

Carrera de Bioquímica
Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia-UNS

Práctica de Investigación Bioquímica (optativa)

Código de la Materia: 1085
Carga horaria: 50 horas

Profesor-Investigador: Silvia Susana Antolini
Asistente/Ayudante de docencia: Daniel Alejandro Peñalva

Asignatura (s) Obligatoria (s) Aprobada /Cursada(s): Bioanalítica II (Cursada), Química Biológica I (Aprobada)

Lugar de Trabajo (Laboratorio /Instituto): Laboratorio de modulación colinérgica. Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Bahía Blanca

Título del Proyecto de Investigación Acreditado: Señalización colinérgica y dinámica de membranas: condiciones fisiológicas y fisiopatológicas. Diseño de moduladores colinérgicos

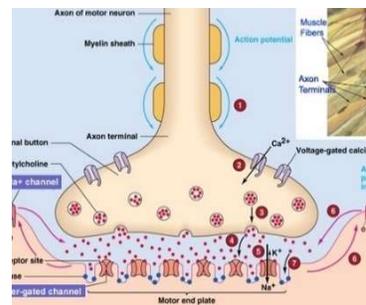
Código Proyecto: 24/B346

Resumen del Proyecto (no mayor de 250 palabras)

La señalización colinérgica es esencial en diversos procesos fisiológicos, incluyendo funciones cognitivas, motoras, neuroendocrinas, parasimpáticas y sensoriales. Este proceso depende del neurotransmisor acetilcolina, el receptor de acetilcolina (nAChR) y la enzima acetilcolinesterasa (AChE). En patologías como la enfermedad de Alzheimer (EA), la pérdida de señalización colinérgica en el sistema nervioso central es un factor clave. Los tratamientos actuales de la EA buscan mejorar la potenciación colinérgica. La membrana biológica, con una distribución asimétrica de lípidos, desempeña un papel crucial y experimenta cambios composicionales tanto en condiciones fisiológicas como patológicas. En la EA, los péptidos beta amiloides (A β) extracelulares forman placas seniles, y las especies oligoméricas y monoméricas solubles de A β son las principales causantes de la disfunción sináptica. La interacción entre el péptido A β y los lípidos de membrana es un área de investigación activa. Los lípidos son fundamentales en la agregación y partición del péptido A β en la membrana, en la conformación y función del nAChR, y en la interacción entre ambos. La presencia y distribución de colesterol son especialmente relevantes. Por lo tanto, es crucial profundizar en el mecanismo de agregación de los péptidos A β solubles, el papel de los lípidos de membrana, las consecuencias a nivel de membrana y el impacto sobre la señal colinérgica. Comprender estos aspectos es esencial para avanzar en el desarrollo de estrategias farmacológicas que modifiquen estos procesos, mejorando la señal colinérgica y reduciendo la oligomerización del péptido A β y el daño a nivel de membrana. Estos objetivos constituyen el foco principal del presente proyecto.

Plan de trabajo (resumido)

El plan de trabajo se centra en avanzar en la comprensión de las bases moleculares de la modulación de los receptores de acetilcolina nicotínicos (nAChR) a nivel transmembrana y en el impacto de perturbaciones en la composición y organización de la membrana en situaciones fisiopatológicas, específicamente en la enfermedad de Alzheimer (EA). La señalización colinérgica, crucial para diversos procesos fisiológicos, depende del neurotransmisor acetilcolina, nAChR y la enzima acetilcolinesterasa (AChE). En la EA, la pérdida de señalización colinérgica en el sistema nervioso central es un factor clave, y los tratamientos actuales buscan mejorar esta señalización. El nAChR, una proteína transmembrana perteneciente a la superfamilia de canales iónicos activados por ligando, requiere un entorno lipídico apropiado para su buen funcionamiento. Se investigará cómo la membrana, con sus lípidos particulares y asimetrías, influye en el acoplamiento/desacoplamiento entre los dominios de unión de agonista y el poro del canal del nAChR y en su localización en dominios lipídicos específicos. Además, se estudiarán las condiciones de la membrana que



simulen las perturbaciones descritas en la EA, como los cambios en la composición lipídica y la pérdida de asimetrías.

En la EA, los péptidos beta amiloides (A β) extracelulares forman placas seniles, y las especies oligoméricas y monoméricas solubles de A β son las principales causantes de la disfunción sináptica. La interacción entre el péptido A β y los lípidos de membrana es un área de investigación activa, ya que los lípidos son fundamentales en la agregación y partición del péptido A β en la membrana y en la función del nAChR. Profundizar en estos mecanismos y en el papel del colesterol es crucial para desarrollar estrategias farmacológicas que mejoren la señalización colinérgica y reduzcan la oligomerización del péptido A β y el daño a nivel de membrana.

Objetivos propuestos durante el desarrollo de esta asignatura

Objetivo General:

En esta asignatura se propone evaluar en primera instancia la agregación del péptido A β mediada por la AChE y el impacto que esto tiene sobre el estado conformacional del nAChR y en segunda instancia la potencial mitigación de los efectos observados mediante el agregado de moléculas específicas potenciadoras de la señal colinérgica actuando a más de un nivel (multitarget drugs). Particularmente nos focalizaremos en los ácidos grasos poliinsaturados omega-3 como el EPA y el DHA en su forma no esterificada.

Objetivos específicos:

1. a. Evaluar la agregación del péptido A β en ausencia y presencia de AChE, para determinar el nivel de potenciación mediada por dicha enzima.
1. b. Evaluar los efectos de los ácidos grasos omega-3 sobre la agregación del péptido A β mediada por AChE.
1. c. Evaluar la actividad de la AChE en cada una de las condiciones estudiadas en los ítems 1.a y 1.b.
2. a. Estudiar la interacción y el efecto de los oligómeros del péptido A β sobre el nAChR recurriendo a estudios del estado conformacional del nAChR por espectroscopía de fluorescencia.
2. b. Dilucidar la potencial mitigación o reversión del efecto de los oligómeros del péptido A β sobre el nAChR por la presencia de ácidos grasos omega-3.

Descripción de las Actividades a realizar:

1. Obtención de ácidos grasos:

Los ácidos grasos poliinsaturados omega-3 (EPA y DHA no esterificados) serán aislados y purificados mediante cromatografía (TLC, HPLC) a partir de suplementos nutracéuticos y cuantificados por GC.

2. Péptido A β :

Se utilizará el péptido 1-40 A β (Sigma-Aldrich) disuelto en DMSO y almacenado a -20 °C. La oligomerización/fibrilación se inducirá agregándolo al sistema de estudio a una concentración 2 μ M e incubando a 37 °C con agitación controlada, hasta las 72 horas.

3. Inhibición de la AChE:

Se realizará la medición de la actividad de AChE empleando el método de Ellman, empleando AChE y acetiltiocolina como sustrato. La absorbancia se medirá a 405 nm, calculando la actividad enzimática a partir de la pendiente de la línea obtenida y expresándola como porcentaje respecto a un control. Se calculará el valor de IC50 de los compuestos en presencia y ausencia del péptido A β .

4. Efectos sobre la agregación del péptido A β :

Se realizarán estudios de dot blot y tioflavina T.

Dot blot: Se sembrarán alícuotas de las muestras a distintos tiempos de incubación en membranas de nitrocelulosa y se tratará con anticuerpos específicos para oligómeros y fibrillas (A11 y OC).

Tioflavina T: Luego del agregado de la sonda tioflavina T a las muestras, se medirá la intensidad de fluorescencia a 490 nm.

5. Estado conformacional del nAChR:

Se analizará el cambio conformacional del nAChR en presencia y ausencia del péptido A β , solo o con carbamilcolina, usando el colorante fluorescente CrV en membranas ricas en AChR de *T. californica*. Se realizarán estudios de titulación con CrV y se obtendrán curvas de concentración para calcular la KD en diferentes condiciones experimentales.

La preparación de membranas ricas en AChR se realizará a partir de órganos eléctricos de *T. californica*, se homogeneizará el tejido en frío, se realizarán centrifugaciones diferenciales para obtener membranas crudas, y

se utilizarán gradientes de sacarosa para purificarlas. Las membranas serán caracterizadas mediante dosajes de proteínas, ensayos de unión con α -bungarotoxina radiactiva y geles de poliacrilamida.

Cuatrimestre: Segundo

Cupo de alumnos: 2

Carga horaria semanal: 1 día por semana

Modalidad de Evaluación:

- Entrega de un informe con formato de trabajo científico
- Exposición Oral: *Se realizará en presencia de todos los alumnos de la materia y los profesores respectivos y al menos un integrante de la CCB (hasta 15 minutos)*