

TÍTULO: Caracterización estructural y morfológica de protofibras de una enzima glucolítica con actividad neuroprotectora y su implicancia en la enfermedad de Parkinson

OBJETIVOS

Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) es una clásica enzima glucolítica, ubicuamente expresada en las células de todos los organismos vivos, que actualmente es clasificada como “moonlighting protein” ya que es capaz de desempeñar diferentes funciones dependiendo de su estado de oligomerización y de su localización celular [1-3]. En efecto, GAPDH posee localización intracitoplasmática, nuclear y extracelular y fue involucrada en numerosas funciones no relacionadas a la producción de energía celular tales como apoptosis, regulación de la expresión génica, interacción célula-célula y/o célula/matriz extracelular, transcripción del DNA y trastornos neurodegenerativos entre otros [4]. Recientemente, GAPDH ha sido relacionada a la etiopatogenia de diferentes trastornos neurodegenerativos y entre ellos a la enfermedad de Parkinson. Esta patología de importante incidencia poblacional es causada por la muerte de neuronas dopaminérgicas en una región específica del cerebro denominada *sustancia nigra*. Histopatológicamente se caracteriza por la presencia de inclusiones citoplasmáticas denominadas cuerpos de Lewy (LB) formadas por agregados amiloideos de la proteína alfa-sinucleína (AS) aunque también se encontró GAPDH y glicosaminoglicanos. La causa de la muerte de las neuronas dopaminérgicas es discutida, sin embargo, actualmente se acepta que los oligómeros pre-amiloideos de AS serían los principales agentes citotóxicos.

La presencia de agregados fibrilares de GAPDH acompañando a AS en los LB aislados de biopsias de pacientes con la enfermedad de Parkinson llevó a nuestro grupo de trabajo a estudiar la agregación amiloide de esta proteína y su interacción con AS. Usando diferentes técnicas biofísicas, logramos demostrar que GAPDH es capaz de formar agregados amiloides en condiciones fisiológicas de temperatura y pH luego de interaccionar con membranas acídicas o con ciertos glicosaminoglicanos [5-7]. Más aún, pudimos probar que especies pre-amiloideas de GAPDH son capaces de promover la remoción de especies tóxicas de AS, catalizando su conversión en especies fibrilares de menor toxicidad [7]. Nuestra hipótesis de trabajo se basa en que intermediarios pre-amiloideos tempranos de GAPDH poseen características morfológicas y estructurales adecuadas para interaccionar con oligómeros tóxicos de AS y favorecer su polimerización. *En este proyecto nos proponemos identificar y caracterizar oligómeros de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa capaces de interaccionar con especies neurotóxicas de alfa-sinucleína mediante espectroscopías y microscopías avanzadas.* Los resultados que se obtengan podrán

representar una nueva estrategia para futuros desarrollos farmacológicos a partir de una enzima glicolítica clásica.

INTRODUCCION

La enfermedad de Parkinson (EP) es un trastorno neurodegenerativo causado por la muerte de neuronas dopaminérgicas en una región específica del cerebro denominada *sustancia nigra*. Histopatológicamente se caracteriza por la presencia de inclusiones citoplasmáticas denominadas cuerpos de Lewy (LB), formadas por agregados amiloideos de proteínas cuyo principal componente es una proteína denominada alfa-synucleína (AS), en las neuronas sobrevivientes. Agregados fibrilares de tipo amiloideos de GAPDH fueron encontrados acompañando a AS en cuerpos de Lewy aislados de biopsias de pacientes con EP. La causa de la muerte de las neuronas dopaminérgicas es discutida, sin embargo, actualmente se acepta que los oligómeros pre-amiloideos de AS serían los principales agentes citotóxicos. Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) es una clásica enzima glicolítica, ubicuamente expresada en las células de todos los organismos vivos, que actualmente es clasificada como "*moonlighting protein*" ya que es capaz de desempeñar diferentes funciones dependiendo de su estado de oligomerización y de su localización celular [1-3]. En efecto, numerosas evidencias experimentales demostraron que GAPDH está involucrada en una variedad de funciones celulares no relacionadas con la glicólisis [3]. Entre estas funciones podemos citar la activación de la transcripción [8], fusión de membranas [9], oligomerización de microtúbulos [10] y apoptosis [11], y desórdenes neurológicos, entre otras [4]. La relación de GAPDH con enfermedades neurodegenerativas ha sido sugerida recientemente a partir de diferentes evidencias experimentales, ya que: **i)** la enzima co-localiza con el péptido A β en la placa senil de la Enfermedad de Alzheimer [12, 13], con AS en los LB de la enfermedad de Parkinson [11], y con la proteína priónica en la Enfermedad de Creutzfeld-Jacobs [14]; **ii)** La sobre-expresión de AS en células COS-7 no fue capaz de formar estos agregados intra-citoplasmáticos, en cambio, luego de la sobre-expresión conjunta de AS y GAPDH, la formación de inclusiones citoplasmáticas similares a los característicos cuerpos de Lewy (LB) fue evidenciada [15]; **iii)** drogas frecuentemente utilizadas en el tratamiento de la EP como rasagilina, interaccionan y afectan la funcionalidad de GAPDH [16, 17]; **iv)** nuestro grupo de trabajo fue capaz de demostrar que poblaciones heterogéneas de agregados pre-fibrilares de GAPDH disminuyen el *lag* de agregación de AS [7].

METODOLOGÍA

Los experimentos están orientados a identificar y caracterizar oligómeros de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa capaces de interactuar con especies neurotóxicas de alfa-sinucleína. Se propone:

1- *Diseñar* protocolos experimentales que permitan obtener diferentes poblaciones homogéneas de especies oligoméricas pre-fibrilares de GAPDH humana a partir de la interacción de la enzima con glicosaminoglicanos o membranas acídicas.

2- *Estabilizar* las especies formadas mediante entrecruzamiento cruzado (“*cross-linking*”) utilizando diferentes protocolos.

3- *Purificar* poblaciones homogéneas de especies pre-fibrilares de GAPDH capaces de secuestrar especies tóxicas de AS.

4- *Caracterizar y comparar* las especies prefibrilares obtenidas en el apartado anterior mediante microscopía electrónica de transmisión y de barrido en distintas condiciones. Análisis de las distintas muestras mediante microscopía de fuerza atómica y espectroscopía de fuerza (AFM/FS).

5- *Identificar* determinantes morfológicos y/o estructurales de especies pre-fibrilares de GAPDH necesarios para interactuar y neutralizar especies tóxicas de AS.

Expresión y purificación de AS nativa: se llevará a cabo siguiendo el protocolo descrito por Cookson *et al.* [18]. Brevemente, las proteínas se expresarán en *E. coli* (BL21) usando el plásmido pT7-7 que contiene el gen codificante de la proteína. La purificación se realizará mediante: precipitación de otras proteínas por calentamiento, precipitación selectiva con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y cromatografía de intercambio aniónico. La pureza de la proteína se comprobará mediante electroforesis en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE). La solución de AS se preparará en buffer HEPES 20 mM, 150 mM de NaCl, pH 7,4. La muestra se filtrará y centrifugará 30 minutos a 12000 g para remover pequeños agregados preformados. La concentración de AS se determinará usando un coeficiente de extinción molar de $5600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [19].

Expresión y purificación de GAPDH: se transformará *E. coli* Rosetta con el plásmido HsGAPDH-pET14b, que contiene la secuencia completa de GAPDH humana con 6 histidinas en el extremo N-terminal. Este vector fue provisto por el Dr. John Tanner (Department of Chemistry and Biochemistry, University of Missouri-Columbia, USA). Se inducirá con IPTG durante 2 horas. GAPDH humana se purificará por afinidad en columnas de Ni-NTA (Qiagen) del sobrenadante obtenido. El péptido N-terminal conteniendo 6 histidinas será eliminado por incubación con trombina y finalmente se purificará GAPDH con columna de intercambio aniónico MonoQ acoplada a sistema ÄKTA (GE Healthcare Life Sciences).

Preparación de los diferentes GAPDH-oli: los agregados fibrilares y pre-fibrilares se prepararán mediante la incubación a 37°C de una solución de GAPDH en presencia de: **a)** una suspensión de vesículas unilamelares pequeñas de fosfatidilcolina: ácido fosfatídico (PC:PA) (9:1) o **b)** de Heparina. En ambos casos se tomarán alícuotas a diferentes tiempos y se mantendrán a -20°C para su posterior análisis.

Estabilización de los oligómeros formados: se utilizarán fundamentalmente tres protocolos de entrecruzamiento:

a) entrecruzamiento fotoinducido de lisozima y sinucleína hemos logrado obtener oligómeros estables unidos covalentemente por puentes di-tirosinas, lo que permite aislar y purificar los diferentes tipos de oligómeros. El método se basa en la excitación con un LED azul del complejo metálico rutenio(II) trisbipiridina [Ru(bpy)₃²⁺] usando persulfato de amonio (APS) como aceptor de electrones [20]. Las muestras serán analizadas por geles de poliacrilamida en condiciones nativas y desnaturalizantes. Luego se procede a la purificación de la mezcla reaccionante mediante técnicas de cromatografía de exclusión o de intercambio iónico (ver abajo).

b) entrecruzamiento mediante glutaraldehído: el glutaraldehído (GA) es probablemente el compuesto más ampliamente utilizado para inmovilizar proteínas. Este proceso consiste en el bloqueo de los grupos ε-amino de la lisina residual en proteínas, a través de la formación de un enlace imino, conocido como base de Schiff. El aporte del GA como un agente de entrecruzamiento es, en parte, debido a su carácter hidrofóbico e hidrofílico, lo cual le permite penetrar rápidamente tanto en un medio acuoso como en la membrana celular.

c) entrecruzamiento mediante dimetil suberimidato (DMS) o disuccinimidil suberato (DSS): el DMS o DSS se une a grupos aminos primarios de K y al N-terminal. Consiste en hacer reaccionar el agente (en distintas concentraciones) con una solución de la proteína en buffer fosfato. Una solución fresca de DSS en dimetilsulfóxido se adiciona a la muestra de agregados fibrilares, ésta mezcla se incuba durante 1 hora en continua agitación y la reacción se detiene adicionando exceso de Tris. Luego las muestras serán liofilizadas y analizadas mediante SDS-PAGE.

Purificación y caracterización estructural de los agregados formados:

Purificación de los agregados de GAPDH: los oligómeros serán detectados tanto por absorción y/o fluorescencia característica del dímero Tyr (diTyr) como por dispersión de luz. Una vez removida por ultrafiltración la mezcla Ru(bpy)₃²⁺ /APS.

Las especies pre-fibrilares de GAPDH se aislarán mediante:

- Cromatografía de exclusión molecular utilizando una columna Superdex 200 HR 10/300 o por columnas de intercambio iónico MonoQ o MonoS acopladas a un sistema de FPLC. El grado de agregación se verificará en geles de poliacrilamida en condiciones nativas y desnaturalizantes (SDS-PAGE).

- Electroforesis en gradiente seguida de electroelución: luego de la separación electroforética de las proteínas por su peso molecular y carga, éstas deben transferirse desde el gel de electroforesis al buffer de trabajo. Para esto se realiza una electroelución o transferencia electroforética. Este método se basa en la movilidad electroforética de las protofibras desde el gel hasta el buffer e implica poner en contacto directo el gel de poliacrilamida con el buffer entre dos electrodos sumergidos en una solución conductora. Cuando se aplica un campo eléctrico, los agregados pre-fibrilares migran fuera del gel hacia el buffer donde quedarán retenidos.
- Ultrafiltración: la ultrafiltración es un tipo de filtración por membranas mediante la cual los agregados pre-fibrilares serán retenidos en la membrana mientras que el agua y los solutos de bajo peso molecular atraviesan la misma.

b) Caracterización estructural de los oligómeros mediante espectroscopía de infrarrojo: las muestras serán montadas en ventanas de CaF_2 con espaciadores de 100 mm en una celda termostaticada desmontable para muestras líquidas (Harrick Científico, Ossining, Nueva York). Los espectros serán registrados en un espectrofotómetro de infrarrojo Nicolet 5700 equipado con un detector DTGS (Thermo Nicolet, Madison, WI) con purga de aire seco. La substracción de solvente, deconvolución, determinación de la posición de banda y el ajuste de la banda amida I original serán realizados como describe Dobson [21].

c) Caracterización estructural de los oligómeros por microscopías y espectroscopías: el grupo de trabajo tiene experiencia en el uso de microscopías y espectroscopías, las cuales se utilizarán para evaluar las distintas muestras. En primer lugar se prepararán las muestras para microscopía electrónica de transmisión y de barrido. A partir de los resultados se usará AFM/FS (equipado con control de temperatura y sistema de microinyección controlada de soluciones) para caracterizar la morfología y estructura de los distintos oligómeros, así como las propiedades mecánicas de los mismos mediante espectroscopía de fuerza. La evaluación de la interacción de los oligómeros con células vivas se hará utilizando microscopía confocal de fluorescencia multimensional utilizando la expresión de sondas codificadas genéticamente que nos permitirá monitorear la localización molecular, la interacción entre proteínas de interés, y la generación de señales intracelulares en respuesta a la presencia de las especies oligoméricas de GAPDH y la proteína AS. Esta estrategia nos permitirá correlacionar esta información e integrarla con la respuesta de la célula. También emplearemos AFM para seguir en el tiempo los cambios en la morfología y propiedades mecánicas de las células en respuesta a la acción de los oligómeros de GAPDH en presencia y en ausencia de la proteína alfa-sinucleína.

BIBLIOGRAFIA

1. Jeffery, C.J., *Moonlighting proteins--an update*. Mol Biosyst, 2009. **5**(4): p. 345-50.
2. Huberts, D.H. and I.J. van der Klei, *Moonlighting proteins: an intriguing mode of multitasking*. Biochim Biophys Acta. **1803**(4): p. 520-5.
3. Sirover, M.A., *New insights into an old protein: the functional diversity of mammalian glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*. Biochim Biophys Acta, 1999. **1432**(2): p. 159-84.
4. Yamaji, R., et al., *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in the extracellular space inhibits cell spreading*. Biochim Biophys Acta, 2005. **1726**(3): p. 261-71.
5. Cortez, L.M., et al., *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase tetramer dissociation and amyloid fibril formation induced by negatively charged membranes*. FEBS Lett, 2010. **584**(3): p. 625-30.
6. Torres-Bugeau, C.M., et al., *The Key Role of Membranes in Amyloid Formation from a Biophysical Perspective*. Curr Protein Pept Sci, 2011.
7. Torres-Bugeau, C.M., et al., *Characterization of Heparin-induced Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase Early Amyloid-like Oligomers and Their Implication in alpha-Synuclein Aggregation*. J Biol Chem, 2012. **287**(4): p. 2398-409.
8. Zheng, L., R.G. Roeder, and Y. Luo, *S phase activation of the histone H2B promoter by OCA-S, a coactivator complex that contains GAPDH as a key component*. Cell, 2003. **114**(2): p. 255-66.
9. Lopez Vinals, A.E., R.N. Farias, and R.D. Morero, *Characterization of the fusogenic properties of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: fusion of phospholipid vesicles*. Biochem Biophys Res Commun, 1987. **143**(1): p. 403-9.
10. Huitorel, P. and D. Pantaloni, *Bundling of microtubules by glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and its modulation by ATP*. Eur J Biochem, 1985. **150**(2): p. 265-9.
11. Tatton, N.A., *Increased caspase 3 and Bax immunoreactivity accompany nuclear GAPDH translocation and neuronal apoptosis in Parkinson's disease*. Exp Neurol, 2000. **166**(1): p. 29-43.
12. Sunaga, K., et al., *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is over-expressed during apoptotic death of neuronal cultures and is recognized by a monoclonal antibody against amyloid plaques from Alzheimer's brain*. Neurosci Lett, 1995. **200**(2): p. 133-6.
13. Tamaoka, A., et al., *Antibodies to amyloid beta protein (A beta) crossreact with glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)*. Neurobiol Aging, 1996. **17**(3): p. 405-14.

14. Giorgi, A., et al., *Proteomic profiling of PrP27-30-enriched preparations extracted from the brain of hamsters with experimental scrapie*. *Proteomics*, 2009. **9**(15): p. 3802-14.
15. Tsuchiya, K., et al., *Pro-apoptotic protein glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase promotes the formation of Lewy body-like inclusions*. *Eur J Neurosci*, 2005. **21**(2): p. 317-26.
16. Kragten, E., et al., *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, the putative target of the antiapoptotic compounds CGP 3466 and R-(-)-deprenyl*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(10): p. 5821-8.
17. Maruyama, W., et al., *Transfection-enforced Bcl-2 overexpression and an anti-Parkinson drug, rasagiline, prevent nuclear accumulation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase induced by an endogenous dopaminergic neurotoxin, N-methyl(R)salsolinol*. *J Neurochem*, 2001. **78**(4): p. 727-35.
18. Hoyer, W., et al., *Dependence of alpha-synuclein aggregate morphology on solution conditions*. *J Mol Biol*, 2002. **322**(2): p. 383-93.
19. Weinreb, P.H., et al., *NACP, a protein implicated in Alzheimer's disease and learning, is natively unfolded*. *Biochemistry*, 1996. **35**(43): p. 13709-15.
20. Fancy, D.A. and T. Kodadek, *Chemistry for the analysis of protein-protein interactions: rapid and efficient cross-linking triggered by long wavelength light*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(11): p. 6020-4.
21. Arrondo, J.L., et al., *Structure and thermal denaturation of crystalline and noncrystalline cytochrome oxidase as studied by infrared spectroscopy*. *Biochemistry*, 1994. **33**(38): p. 11650-5.