

FACTORES GENÉTICOS INVOLUCRADOS EN EL DETERIORO COGNITIVO DE LOS PACIENTES DE ALZHEIMER

González Palma, Laura Marina (1), Royo, José Luis(1,*)

(1)Departamento de Especialidades Quirúrgicas, Bioquímicas e Inmunología. Facultad de Medicina. Dirección Bulevar Louis Pasteur, 32, 29010 Málaga.

La enfermedad de Alzheimer es una importante enfermedad neurodegenerativa que afecta a la memoria y que cursa con deterioro cognitivo [1]. Las acumulaciones extracelulares de β -amiloide (A β) e intracelulares de Tau hiperfosforilada generan un estado de neuroinflamación [2], en el que interviene la microglía. Esta fagocita el A β para su eliminación [3] mediante la interacción entre dos proteínas transmembrana: TREM2 (reconoce A β como ligando), y DAP12 (transduce la señal intracelularmente) [4]. También se ha involucrado a SIRPB1 con este proceso al interactuar transmembranalmente con DAP12 [5]. Se ha caracterizado una variante genética dentro de la pauta abierta de lectura de SIRPB1, una inserción de 30,1 kb que altera la estructura del gen y sus isoformas de maduración [6]. El papel de esta variante en la fagocitosis de la microglía y su posible contribución a la etiología molecular de la enfermedad de Alzheimer está aún por determinar.

Objetivo. Poner a punto un sistema para analizar la interacción transmembrana de DAP12 con dos isoformas de SIRPB1 (201 y 213) y con TREM2 en un sistema bacteriano.

- 1 Las secuencias transmembrana de DAP12, TREM2 y de las isoformas de SIRPB1 han sido clonadas (Figura 1) en vectores proporcionados por el kit del sistema BATCH de doble híbrido en bacteria.
- 2 Se ha transformado *E. coli* con la pareja de plásmidos para estudiar interacción, y se ha sembrado en LB X-gal.
- 3 La intensidad de color se ha semicuantificado con el software ImageJ, y la estadística se ha llevado a cabo con IBM SPSS.

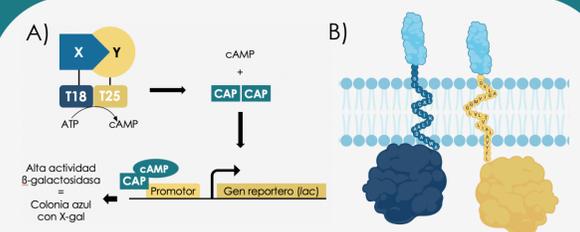


Figura 1. A) La interacción entre los dominios transmembrana implica producción de cAMP y promueve la expresión de un gen reportero que dará color azul al medio. B) Interacción de proteínas transmembrana fusión. Izquierda, péptido señal Pf3 unido a la región transmembrana de TREM2 y al dominio T18 de la adenilato ciclasa. Derecha, Pf3 unido a la región transmembrana de DAP12 y al dominio T25.

RESULTADOS

Con esta metodología se observan distintas intensidades de color azul en los pares de proteínas estudiados, en comparación con los controles positivo (dominios ZIP de interacción) y negativo (no favorece la interacción) (Figura 2) del kit BATCH. La intensidad de color correlaciona con la interacción. El azul es más intenso en la interacción TREM2-DAP12 en comparación al control negativo. Las interacciones SIRPB1-DAP12 parecen ser menos potentes, pero ligeramente apreciables; no se han obtenido datos concluyentes.

El análisis estadístico de los datos obtenidos con ImageJ (Figura 3) confirma diferencias significativas entre la interacción TREM2-DAP12 (p -valor $<0,01$) y el control negativo. Se aprecia una ligera interacción de ambas isoformas SIRPB1 con DAP12 (no significativo). No hay diferencias significativas entre SIRPB1.201-DAP12 y SIRPB1.213-DAP12.

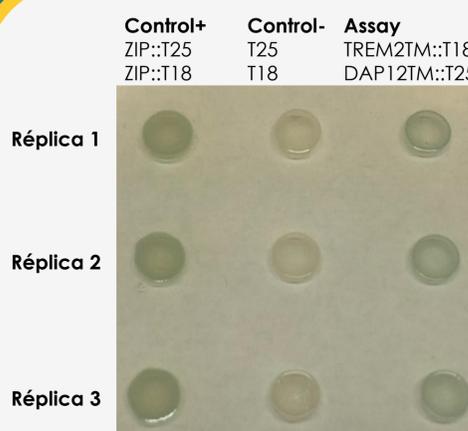


Figura 2. Placa LB (ampicilina, kanamicina, X-gal) sobre la que se ha depositado 10 μ L de cultivo saturado de distintas muestras. De izquierda a derecha: control positivo (dimerización), control negativo (interacción casual), ensayo (interacción entre dominios transmembrana TREM2-DAP12). La presencia azul demuestra interacción proteica.

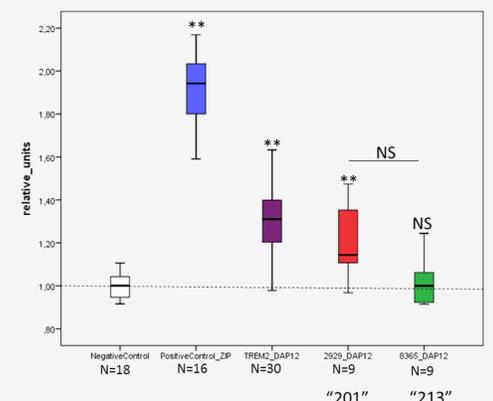


Figura 3. Intensidad de color azul en unidades relativas obtenida con ImageJ de las distintas muestras estudiadas en placa. La intensidad representa la capacidad de interacción entre el par de proteínas estudiado. Asterisco: grupos que presentan diferencias significativas (p -valor $<0,01$) con respecto al control negativo.

DISCUSIÓN

Se ha desarrollado con éxito un sistema que confirma la interacción entre dominios transmembrana de proteínas humanas en bacteria. Permite la cuantificación de la intensidad de la unión tanto por análisis de color azul como por actividad enzimática. Los resultados prueban la interacción TREM2-DAP12 [4], pero no parecen demostrar una interacción potente entre las isoformas de SIRPB1 y DAP12. Aunque los resultados no son concluyentes, se intuye una interacción mucho menor con respecto a TREM2, además de una afinidad ligeramente diferencial de ambas isoformas por DAP12.

Nuestra técnica permite observar la interacción transmembrana solo con la presencia de color azul, usando como modelo las bacterias.

- [1] Kua, E. H. et al. (2014) 'The natural history of dementia', *Psychogeriatrics*, 14(3), pp. 196–201. doi: 10.1111/psyg.12053.
- [2] Blennow, K., Leon, M. J. De and Zetterberg, H. (2006) 'Alzheimer's disease.', 368, pp. 387–403. doi: 10.1016/S0140-6736(06)69113-7.
- [3] Salter, M. W. and Stevens, B. (2017) 'Microglia emerge as central players in brain disease', *Nature Medicine*. Nature Publishing Group, 23(9), pp. 1018–1027. doi: 10.1038/nm.4397.
- [4] Konishi, H. and Kiyama, H. (2018) 'Microglial TREM2 / DAP12 Signaling : A Double-Edged Sword in Neural Diseases', 12(August), pp. 1–14. doi: 10.3389/fncel.2018.00206.
- [5] Tomasello, E. et al. (2000) 'Association of signal-regulatory proteins β with KARAP/DAP-12', *European Journal of Immunology*, 30(8), pp. 2147–2156. doi: 10.1002/1521-4141(2000)30:8<2147::AID-IMMU2147>3.0.CO;2-1.
- [6] Royo, J. L. et al. (2018) 'A common copy-number variant within SIRPB1 correlates with human out-of-Africa migration after genetic drift correction', *PLoS ONE*, 13(3), pp. 1–16. doi: 10.1371/journal.pone.0193614.