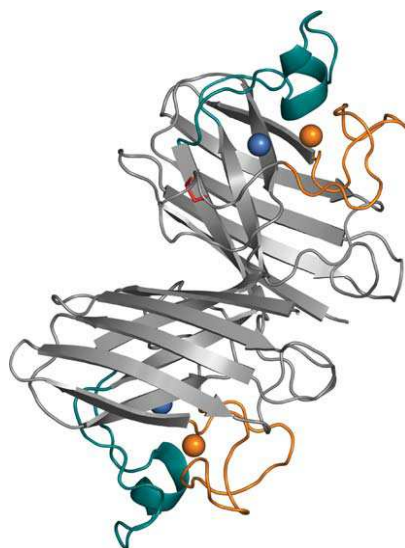


Figura 2. Estructura cristalográfica de Cu/Zn Superóxido Dismutasa. Los iones Cu^{2+} y Zn^{2+} en cada monómero, se representan como esferas azules y naranjas respectivamente. El puente disulfuro de cada monómero se representa en rojo (Valentine, Doucette et al. 2005).

3.4- Antecedentes

La línea de investigación de nuestro laboratorio se ha centrado en la investigación del plegamiento in vivo de proteínas, y en como el contexto de biosíntesis y la maquinaria de traducción afectan la conformación que adopte la proteína en la célula.

Dentro de esta temática y en relación a la conformación de la SOD trabajos previos realizados por Palacios y col. han demostrado la presencia de distintas variantes conformacionales de la SOD humana en las fracciones solubles de cerebro e hígado de ratas transgénicas hSOD G93A.

Mediante análisis de proteínas por electroforesis en geles bidimensionales se ha mostrado que en el cerebro de ratas transgénicas la hSOD se presenta bajo siete isoformas, que presentan diferente punto isoeléctrico y peso molecular. En cambio el mismo análisis de muestras provenientes de hígado reveló la presencia de cinco spots correspondientes a la hSOD. Esta observación sugiere que al menos dos isoformas pueden ser específicas de cerebro.

Paralelamente, F.Palacios en su tesis de maestría comparó la conformación de la hSOD extraída de cerebro de rata y la producida en *E.coli*, por diferentes aproximaciones experimentales: estudios de dicroísmo circular y espectroscopía de fluorescencia intrínseca y de unión al ANS. Mediante estos estudios se logró mostrar que la hSOD mutante G93A extraída de rata transgénica presentaba cambios en la estructura secundaria con respecto a la misma enzima producida en *E.coli*.

Además mediante estudios de desnaturalización térmica de proteínas permitieron mostrar que la SOD mutante presenta una menor T_m que la SOD wt, lo cual indica que es una enzima más inestable.

Los resultados obtenidos por F.Palacios sobre los distintos perfiles de la hSOD en cerebro y en hígado mediante electroforesis bidimensional, sugieren que las distintas variantes conformacionales encontradas podrían deberse a diferentes modificaciones post-traduccionales de esta enzima que fueran tejido-específicas. Sin embargo esta hipótesis no ha podido ser aún verificada (Palacios, Cota et al. 2010).

4.0 OBJETIVOS

4.1- OBJETIVO GENERAL

a) Comprender los mecanismos involucrados en la agregación de proteínas tejido-específicas sintetizadas *in vivo*, utilizando como modelo la formación de agregados de la Cu/Zn-SOD humana sintetizada en ratas transgénicas hSOD G93A.

b) Contribuir a la caracterización de la hSOD sintetizada en diferentes tejidos de rata, a través del análisis de la solubilidad y del perfil electroforético comparativo de la enzima

4.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

En particular nos propusimos:

1. Aislar proteínas de distintos tejidos de rata transgénica hSOD G93A.
2. Estimar la solubilidad de la enzima hSOD G93A sintetizada en cada tejido mediante la cuantificación del reparto de ésta en cada fracción proteica, soluble e insoluble.
3. Comparar el perfil de proteínas en las fracciones soluble e insoluble mediante electroforesis en una dimensión (SDS-PAGE) y Western Blot.
4. Determinar el patrón de electroforesis bidimensional (2D) de la SOD en cada fracción proteica de cada tejido.

5.0 MATERIALES y MÉTODOS

5.1- Obtención de los órganos de rata transgénica hSOD G93A

Los órganos de rata fueron cedidos por la Dra. Patricia Cassina Prof. Agr. de la Facultad de Medicina- UdelaR. Se obtuvieron muestras de hígado, riñón, médula espinal, cerebro y cerebelo. Se trabajó con órganos de ratas transgénicas, que presentaban síntomas de la enfermedad.

5.2- Extractos proteicos de los diferentes tejidos

Se realizó una homogenización con Potter 10% m/v en buffer de lisis, 15 mM Tris-Cl pH 7.4, 25 mM EDTA y cocktail de inhibidores de proteasas (SIGMA), en hielo, una velocidad de 5 incursiones del émbolo por min.

5.3- Separación de fracciones soluble e insoluble

A partir de los homogenizados obtenidos de los distintos tejidos se fraccionaron las proteínas por diferencia de solubilidad mediante dos centrifugaciones sucesivas, a 3000 g 4 °C durante 10 min y el sobrenadante fue centrifugado a 15800 g 4 °C durante 30 min.

Se ensayaron dos métodos de recuperación de la fracción insoluble, 1) precipitado resuspendido directamente en buffer de lisis (200 µL) y 2) dos lavados del precipitado (con 450 µL de buffer de lisis y centrifugación a 15800 g a 4 °C durante 20 min.) y resuspender posteriormente en urea 3 M.

5.4- Cuantificación de proteínas

Para la cuantificación de las proteínas de las fracciones soluble e insoluble se utilizó el kit BCA Protein Assay de Pierce. (Protocolo según indicaciones del fabricante). La cuantificación de las fracciones insolubles pudo realizarse por este método, ya que el mismo es compatible con concentraciones de urea menores o iguales a 3M.

5.5- Electroforesis de proteínas en una dimensión (SDS-PAGE)

Se realizaron geles de poliacrilamida 12% desnaturizantes. Se sembraron 5 µg de proteínas totales de cada fracción. Como método de tinción se utilizó azul de Coomassie. (Según protocolo extraído de “Current Protocols in Molecular Biology” 1987).

5.6- Electroforesis de proteínas en dos dimensiones (2D)

El análisis de proteínas en geles bidimensionales fue realizado en la Unidad de Bioquímica y Proteómica Analítica (UByPA) del Instituto Pasteur de Montevideo. Se utilizó el sistema 2D de General Electric. Para la primera dimensión se emplearon strips IPG pH 3-11 NL de 7 cm. Programa de isoelectroenfoco: 1. 300V, constante 30 min; 2. 1000V, en gradiente, 30 min; 3. 5000V, en gradiente, 80 min, 4. 5000V, constante, hasta 2 kVh. La segunda dimensión se realizó en un gel de poliacrilamida 15% 10x10x0, 1cm. El gel fue teñido con nitrato de plata (Según protocolo extraído de “Molecular Cloning” Maniatis 1987).

5.7- Western Blot en una y dos dimensiones

Las muestras se corrieron en un gel de poliacrilamida 12% desnaturizante, se sembraron 5,0 µg de proteínas totales para una dimensión y 6 µg para dos dimensiones. Posteriormente, las proteínas resueltas en los geles de separación fueron transferidas a una membrana Hybond-P/ Hybond-C extra de

Amersham 2 hrs a 200mA. El bloqueo de la membrana se realizó overnight con buffer conteniendo 3% BSA, 2% Glicina en TBST (Tris-HCl pH 7.4, Tween 20 20% y NaCl 5M). Para el revelado de la membrana se utilizó un anticuerpo primario policlonal: anti SOD (elución glicina), específico para SOD humana, producido en nuestro laboratorio previamente [Palacios et al 2010], en una concentración de 1/750 durante 2 hrs, a temperatura ambiente. Posteriormente se realizaron seis lavados con buffer TBST de 5 min cada uno. Como anticuerpos secundarios se utilizaron dos anticuerpos anti-inmunoglobulinas de conejo monoclonales conjugados a peroxidasa de Amersham y de Sigma ambos en una concentración de 1/5000. Se realizó una incubación de 1 hora, a temperatura ambiente. Seguidamente se realizaron doce lavados con TBST de 5 min cada uno. Por último para el revelado se utilizó el reactivo quimioluminiscente de Sigma y las películas de revelado Kodak. Se utilizaron revelador y fijador comerciales de mediQ (Uruguay).

6.0 RESULTADOS y DISCUSIÓN

Con el propósito de evaluar diferencias de solubilidad en la enzima Cu/Zn-hSOD en diferentes tejidos y en el patrón 2D, se extrajeron diversos órganos de una rata transgénica sintomática hSOD G93A, para el posterior análisis de proteínas.

En primer lugar se realizaron los homogeneizados de los órganos (riñón, hígado, cerebro, cerebelo y médula espinal) en Potter. Se realizó el fraccionamiento de proteínas por centrifugación diferencial del homogenizado obteniéndose así dos fracciones proteicas una soluble (sobrenadante) y otra insoluble (precipitado).

Con las fracciones obtenidas se procedió a la cuantificación de proteínas totales de cada fracción y al posterior análisis de proteínas.

6.1 Cuantificación de proteínas

Se realizó la cuantificación de proteínas utilizando el método del ácido bicinconínico (BCA) como fue descrito en materiales y métodos.

Se realizó por duplicado la curva de calibración utilizando concentraciones decrecientes de la proteína seroalbúmina bovina (BSA) en el rango de 2000 $\mu\text{g/mL}$ hasta 0 $\mu\text{g/mL}$.

Para cada concentración se obtuvieron los siguientes datos de absorbancia a 562 nm ($\text{Abs}_{562\text{nm}}$):

Concentración µg/ml	Abs (562 nm)	Abs (562 nm)- blanco (0,094)
2000	2,753	2,659
2000	2,848	2,754
1500	2,296	2,202
1500	2,493	2,399
1000	1,668	1,575
1000	1,778	1,685
750	1,248	1,155
750	1,262	1,168
500	0,904	0,810
500	0,950	0,856
250	0,546	0,452
250	0,595	0,501
125	0,338	0,245
125	0,337	0,243
25	0,148	0,054
25	0,138	0,044

Tabla 1. Datos obtenidos para la curva de calibración. En la tabla se muestran los valores obtenidos de absorbancia a 592 nm para cada concentración.

Posteriormente se graficaron los valores de absorbancia (562nm) en función de la concentración y se buscó la recta que mejor se ajustaba a los datos experimentales, obteniéndose el siguiente gráfico:

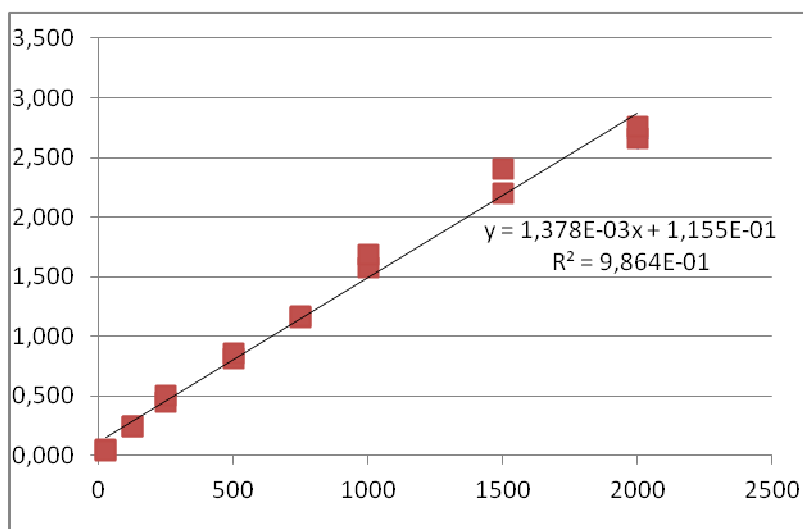


Gráfico 1. Curva de calibración con estándar de BSA para el método de BCA. Absorbancia a 592 nm en función de la concentración en $\mu\text{g/mL}$, para la curva de calibración realizada. En el gráfico se muestra la ecuación de la recta que mejor se ajusta a los datos experimentales con su correspondiente coeficiente de regresión lineal, r .

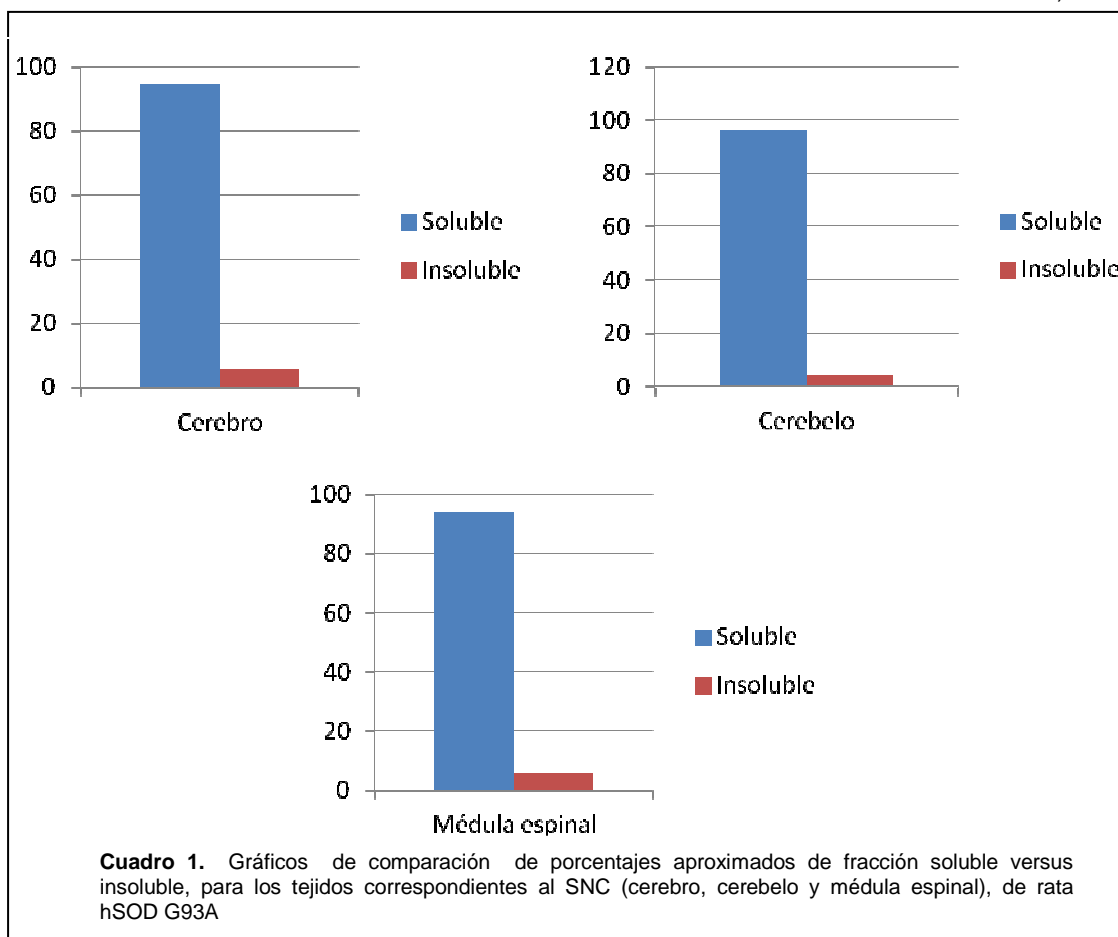
A partir de la ecuación de la recta se calcularon las concentraciones correspondientes a cada muestra, teniendo en cuenta los valores que entraban en el rango de linealidad de la curva de calibración.

Las muestras fueron analizadas por duplicado en tres diluciones, 1/3, 1/6 y 1/12, obteniéndose las siguientes concentraciones finales:

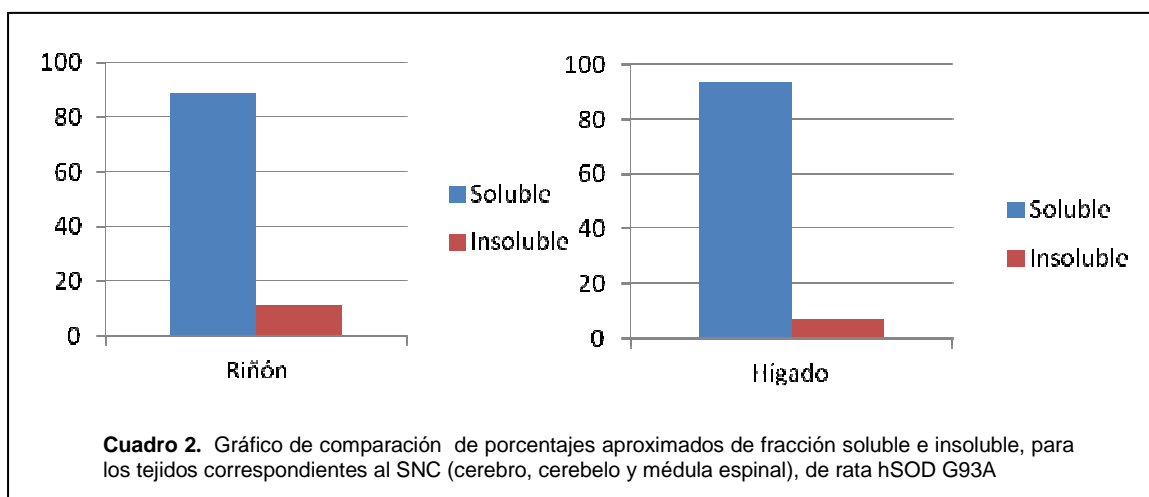
Muestra	[] $\mu\text{g/mL}$
Cerebro Soluble	2790,63
Cerebro Insoluble	1335,74
Cerebelo Soluble	2560,06
Cerebelo Insoluble	891,75
Médula Soluble	1619,95
Médula Insoluble	797,81
Hígado Soluble	8255,22
Hígado Insoluble	4772,44
Riñón Soluble	6176,74
Riñón Insoluble	6219,64

Tabla 2. Resultados de la cuantificación de las muestras de rata transgénica hSOD G93A sintomática, utilizando el kit BCA Protein Assay de Pierce.

Utilizando las concentraciones determinadas se graficó para cada tejido los porcentajes totales de proteína soluble e insoluble. Se obtuvieron las siguientes representaciones:



Como se observa en los tres tejidos correspondientes al SNC, la proporción de proteínas solubles es mucho mayor a la de proteínas insolubles. En los tres casos se presentan una relación aproximada de 95% soluble, 5% insoluble. Todas las medidas presentan un error asociado de +/- 0,01µg/mL debido únicamente al método de cuantificación utilizado. Esto se debe a que el fraccionamiento de proteínas de los tejidos extraídos pertenece a una única rata sintomática.



En el caso de hígado y riñón, también ocurre que la mayor cantidad de proteínas se encuentra en la fracción soluble, pero para el caso de riñón el porcentaje de proteínas insolubles corresponden a aproximadamente un 11% del total de proteínas. Al igual que para los tejidos correspondientes al SNC, estas medidas también presentan un error asociado de $\pm 0,01 \mu\text{g/mL}$.

6.2 Análisis de proteínas por electroforesis SDS-PAGE

Con el propósito de analizar el perfil electroforético de las fracciones proteicas soluble e insoluble de los órganos de rata hSOD G93A, se sembraron $5 \mu\text{g}$ de proteínas de cada fracción en un gel de electroforesis de poliacrilamida 12%.

Se obtuvo el perfil que se muestra en la figura 3:

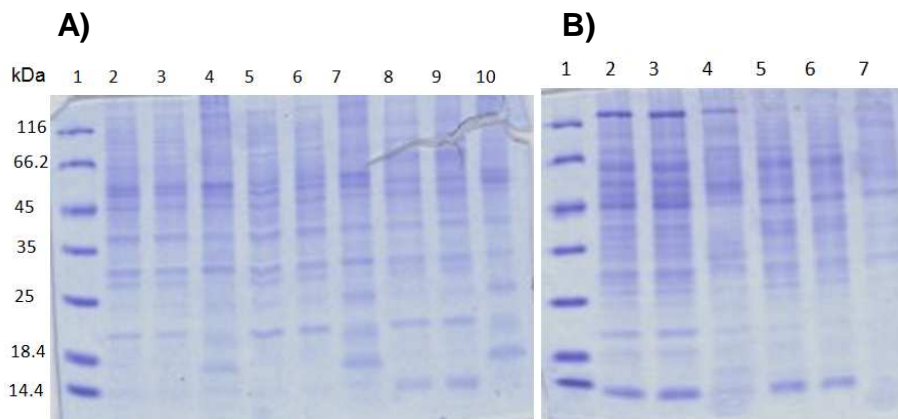


Figura 3. Perfil electroforético de las fracciones proteicas soluble (FS) e insoluble (FIS) de muestras de rata transgénica hSOD G93A. A) 1: marcador de PM (Unstained molecular weight Fermentas), 2 y 3: FS-cerebro, 4: FIS-cerebro, 5 y 6: FS-cerebelo, 7: FIS-cerebelo, 8 y 9: FS-médula y 10: FIS-médula. B) 1: Marcador de PM (Unstained molecular weight Fermentas), 2 y 3: FS-hígado, 4: FIS-hígado, 5 y 6: FS-riñón y 7: FIS-riñón. Se sembraron $5 \mu\text{g}$ de proteínas totales. SDS-PAGE 12% acrilamida, tinción Coomassie.

Como se muestra en la figura 3, en todos los carriles parece haber cantidad similar de proteínas por lo cual puede decirse que la cuantificación fue correcta. Si se compara el perfil de las bandas proteicas correspondientes a las fracciones solubles e insolubles de cada tejido, si bien algunas parecen ser diferentes, otras se repiten en ambas fracciones. Esto hace pensar que la fracción insoluble presentaría trazas de la fracción soluble, o que el

fraccionamiento no fue muy bueno. Esta observación se tuvo en cuenta en la discusión los resultados obtenidos en los posteriores western blot. Para mejorar el fraccionamiento se debería lavar el precipitado más extensamente, de forma de eliminar completamente proteínas de la fracción soluble.

6.3 Identificación de la Cu/Zn SOD mediante Western Blot (WB)

Con el propósito de identificar la hSOD en las fracciones proteicas de cada tejido y establecer el reparto según la solubilidad, se realizó Western Blot. Para ello se sembró en un gel de poliacrilamida 12% la misma cantidad de proteínas que en el gel para tinción Coomassie (5µg de proteína total).

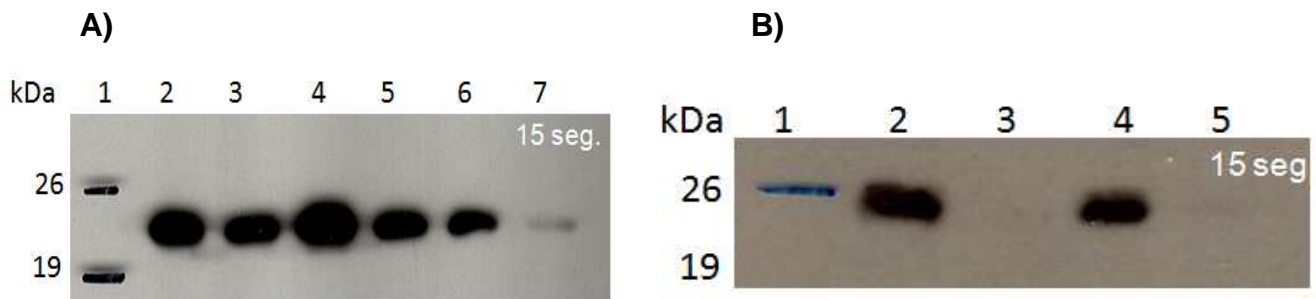


Figura 4. Western Blot de las fracciones (F) soluble (S) e insoluble (IS) de muestras de rata transgénica hSOD G93A. A) 1: marcador de PM (Prestained molecular weight Fermentas), 2: FS-cerebro, 3: FIS-cerebro, 4:FS-cerebelo, carril 5: FIS-cerebelo, 6: FS-médula y 7: FIS-médula. B) 1: Marcador de PM (Prestained molecular weight Fermentas), 2: FS-hígado, 3: FIS-hígado, 4: FS-riñón y 5: FIS-riñón. Se sembraron 5 µg de proteínas totales. SDS-PAGE 12% acrilamida.

Como se muestra en la figura 4 la Cu/Zn-SOD presenta una migración aparente de 24 kDa con un peso molecular de 16 kDa por monómero. Con este resultado y analizando el gel de electroforesis tinción Coomassie, puede observarse que tanto para las fracciones solubles como insolubles de los tejidos correspondientes al SNC se observa una banda de muy baja intensidad que se correspondería con dicha enzima, mientras que para hígado y riñón esta banda solo se observa en las fracciones solubles. Además en el western blot puede visualizarse que la hSOD presenta una distribución diferencial en los tejidos correspondientes al Sistema Nervioso Central (cerebro, cerebelo y médula espinal), mientras que en hígado y riñón la proteína se encuentra

únicamente en la fracción soluble. Este resultado concuerda con la bibliografía en donde se ha mostrado la presencia de agregados insolubles de la SOD únicamente en tejidos pertenecientes al Sistema Nervioso Central (Rakhit, Cunningham et al. 2002). Este resultado también apoya la hipótesis planteada al inicio, de que esta enzima se distribuye diferencialmente en distintos tejidos en particular en el SNC.

En el cerebro la proteína se distribuye igualmente en ambas fracciones, en cerebelo se presenta también en ambas pero sin embargo hay una mayor presencia en la fracción soluble, por último en médula espinal la SOD se encuentra mayoritariamente en la fracción soluble.

Como se muestra en la figura la SOD es una proteína abundante en todos estos tejidos, ya sea presentándose soluble, insoluble o ambos.

Las diferencias encontradas en cuanto a la solubilidad de esta enzima plantean la interrogante de porque si bien esta enzima se expresa y es abundante en la mayoría de los tejidos, presenta una distribución que parece ser tejido específica.

Consideramos que las diferencias de solubilidad de la SOD en los tejidos del SNC podría estar asociada a: 1) diferentes modificaciones post-traduccionales (oxidaciones, glicosilaciones, fosforilaciones, etc.), 2) diferencias conformacionales, 3) formación de complejos con otras proteínas específicas.

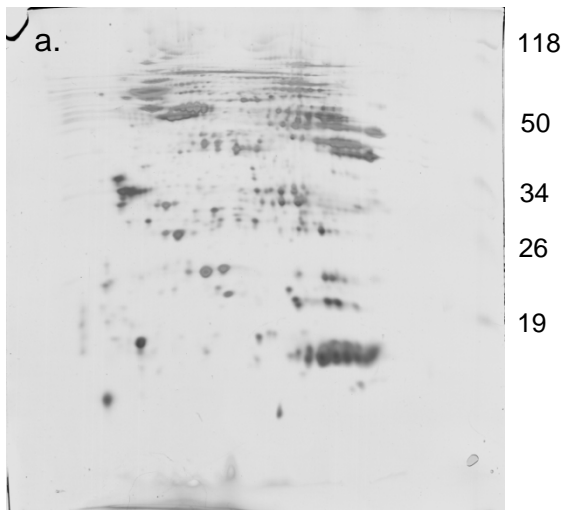
Por lo tanto con el propósito de explorar estas posibilidades, se analizaron las distintas muestras proteicas mediante electroforesis bidimensional, con el fin de analizar la existencia de diferentes modificaciones post-traduccionales de esta enzima.

6.4 Análisis del perfil electroforético en dos dimensiones (2D), e identificación por Western Blot de la hSOD (2D-WB)

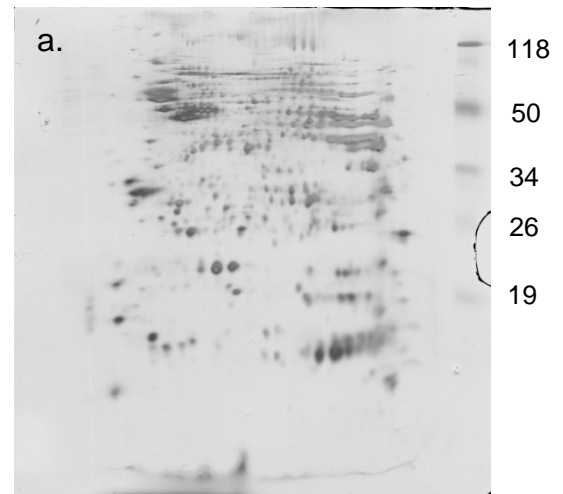
Se analizaron las fracciones soluble e insoluble de proteínas de los tejidos pertenecientes al sistema nervioso central (cerebro, cerebelo y médula espinal), por electroforesis bidimensional y las fracciones proteicas solubles de hígado y de riñón.

Fracciones proteicas de Cerebelo

I) FS-Cerebelo



II) FIS-Cerebelo



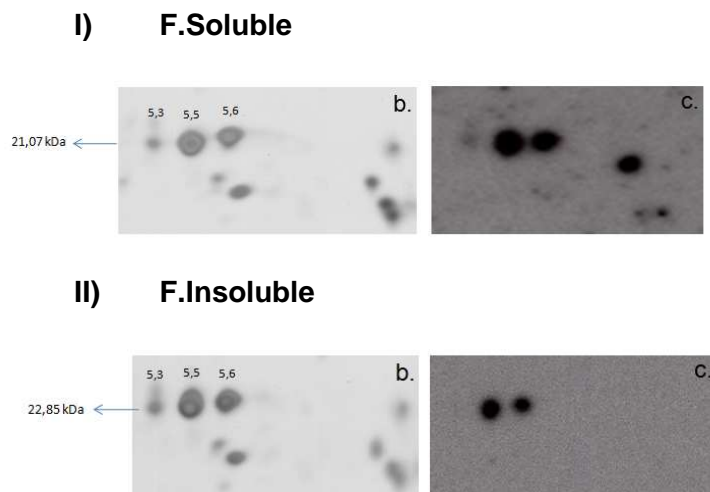


Figura 5. Análisis 2D de las fracciones soluble e insoluble de cerebelo. I) Fracción soluble; en la figura a se muestra el resultado del gel de poliacrilamida tinción plata, en la b sección ampliada de la región donde se encuentran los spots correspondientes a la Cu-Zn-SOD del gel tinción plata, y en c el resultado del western blot. II) Fracción insoluble; en la figura a se muestra el resultado del gel luego de la tinción con nitrato de plata, en la b sección ampliada de la región donde se encuentran los spots correspondientes a la Cu-Zn-SOD del gel tinción plata, y en c el resultado del western blot (se utilizó como anticuerpo primario anti-hSOD $[\lambda]=1/750$, y como anticuerpo secundario anti-Ig de conejo de Amersham $[\lambda]=1/5000$). Se sembraron 6 μg de proteínas totales. SDS-PAGE 15% acrilamida.

Como se muestra en las figuras 5a y 5b, correspondientes a el resultado obtenido en geles bidimensionales teñidos con nitrato de plata (AgNO_3), la Cu/Zn-hSOD extraída de cerebelo de rata, se presenta bajo tres isoformas de igual PM y distinto punto isoeléctrico (5.3; 5.5 y 5.6), tanto en la fracción soluble como insoluble. Las figuras 5c corresponden a los resultados obtenidos por western blot de cada fracción. En la fracción soluble se visualizan tres spots, lo cual concuerda con el resultado obtenido para la misma fracción en el gel con tinción de AgNO_3 . Sin embargo para la fracción insoluble solo logran revelarse dos spots (correspondiente a un pI de 5.5 y 5.6). Esta diferencia en el perfil de proteínas revelada por el anticuerpo específico pudo deberse a un problema en la transferencia de proteínas desde el gel de poliacrilamida que haya provocado que este spot (pI 5.3) no se transfiera completamente a la membrana o lo haga en menor medida que los demás y por esto no llega al límite de detección del sistema utilizado. En este último hay una mancha intensa que no corresponde al revelado de un spot de la proteína, esta pudo deberse a una sobreexposición de la película, ya que en un tiempo de

exposición menor (10min.), esta no aparece. De todas formas se debería repetir el análisis de esta muestra para comprobar la hipótesis.

En ambas fracciones el spot mayoritario es el correspondiente a un $pI = 5.5$.

Fracciones proteicas de Cerebro

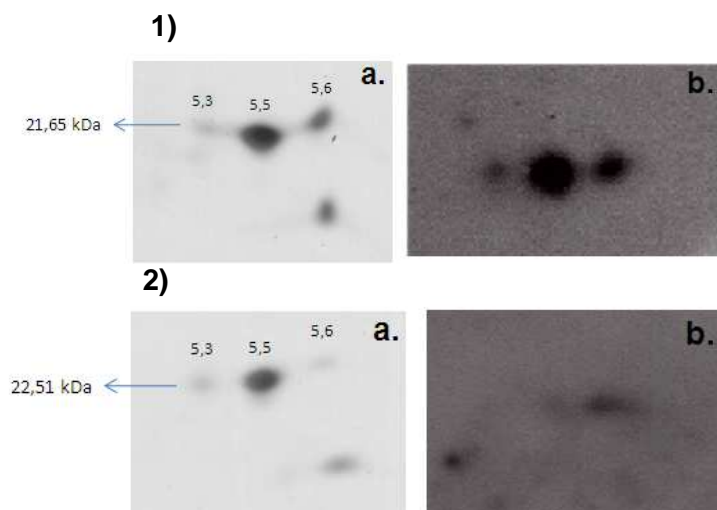


Figura 6. Análisis 2D de de las fracciones soluble e insoluble de cerebro. 1) Fracción soluble; en la figura A se muestra el resultado del gel de poliacrilamida tinción plata y en la B el resultado del western blot. 2) Fracción insoluble; en la figura A se muestra el resultado del gel luego de la tinción con nitrato de plata, y en la B el resultado del western blot (se utilizó como anticuerpo primario anti-hSOD [λ]=1/750, y como anticuerpo secundario anti-Ig de conejo de Amersham [λ]=1/5000). Se sembraron 6 μ g de proteínas totales. SDS-PAGE 15% acrilamida.

Como se muestra en las figuras 6a, correspondientes a los resultados obtenidos para la electroforesis bidimensional con tinción de $AgNO_3$, la SOD extraída de cerebro aparece representada por tres spots tanto en la fracción soluble como en la insoluble. La isoforma mayoritaria claramente es la correspondiente a un punto isoeléctrico de 5.5 en ambas fracciones, sin embargo la isoforma correspondiente a un pI 5.6 presenta una cantidad relativa mayor en la fracción soluble que no se observa en la insoluble. En las figuras 6b, correspondiente a los western blot de cada fracción, se observan tres spots en la fracción soluble lo cual concuerda con el resultado obtenido en el gel con tinción de $AgNO_3$. Sin embargo para la fracción insoluble no se logró obtener un resultado de western blot con buena resolución, por lo tanto debería repetirse este análisis para sacar una conclusión a cerca de la distribución de la SOD.

Fracciones proteicas de Médula espinal

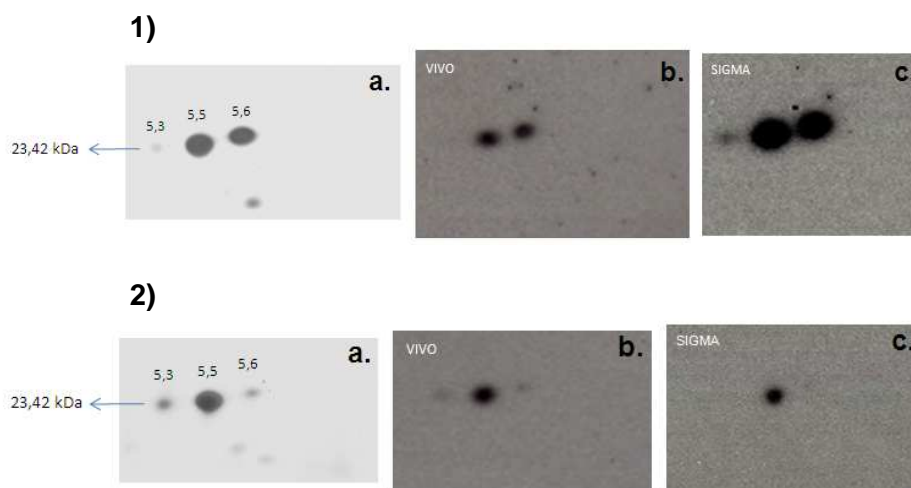


Figura 7. Análisis en dos dimensiones de las fracciones soluble e insoluble de médula espinal. 1) Fracción soluble; en la figura A se muestra el resultado del gel de poliacrilamida tinción plata, en la B el resultado del western blot utilizando sustrato Vivo Science y en C el resultado del western blot utilizando el sustrato Sigma. 2) Fracción insoluble; en la figura A se muestra el resultado del gel luego de la tinción con nitrato de plata, en la B el resultado del western blot utilizando el sustrato Vivo Science y en C el resultado del western blot utilizando el sustrato Sigma (se utilizó como anticuerpo primario anti-hSOD $[\lambda]=1/750$, y como anticuerpo secundario anti-Ig de conejo de Amersham $[\lambda]=1/5000$). Se sembraron 6 μg de proteínas totales. SDS-PAGE 15% acrilamida.

Como se muestra en la figura 7 la SOD producida en la médula espinal se presenta también bajo tres isoformas diferentes, las cuales son las mismas que aparecen en los otros tejidos del Sistema Nervioso Central (SNC). Sin embargo la isoforma que presenta un pI de 5.6 es mayoritaria en la fracción soluble mientras que en la fracción insoluble es la isoforma minoritaria. En referencia al western blot, se ensayaron dos sustratos comerciales para el revelado quimiluminiscente con peroxidasa, utilizando los mismos tiempos de exposición (10 min y 40 min). El sustrato de la compañía ViVo Science resultó ser menos sensible que el de la compañía SIGMA por lo se decidió continuar utilizando este.

Por tanto, luego de analizar los tres tejidos del SNC estudiados puede decirse que la hSOD se presenta bajo tres isoformas de distinto pI (5.3, 5.5 y 5.6), que

son las mismas para estos tejidos, por lo cual no detectamos una isoforma específica de alguno de ellos. La única diferencia observada es en cuanto a las cantidades relativas de cada isoforma. Para los tres tejidos la mayoritaria es la correspondiente a pI 5.5 pero las otras dos isoformas varían en cuanto a sus cantidades relativas.

Fracciones proteicas soluble de Riñón

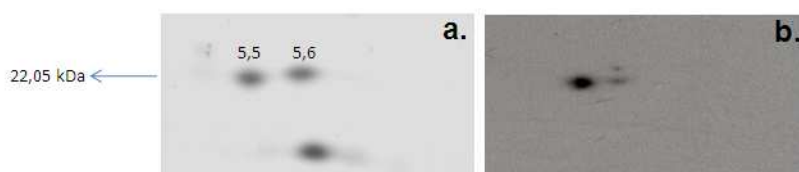


Figura 8. Análisis en dos dimensiones de la fracción soluble de riñón. En la figura A se muestra el resultado del gel de poliacrilamida tinción plata y en la B el resultado del western blot (se utilizó como anticuerpo primario anti-hSOD $[]=1/750$, y como anticuerpo secundario anti-Ig de conejo de Amersham $[]=1/5000$). Se sembraron 6 μ g de proteínas totales. SDS-PAGE 15% acrilamida.

A diferencia de lo observado para los tejidos correspondientes al SNC, en el riñón la hSOD solo se presenta bajo dos isoformas de diferente pI 5.5 y 5.6, la isoforma correspondiente a un pI de 5.3 no se detecta en este tejido, lo cual se observa en el gel de poliacrilamida con tinción con nitrato de plata y en el western blot. Este resultado indicaría que la isoforma correspondiente a un pI de 5.3 parecía ser específica de los tejidos del SNC.

Este spot al ser minoritario podría no detectarse si la cantidad de proteína es insuficiente para el límite de detección del ensayo. Para comprobar realmente que este spot sea específico del SNC debería de hacerse el ensayo sembrando una mayor cantidad de proteínas totales.

El análisis de proteínas de la fracción soluble extraída de hígado mediante electroforesis bidimensional y posterior Western Blot, no pudo resolverse por lo cual no se logró determinar la cantidad de spots en los cuales se presenta la SOD en dicha fracción. Esto pudo deberse a algún error en el proceso de transferencia que imposibilitó que estos spots logran transferirse o no lo suficientemente, o también a alguna falla en el proceso de revelado. Por esto

este resultado debe repetirse para poder sacar alguna conclusión a cerca de la distribución de la SOD humana en este órgano.

Si se logró obtener el perfil de proteínas en dos dimensiones de este tejido con tinción de AgNO_3 .

Fracción proteica soluble de Hígado

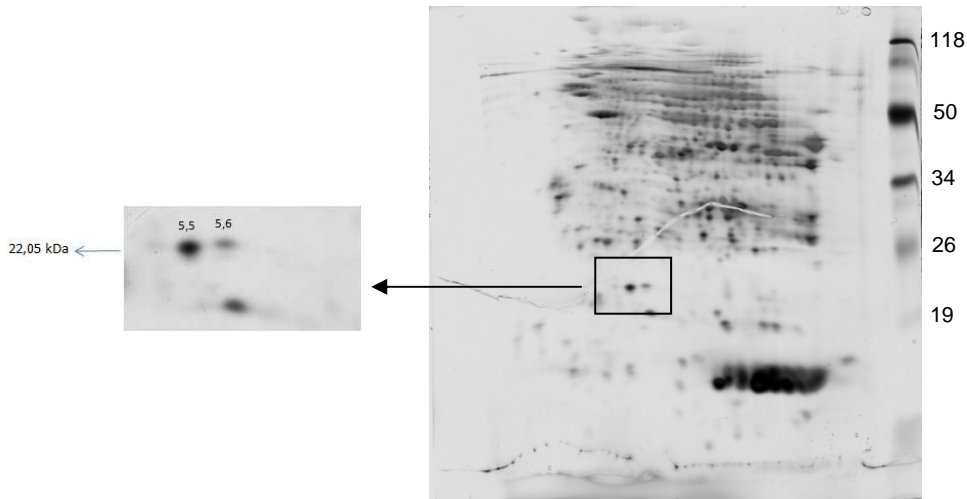


Figura 9. Perfil de proteínas en dos dimensiones de la fracción proteica soluble de hígado. SDS-PAGE 15%, tinción con nitrato de plata. Se presenta ampliada la zona donde se ubican los spots correspondientes a la Cu/Zn-hSOD.

La figura 9 corresponde al resultado obtenido en la electroforesis bidimensional de proteínas para la fracción proteica soluble de hígado. Como se muestra en la figura, los spots correspondientes a la Cu/Zn SOD (que se señalan con una flecha) parecerían ser dos (las isoformas correspondientes a pI 5,5 y 5,6), al igual que lo sucedido en riñón. Sin embargo se requiere para su confirmación la realización de ensayos duplicado al igual que un ensayo de western blot con el anticuerpo específico para la hSOD. Otra forma de corroborar nuestras suposiciones es realizar espectrometría de masas de esos spots, de esta forma se estaría también confirmando que se trata de la hSOD.

7.0 CONCLUSIONES

Este trabajo se centró en el análisis de la hSOD sintetizada en diferentes tejidos de rata transgénica hSOD G93A, con el propósito de explorar posibles modificaciones post-traduccionales que fueran tejido específicas, que pudieran estar asociadas a la formación de agregados insolubles en el sistema nervioso central. En relación a dicho objetivo en primer lugar se disecó material de una rata transgénica sintomática hSOD G93A y se extrajo la hSOD de distintos tejidos de la rata. Se obtuvieron las fracciones proteicas soluble e insoluble y estas fueron analizadas mediante electroforesis en una y dos dimensiones, y por western blot.

En relación a la solubilidad de esta enzima, se encontraron diferencias en la solubilidad en los distintos tejidos analizados. En el SNC la enzima se encuentra tanto en las fracciones soluble como insoluble, además el perfil 2D de la hSOD está determinado por tres spots de pI 5.3; 5.5 y 5.6, los cuales se presentan en proporciones variables.

En tanto en riñón y en hígado, la hSOD es soluble y en estos órganos no se detectó la isoforma de pI 5.3.

Al analizar los perfiles electroforéticos 2D y Western Blot, pudo identificarse un spot que parecería ser característico de las fracciones (soluble e insoluble) de los tejidos correspondientes al SNC.

8.0 PERSPECTIVAS

Estos resultados obtenidos son preliminares ya que fueron realizados con un único animal sintomático. Por lo tanto deben repetirse con otros animales en etapas similares de evolución de los síntomas, de forma de verificar la consistencia de las observaciones.

Si éstas se confirman, sería interesante identificar mediante espectrometría de masas que modificaciones se han producido en la enzima que llevan al perfil resuelto en 2D característico de los tejidos analizados.

9.0 ANEXO

Soluciones

- Buffer de corrida SDS-PAGE 10x: 144g de Glicina, 30.1g de Tris base y 10g de SDS, por litro.
- Buffer de carga SDS-PAGE 4x: 200mM Tris-HCl pH 6.8, 400mM DTT, 8% SDS, 0,4% Azul de Bromofenol y 40% Glicerol.
- Azul Coomassie: 0,05% Coomassie Brilliant Blue R-250, 45% de EtOH y 10% ácido acético.
- Decolorante: 30% EtOH y 70% ácido acético.
- Buffer TBST: 30 mL NaCl 5M, 10 mL Tris-Cl 1M pH 7,5 y 5 mL Tween 20 20%, por litro.
- Buffer de bloqueo: 3% BSA (seroalbúmina bovina), 2% Glicina en TBST.
- Buffer de homogenización: 15 mM Tris-Cl pH 7.4; 25 mM EDTA y cocktail de inhibidores de proteasas SIGMA.

10.0 BIBLIOGRAFÍA

- Andersen, P. M. (2006). "Amyotrophic lateral sclerosis associated with mutations in the CuZn superoxide dismutase gene." Curr Neurol Neurosci Rep **6**(1): 37-46.
- Barbosa, L. F., F. M. Cerqueira, et al. (2010). "Increased SOD1 association with chromatin, DNA damage, p53 activation, and apoptosis in a cellular model of SOD1-linked ALS." Biochim Biophys Acta **1802**(5): 462-471.
- Bosco, D. A., G. Morfini, et al. (2010). "Wild-type and mutant SOD1 share an aberrant conformation and a common pathogenic pathway in ALS." Nat Neurosci **13**(11): 1396-1403.
- Bruijn, L. I., T. M. Miller, et al. (2004). "Unraveling the mechanisms involved in motor neuron degeneration in ALS." Annu Rev Neurosci **27**: 723-749.
- Ciechanover, A. and P. Brundin (2003). "The ubiquitin proteasome system in neurodegenerative diseases: sometimes the chicken, sometimes the egg." Neuron **40**(2): 427-446.
- Estevez, A. G., J. P. Crow, et al. (1999). "Induction of nitric oxide-dependent apoptosis in motor neurons by zinc-deficient superoxide dismutase." Science **286**(5449): 2498-2500.
- Furukawa, Y., K. Kaneko, et al. (2008). "Complete loss of post-translational modifications triggers fibrillar aggregation of SOD1 in the familial form of amyotrophic lateral sclerosis." J Biol Chem **283**(35): 24167-24176.
- Furukawa, Y. and T. V. O'Halloran (2005). "Amyotrophic lateral sclerosis mutations have the greatest destabilizing effect on the apo- and reduced form of SOD1, leading to unfolding and oxidative aggregation." J Biol Chem **280**(17): 17266-17274.
- Gagliardi, S., E. Cova, et al. (2010). "SOD1 mRNA expression in sporadic amyotrophic lateral sclerosis." Neurobiol Dis **39**(2): 198-203.
- Hoyer, W., T. Antony, et al. (2002). "Dependence of alpha-synuclein aggregate morphology on solution conditions." J Mol Biol **322**(2): 383-393.
- Jucker, M. and L. C. Walker (2011). "Pathogenic protein seeding in Alzheimer disease and other neurodegenerative disorders." Ann Neurol **70**(4): 532-540.

- Kunst, C. B. (2004). "Complex genetics of amyotrophic lateral sclerosis." Am J Hum Genet **75**(6): 933-947.
- Palacios, F., G. Cota, et al. (2010). "An antibody-based affinity chromatography tool to assess Cu, Zn superoxide dismutase (SOD) G93A structural complexity in vivo." Biotechnol J **5**(3): 328-334.
- Rakhit, R., P. Cunningham, et al. (2002). "Oxidation-induced misfolding and aggregation of superoxide dismutase and its implications for amyotrophic lateral sclerosis." J Biol Chem **277**(49): 47551-47556.
- Rakhit, R. and A. Chakrabartty (2006). "Structure, folding, and misfolding of Cu,Zn superoxide dismutase in amyotrophic lateral sclerosis." Biochim Biophys Acta **1762**(11-12): 1025-1037.
- Soto, C. (2001). "Protein misfolding and disease; protein refolding and therapy." FEBS Lett **498**(2-3): 204-207.
- Turner, B. J. and K. Talbot (2008). "Transgenics, toxicity and therapeutics in rodent models of mutant SOD1-mediated familial ALS." Prog Neurobiol **85**(1): 94-134.
- Valentine, J. S., P. A. Doucette, et al. (2005). "Copper-zinc superoxide dismutase and amyotrophic lateral sclerosis." Annu Rev Biochem **74**: 563-593.
- Watanabe, M., M. Dykes-Hoberg, et al. (2001). "Histological evidence of protein aggregation in mutant SOD1 transgenic mice and in amyotrophic lateral sclerosis neural tissues." Neurobiol Dis **8**(6): 933-941.
- Yamakura, F. and K. Suzuki (1980). "Cadmium, chromium, and manganese replacement for iron in iron-superoxide dismutase from *Pseudomonas ovalis*." J Biochem **88**(1): 191-196.

