

Bioinformatics characterization of mutations in the protein presenilin-1, presenilin-2 and Amyloid protein precursor in relation with familiar Alzheimer disease

Caracterización bioinformática de mutaciones en las proteínas presenilina-1, presenilina-2 y proteína precursora de amiloide en relación con enfermedad de Alzheimer familiar

Soto-Ospina Alejandro ^{a,b}✉ | Cataño-Sánchez Elías ^{a,b} | de Jesús-Bedoya Gabriel ^b
Araque-Marín Pedronel^c | Villegas-Lanau Andrés ^{a,b}

a. Universidad de Antioquia. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Grupo de Neurociencias de Antioquia. Medellín, Colombia.

b. Universidad de Antioquia. Instituto de Biología, Genética Molecular (GenMol). Medellín, Colombia.

c. Universidad EIA. Escuela Ciencias de la Vida. Grupo de Investigación e Innovación en Formulaciones Químicas. Envigado, Colombia.

Correspondence

Alejandro Soto-Ospina. Universidad de Antioquia, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Grupo de Genética Molecular (GenMol), Calle 62 No. 52-59 Laboratorio 430, Medellín - Antioquia, Colombia.

✉ pfalejandro.soto@gmail.com

Abstract

Introduction: Alzheimer's disease is manifested as neuronal death due to damage to the nervous tissue and whose neuropathological hallmarks are protein deposits such as amyloid plaques and neurofibrillary tangles. **Objective:** To relate the clinical reported for Familiar Alzheimer's disease and the changes of 10 selected mutations in the susceptible regions, to understand the effect on the protein structure from the bioinformatics characterization. **Methodology:** The information was compiled from the Alzforum, Pubmed, Uniprot and Embl databases. The mutation susceptibility analysis is done with the Rostlab SNAP2 software and the post-translational modifications are made with the Swiss-ExPASy tool. **Results:** A frequency table oriented to clinical cases associated with missense mutations that cause Alzheimer's disease was established and the frequency of amino acid changes was found and compared with the composition of amino acids present for P_{S1}, with a percentage of 12% for Leu, in P_{S2} with Leu at 12.9% and for the carboxy terminal fragment of 99 amino acids of APP with a value of 13.1% for Val. **Discussion and conclusion:** The amino acids produces changes based on their chemical characteristics, the nonpolar amino acids were more frequent and it is due to the high proportion of protein structure located in the neuronal membrane. The susceptibility analysis complements the effect of the change for the 20 amino acids in the protein structure, guided by the polarity changes.

Key words: Familiar Alzheimer's disease, mutations, bioinformatics, presenilin-1, presenilin-2, amyloid precursor protein.

Resumen

Introducción: La enfermedad de Alzheimer se manifiesta como la muerte neuronal debido al daño en el tejido nervioso y cuyo marcador neuropatológico, son los depósitos de proteína como placas amiloide y ovillos neurofibrilares. **Objetivo:** Relacionar la clínica reportada para la enfermedad de Alzheimer Familiar y los cambios de 10 mutaciones seleccionadas en las regiones susceptibles, para entender el efecto en la estructura proteica, a partir de la caracterización bioinformática. **Metodología:** Se recopila la información reportada de las bases de datos Alzforum, Pubmed, Uniprot y Embl, el análisis de susceptibilidad a la mutación se hace con el software SNAP2 de Rostlab y las modificaciones postraduccionales se hacen con la herramienta Swiss-ExPASy. **Resultados:** Se establece una tabla de frecuencias orientada a los casos clínicos asociados a las mutaciones missenses que producen enfermedad de Alzheimer y se encontró la frecuencia de cambios de aminoácido y se comparó con la composición de aminoácidos presentes para P_{S1}, con un porcentaje de 12% para Leu, en P_{S2} con Leu en 12.9% y para el fragmento carboxi terminal de APP de 99 aminoácidos con un valor de 13.1% para Val. **Discusión y conclusión:** Los aminoácidos que producen el cambio a partir de sus características químicas, fueron más frecuentes los no polares y se estima que se da por la proporción tan alta de estructura proteica localizada en la membrana neuronal. Con el análisis de susceptibilidad se complementa el efecto del cambio para los 20 aminoácidos en la estructura de la proteína, orientada por los cambios de polaridad.

Palabras claves: Enfermedad de Alzheimer Familiar, mutaciones, bioinformática, presenilina-1, presenilina-2, proteína precursora de amiloide.



Introducción

En las dos últimas décadas, se ha avanzado significativamente en la comprensión y reconocimiento de los procesos y mecanismos moleculares que desencadenan el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer (EA) como en su diagnóstico clínico¹, no obstante, aún falta mucho por investigar sobre la misma. En primera instancia, la EA se ha reconocido en el campo de la neurociencia y a nivel clínico como un trastorno neurodegenerativo progresivo que conduce a la pérdida de memoria (amnesia) y de las funciones cognitivas (afasia, apraxia y agnosia)² y, a su vez, la forma más común de deterioro cognitivo severo³. En segundo lugar, la agregación extracelular de polipéptidos β amiloide (placas seniles) e intracelular de la proteína tau hiperfosforilada (ovillos neurofibrilares) se tienen como principales marcadores de la enfermedad⁴. De igual forma, otra característica de la EA es la severa gliosis (proliferación y activación de la microglía y de los astrocitos) en la corteza cerebral y en el hipocampo, las cuales son las regiones más afectadas en el encefalo⁵.

La EA se divide, en dos tipos: enfermedad de Alzheimer Esporádico (EAE) y enfermedad de Alzheimer familiar (EAF), los cuales son dependientes de los antecedentes, condiciones ambientales y factores de riesgo³. La EAE está asociado con factores de riesgo conocidos para otras enfermedades, por ejemplo, niveles altos de colesterol en sangre (dislipidemia), estrés oxidativo, inflamación, baja actividad cognitiva y ausencia de actividad física⁶⁻⁸. La dieta también tiene un riesgo de aparición de la enfermedad, ya que altas concentraciones de iones Zn y Cu sin metabolizar^{9,10}, promueven en el cerebro la aparición de enfermedades neurodegenerativas, al igual que golpes o traumas en las estructuras del encéfalo y factores de riesgo genético como altas o bajas interacciones de proteínas como apolipoproteína APOE cuya modificación en el alelo 4 del locus (APOE ϵ 4) favorece la precipitación de los oligómeros de amiloide^{3,6,11}. En cambio, la enfermedad en las formas familiares es causada por mutaciones missenses en el gen APP, en el gen Presenilina-1 (PSEN-1) o en el gen Presenilina-2 (PSEN-2)⁶ ubicados en los cromosomas 21, 14 y 1 respectivamente. Las mutaciones de la proteína presenilina-1 (PS1) representan ~80% de los casos de inicio temprano de la EAF¹³; además, dichas mutaciones se caracterizan por una producción acelerada de péptidos β amiloide (A β), con un inicio de la enfermedad antes de los 60 años y una penetrancia genética casi completa¹⁴. Igualmente, se ha identificado que las mutaciones presentes en la proteína presenilina-2 (PS2) y en la proteína precursora de amiloide (APP) que contribuyen al inicio temprano de la EAF^{3, 15-17}; por

lo que las mutaciones en alguno de los genes mencionados que luego traducen a mutaciones en las proteínas, modifican el procesamiento del sustrato APP con aumento en la relación molar de polipéptidos A β 42 respecto a A β 40^{18, 19}.

La EA se le asocia un mecanismo patogénico a nivel molecular que considera la funcionalidad de enzimas proteasas, la teoría amiloidogénica establece que la EA es el resultado de la acumulación de A β , un fragmento de la proteína APP como producto de su procesamiento, sigue dos vías, las cuales comprenden una vía no amiloidogénica y una vía amiloidogénica^{6, 20, 21}. En la vía no amiloidogénica, la enzima α -secretasa escinde APP en el fragmento soluble extracelular, seguida de la escisión por γ -secretasa transmembrana, que es un complejo multiproteico que cuenta con su sitio activo la proteína PS1 o PS2, según sea la proteína ensamblada y se caracteriza porque produce un pequeño péptido de 23 aminoácidos (péptido p3) y un fragmento intracelular conocido como el dominio intracelular de APP (AICD)^{22, 23}. Por otro lado, en la vía amiloidogénica, APP se escinde primero por la enzima β -secretasa en el fragmento soluble y luego por la γ -secretasa, produciendo péptidos A β de diversa longitud desde (1-38 a 1-43 aminoácidos)²⁴⁻²⁶. La estructura del péptido A β facilita su oligomerización, lo que resulta en la acumulación de placas amiloide en el parénquima cerebral, como resultado puede observarse los dos marcadores de la enfermedad por proteínas depositadas²⁷. Las mutaciones reportadas en las bases de datos se encuentran localizadas en las proteínas presenilinas como sitio activo y producen diversos patrones de corte dependiendo de la localización de la mutación²⁸⁻³⁰.

Con base en lo anterior, dirigimos nuestra mirada desde lo bioinformático, a los datos reportados hasta la fecha, referente a las mutaciones missenses en los genes causales de la EAF, que al traducir a proteína presentan mutaciones que pueden afectar las características químicas y estructurales de las proteínas PS1, PS2 y APP, con el fin de realizar análisis y caracterizaciones desde un enfoque molecular y clínico.

Material y método

Análisis de datos clínicos reportados para las proteínas PS1, PS2 y APP

Se usa la base de datos Alzforum para seleccionar las mutaciones reportadas para la proteína PS1 de 467 aminoácidos, PS2 de 448 aminoácidos y APP de isoforma 695, con los cambios missenses reportados, se construye una tabla de frecuencias para agrupar las mutaciones dependientes del aminoácido a cambiar y su clínica asociada.

Las proteínas PS1, PS2 y APP en su totalidad también son analizadas en su secuencia primaria y desde sus aminoácidos se clasifican en porcentaje para entender su composición, considerando su naturaleza química brindada por las características polares cargadas, no polares y neutras²⁸⁻³⁰.

Susceptibilidad mutacional de los genes PSEN-1, PSEN-2 y APP

El análisis de susceptibilidad se hace con la herramienta SNAP2 de Rostlab, como clasificador de cambios debidos a las sustituciones entre los 20 aminoácidos, los cuales componen la totalidad de las proteínas PS1, PS2 y APP en representación ClustalX, a partir de un algoritmo de entrenamiento de redes neuronales con máquinas de aprendizaje, considerando alineamientos con proteínas PS1, PS2 y APP de otras especies, para clasificar los cambios y realizar las mediciones, generando un archivo de salida en mapa de calor (*Heatmap*), que representa los respectivos efectos en la estructura: en rojo oscuro (fuertes) con una puntuación >50, en blanco (débiles) puntuación entre -50 y 50, en azul (neutrales) con una puntuación inferior a -50 y negro corresponde a los residuos de la wild type. Enfocados en la función canónica de las proteínas, se seleccionaron 10 mutaciones en la región más variable y en la cual sus cambios están correlacionados con resultados experimentales reportados en la literatura, respecto a la cantidad total de péptido amiloide producido o con los aminoácidos implicados en la función catalítica³¹⁻³⁵.

Análisis bioinformático de las modificaciones postraduccionales en las proteínas

En la realización del análisis preliminar, se seleccionaron 10 mutaciones en las regiones del sitio activo de PS1 y PS2 y en los sitios de corte para el sustrato APP, a través de una caracterización bioinformática, las cuales fueron sometidas a un análisis de predicción de fosforilación (*NetPhos 3.1*) con 17 kinasas características del soma; igualmente, se hizo un análisis de predicción de sitios de N-Glicosilación (*NetGly1.0*), y la cuantificación de pases transmembranales a partir de los modelos ocultos Markov (*TMHMM 2.0*) y su localización dentro de la membrana^{11, 12}.

Pases transmembranales con los modelos ocultos de Markov

Este software permite hacer una idea ilustrativa de la ubicación de las proteínas PS1, PS2 y APP en las membranas lipídicas; el cálculo se hizo con TMHMM2.0 suite de swiss-ExpASY, donde se entrega la localización de los aminoácidos intra-extra celular con un valor estocástico para la formación de cada pase transmembrana³⁶.

Predicción de fosforilación y activación de vías bioquímicas

Esta herramienta permite calcular por probabilidad, la facilidad con la que 17 de las kinasas más importantes dentro del ser humano, pueden fosforilar a la proteína evaluada, esta fosforilación permite comparar la proteína nativa con la proteína mutada, generando un gráfico con la probabilidad para cada una de las 17 kinasas^{37, 38}.

Predicción de N-Glicosilaciones

Mediante esta herramienta bioinformática, es posible calcular la disponibilidad de sitios de N-enlace en los residuos de la proteína evaluada; esto se hace posible, ya que el software utiliza un sistema de redes neuronales artificiales que examinan en el contexto de la secuencia los tramos Asn-Xaa-Ser/Thr (donde Xaa es cualquier aminoácido excepto de Prolina)¹⁴, arrojando valores de potencial asociados al residuo de asparagina en dichas regiones.

Visualizador y alineamiento tridimensional

La visualización estructural de los modelos tridimensionales, se hizo con el software Chimera U.C.S.F v 1.1.1, el cual tiene la capacidad de reconocer los archivos en formato pdb que contienen el esqueleto topológico a nivel proteico. Para cada uno de los sistemas proteicos a nivel tridimensional, se señalan los puntos de mutación para las estructuras mostrando las regiones implicadas en la funcionalidad proteasa¹⁵⁻¹⁷.

Resultados

Caracterización con base de datos

La proteína PS1 es una subunidad perteneciente al complejo enzimático γ -secretasa, en la cual cumple una función proteasa por los aminoácidos ácido aspártico Asp257 y Asp385; esto hace que sea considerada un corte aspartil proteasa. Esta proteína tiene 7 isoformas de las cuales la isoforma con una longitud de 467 aminoácidos es la funcional y que en mayor proporción se expresa en encéfalo. Su localización en tejidos considera una distribución en encéfalo y en intestino, a nivel celular se considera una alta distribución en membrana nuclear, retículo endoplasmático rugoso y mitocondria.

La proteína PS2 es una subunidad perteneciente al complejo enzimático γ -secretasa, en la cual cumple una función proteasa por los aminoácidos ácido aspártico Asp263 y Asp366; esto hace que sea considerada una proteína con función canónica aspartil proteasa, la proteína PS2 tiene 3 isoformas, pero la que en mayor proporción se expresa en encéfalo es la isoforma con una longitud de 448 aminoácidos.

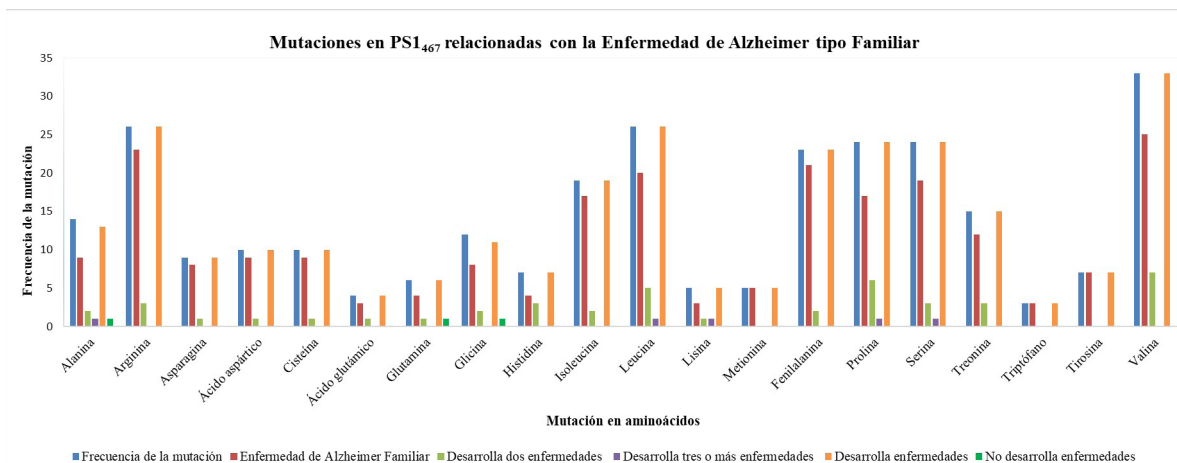
En tejidos su localización se centra en mayor proporción en encéfalo, intestino, hígado y músculos, a nivel celular se encuentra distribuida en membrana nuclear, retículo endoplasmático rugoso, aparato de Golgi y en menor proporción en mitocondria.

La proteína APP es el sustrato de la enzima γ -secretasa y se procesa generando el marcador de la enfermedad. Esta proteína tiene 11 isoformas, pero la funcional a nivel encefálico es la 695. En el metabolismo patogénico, la enzima β -secretasa tiene un sitio activo en BACE1, que cuenta con un sitio activo aspartil-proteasa que se encarga de cortar APP en el fragmento soluble β (β sAPP), dejando un fragmento C terminal de 99 aminoácidos (C99) en la membrana neuronal. Posteriormente, la enzima γ -secretasa con su sitio activo aspartil proteasa, realiza los cortes sucesivos en rutas de corte épsilon en los aminoácidos LV (49 aminoácido) o TL (48 aminoácido) para el sustrato APP CTF99, dependiendo de ese corte inicial se hace una ruta de procesamiento que consiste en los cortes sucesivos de 49-46-43 hasta el corte γ en el aminoácido 40 y los cortes sucesivos cuando la ruta es 48-45 hasta el corte γ en el aminoácido 42 o 38 dependiendo de la difusión del sustrato para liberar el péptido β -amiloide y el fragmento AICD que puede ser translocado a núcleo para la funcionalidad celular. En tejidos se encuentra localizado en sistema nervioso central, pulmones, hígado y músculos, a nivel celular se encuentra en núcleo, endosoma y membrana plasmática. Ahora, considerando la caracterización de cada uno de las proteínas implicadas en los mecanismos patogénicos, se muestran los resultados desde un enfoque clínico.

Análisis de mutaciones en PSEN-1, PSEN-2 y APP₆₉₅ relacionadas con la enfermedad de Alzheimer tipo familiar

Las mutaciones autosómicas en los genes que codifican para

PSEN-1, PSEN-2 y APP₆₉₅ producen cambios en la secuenciación de aminoácidos durante el proceso de traducción ribosomal para las anteriores proteínas, es decir, un aminoácido en cierta posición es sustituido por otro (mutaciones no sinónimas). Se han reportado hasta la fecha en total 308 mutaciones en presenilina-1, 59 en presenilina-2 y 58 en la proteína precursora de amiloide (APP) de isoforma con 695 aminoácidos, relacionadas con la enfermedad de Alzheimer tipo familiar³⁰. Se ha abordado un análisis de las mutaciones missenses en proteínas, tanto en las dos subunidades de γ -secretasa como en el sustrato APP₆₉₅, encontrando en PS1₄₆₇ 282 mutaciones no sinónimas, 52 mutaciones no sinónimas en PS2₄₄₈ y 54 mutaciones no sinónimas en APP₆₉₅. Además, se evidencia la contribución de algunas mutaciones en PS1, PS2 y APP no solo con el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer tipo familiar sino con la manifestación de otros trastornos como la paraparesia espástica, demencia frontotemporal, entre otras. El análisis de los datos, respecto a la proteína PS1₄₆₇, exhibe una mayor frecuencia de la mutación que lleva a los aminoácidos valina, arginina, leucina, prolina, fenilalanina, serina, isoleucina, treonina y alanina; siendo la mutación a valina la más frecuente **Figura1A**. Se puede resaltar igualmente, la presencia de mutaciones que abarcan todo el conjunto de los aminoácidos esenciales, la mayoría de las mutaciones manifiestan el desarrollo de algún tipo de enfermedad neurodegenerativa, algunas mutaciones a valina, prolina y leucina conllevan frecuentemente a la presencia de dos enfermedades con respecto a las demás, y son pocas las mutaciones que desencadenan a tres o más enfermedades incluida la de Alzheimer tipo familiar. Teniendo en cuenta los datos anteriores, se complementa la información con un análisis de la composición aminoacídica, para entender en la secuencia primaria como



se encuentran distribuidas las características molecular y química, según la naturaleza de cada aminoácido en la secuencia primaria como se muestra en la **Figura 1B**. La proteína PS1 una vez es traducida, tiene en su composición de ensamble en secuencia primaria, una cantidad importante de residuos, los cuales fueron cuantificados, a partir de la presencia de estos en la estructura proteica como se muestra en el diagrama de sectores, consecuentemente los valores porcentuales asociados a estos aminoácidos se reportaron en la **Tabla 1**.

Como se observa en la tabla anterior, la totalidad de los aminoácidos se clasificaron desde sus características químicas, donde los aminoácidos no polares se encuentran estructurados con 8 aminoácidos; además, son los aminoácidos que

Figura 1B. Diagrama de sectores en la proteína PS1₄₆₇

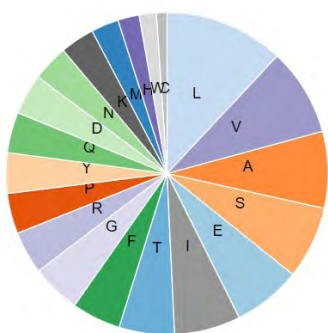


Figura 1. Mutaciones no sinónimas en presenilina-1 (subunidad de la enzima γ -secretasa) relacionadas con la enfermedad de Alzheimer tipo familiar: **A)** Frecuencia de la mutación (azul), mutaciones que desarrollan la enfermedad de Alzheimer (violeta), mutaciones que desarrollan dos enfermedades neurodegenerativas (verde oliva), mutaciones que desarrollan tres o más enfermedades neurodegenerativas (púrpura), mutaciones que conllevan al desarrollo de enfermedades neurodegenerativas (naranja) y mutaciones que no conllevan al desarrollo de enfermedades (verde); **B)** Diagrama de sectores en la proteína PS1₄₆₇.

Tabla 1. Distribución y composición porcentual de aminoácidos en la proteína PS1

Aminoácidos	Composición %	Aminoácidos	Composición %	Aminoácidos	Composición %
Polares cargados		Polares neutros		No polares	
Glu (E)	6.8	Cys (C)	1.1	Ala (A)	7.7
Asp(D)	4.1	Gly (G)	4.9	Phe (F)	4.9
His (H)	2.1	Asn (N)	3.6	Ile (I)	6.6
Lys (K)	3.4	Gln (Q)	4.1	Leu (L)	12.0
Arg (R)	4.3	Ser (S)	7.3	Met (M)	2.8
Tyr (Y)	4.1	Thr (T)	5.6	Pro (P)	4.1
				Val (V)	8.8
				Trp (W)	1.7

presentan el valor mayor en composición total con un 48.6%, teniendo en su secuencia primaria aminoácidos importantes donde la enzima γ -secretasa realiza el corte sobre el sustrato, con valores porcentuales para Leu de 12.0%, Val de 8.8% y Ala de 7.7%. Subsecuentemente, los aminoácidos polares neutros tienen un valor porcentual de 26.6% en composición total y ubicados 6 aminoácidos, en donde la Ser con un 7.3% es el aminoácido con mayor porcentaje. Continuando para los aminoácidos polares cargados se tiene que un 24.8% corresponde al total de aminoácidos restantes con características ácidas y básicas y en gran proporción se encuentran localizados en las regiones flexibles ubicadas en el citosol. Luego de analizar esta información en composición porcentual respecto a la proteína y las diversas manifestaciones clínicas implicadas por las mutaciones missense, se analiza teniendo en cuenta un algoritmo que cuantifica los cambios notables en la estructura proteica, a partir de los cambios producidos con variantes, teniendo en cuenta en la muestra los 20 aminoácidos mencionados con anterioridad, para cada una de las posiciones en los 467 aminoácidos de esa isoforma, como se muestra en la **Figura 2**.

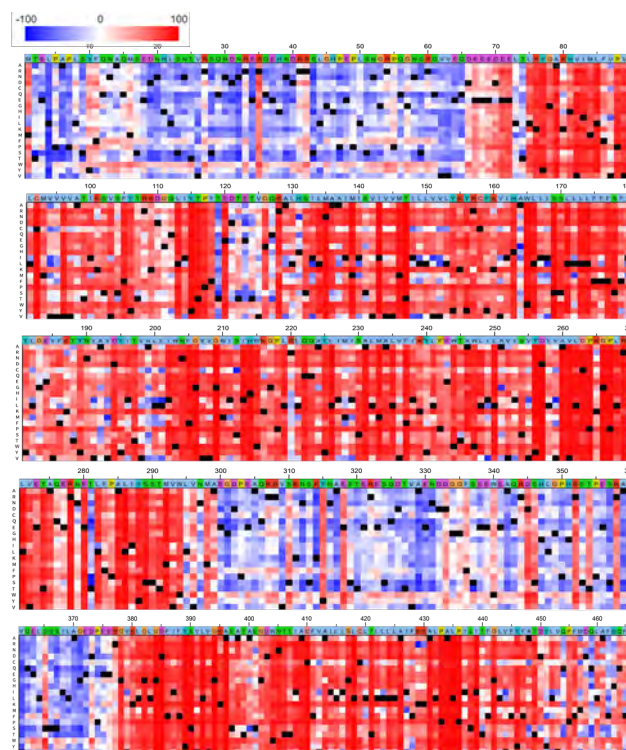


Figura 2. Diagrama de calor de susceptibilidad de las variantes asociadas a PS1₄₆₇ en la escala de -100 a 100 representa los efectos en la estructura: en rojo oscuro (fuertes) con una puntuación >50, en blanco (débil) puntuación entre -50 y 50, en azul (neutrales) con una puntuación inferior a -50 y negro correspondiente a los residuos de la wild type.

En este diagrama de calor existen muchas regiones muy susceptibles a sufrir mutaciones y estas se presentan sin importar el aminoácido y su naturaleza química dentro de su cadena lateral, por lo que se logran identificar regiones transmembranas (TMD), incluso la región implicada en el sitio catalítico, para TMD 6 y TMD 7 en Asp257 y Asp385 respectivamente, en donde se puede observar que esta región es ampliamente variable y presenta efectos muy representativos de mutaciones en esas regiones con color rojo, siendo esto un argumento importante en la selección de las mutaciones, para el análisis bioinformático.

En el análisis clínico de las mutaciones reportadas para PS2, el efecto funcional de mutaciones reportadas en la literatura y a nivel experimental, se hace teniendo en cuenta el global de mutaciones missenses suministradas en la base de datos Alzforum para la proteína PS2 hasta el momento, en

el cual se considera un total de 52 mutaciones por cambio de un aminoácido **Figura 3A**, en donde cabe resaltar, en primer lugar, una mayor frecuencia de mutación de este gen hacia valina y metionina, ambas con valores de 7 mutaciones respectivamente; sin embargo, las mutaciones a metionina contribuyen en su totalidad al desarrollo de la EAF. En segundo lugar, el aminoácido leucina también presenta alta frecuencia y contribuye en gran medida con el anterior. Por último, se aprecia que no hay mutaciones a los aminoácidos ácido glutámico y glutamina. Al comparar los resultados de la proteína PS1 con PS2, se observa que la mutación al aminoácido valina presenta mayor frecuencia en ambas proteínas. Las mutaciones también fueron caracterizadas a partir de su naturaleza química y la frecuencia de cada aminoácido en constitución, calculando los porcentajes de composición dentro de su secuencia primaria como se presenta en la **Figura 3B**.

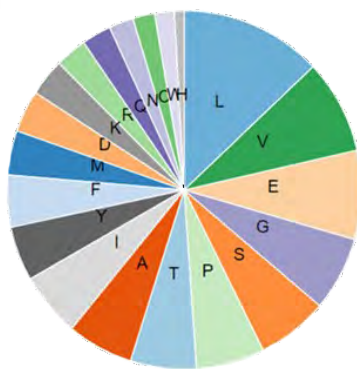
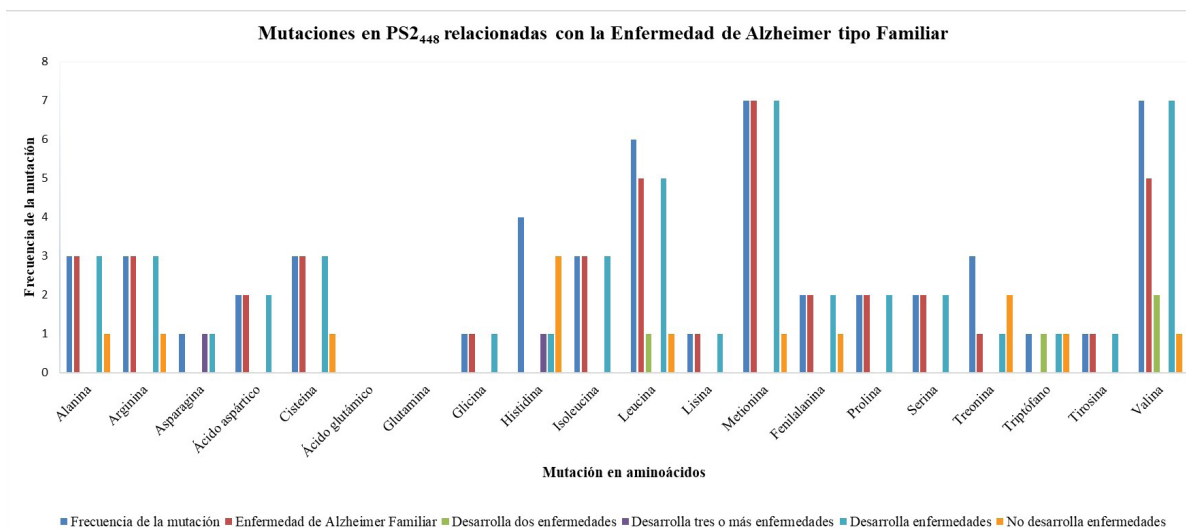


Figura 3B

Figura 3. Mutaciones no sinónimas en PS2₄₄₈ (subunidad de la enzima γ -secretasa) relacionadas con la enfermedad de Alzheimer tipo familiar: **A)** Frecuencia de la mutación (azul), mutaciones que desarrollan la enfermedad de Alzheimer (vinotinto), mutaciones que desarrollan dos enfermedades neurodegenerativas (naranja), mutaciones que desarrollan tres o más enfermedades (púrpura), mutaciones que conllevan al desarrollo de enfermedades neurodegenerativas (aguamarina) y mutaciones que no conllevan al desarrollo de enfermedades (morado); **B)** Diagrama de sectores en la proteína PS2₄₄₈.

Una vez se hace el cálculo en la proteína PS2 , se encuentra que en gran proporción los aminoácidos de naturaleza no polar predominan en la estructura, siendo leucina y valina los más frecuentes dentro de su secuencia primaria, esta información será ilustrada en la Tabla 2.

Tabla 2. Distribución y composición porcentual de aminoácidos en la proteína PS2 .

Aminoácidos	Composición %	Aminoácidos	Composición %	Aminoácidos	Composición %
Polares cargados		Polares neutros		No polares	
Glu (E)	8.0	Cys (C)	2.0	Ala (A)	6.0
Asp(D)	3.8	Gly (G)	6.7	Phe (F)	4.7
His (H)	0.9	Asn (N)	2.2	Ile (I)	5.8
Lys (K)	3.4	Gln (Q)	2.7	Leu (L)	12.9
Arg (R)	2.9	Ser (S)	6.5	Met (M)	4.0
Tyr (Y)	4.9	Thr (T)	6.0	Pro (P)	6.2
				Val (V)	8.5
				Trp (W)	1.8

Teniendo en cuenta los valores porcentuales de composición en la proteína PS2 , ésta también exhibe una mayor frecuencia en los aminoácidos no polares como Leu con 12.9% y Val con 8.5%, los cuales mantienen los pases transmembranales, pero reducen el número de aminoácidos en la región flexible o hotspot entre la TMD 6 y TMD 7, la región no polar equivale en la totalidad según su naturaleza química a un 49.9% en su totalidad en la proteína; los residuos polares neutros son los segundos en frecuencia y tienen un porcentaje de 26.1% y los polares cargados equivalen a un 23.9%, en donde el aminoácido ácido glutámico tiene un porcentaje de composición del 8.0%, los cuales son fragmentos estructurales que en localización hacen parte de las interacciones y de las regiones polares a nivel citoplasmático o de membrana. Considerando estos resultados y la información consignada en la base de datos con sus manifestaciones clínicas, se procede a caracterizar cada segmento de aminoácido que contribuye en la proteína PS2 , para entender el efecto de las variantes en los cambios de la proteína, dado a partir del software SNAP2 . Consecuentemente, se obtienen las regiones susceptibles a generar cambios a nivel estructural y que pueden favorecer la aparición de patologías a nivel neurodegenerativo y somático, los gráficos en diagramas de calor se presentan en la Figura 4.

Como se puede apreciar en el diagrama de calor del análisis de variantes para la proteína PS2 a lo largo del total de aminoácidos que componen su estructura, la región en las vecindades del sitio activo para la TMD 6 y TMD 7 en

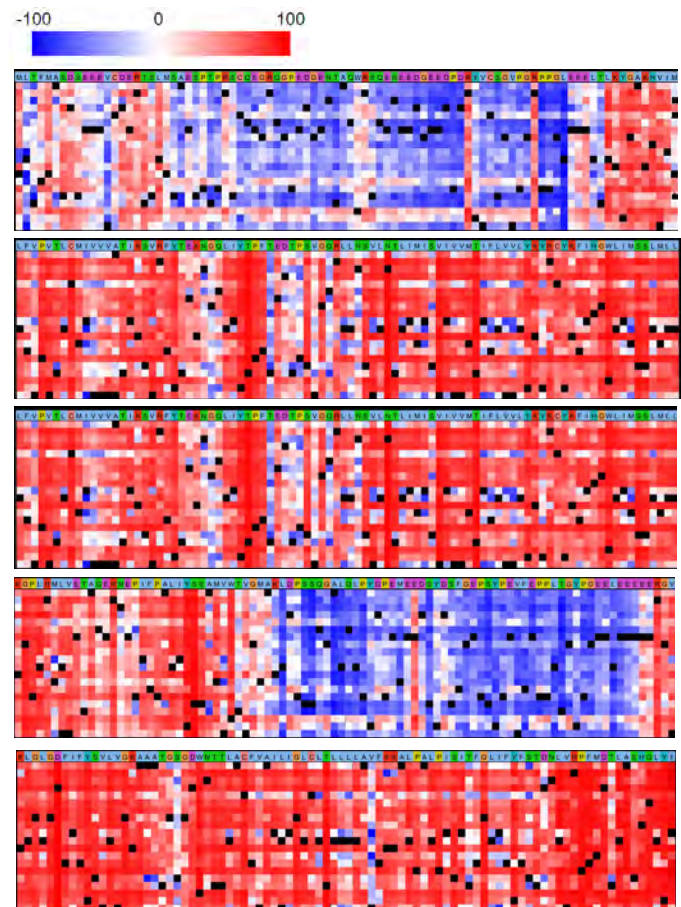


Figura 4. Diagrama de calor de susceptibilidad de las variantes asociadas a PS2_{448} en la escala de -100 a 100 que representa los efectos en la estructura: en rojo oscuro (fuertes) con una puntuación >50 , en blanco (débiles) puntuación entre -50 y 50, en azul (neutrales) con una puntuación inferior a -50 y negro correspondiente a los residuos de la wild type.

las posiciones Asp263 y Asp366, donde está ubicado el sitio catalítico, tiene gran variabilidad y afecta enormemente la estructura de la proteína, asimismo, la región TMD 5 con la posición Met239, TMD 3 con la posición Met178 y TMD 2 con los aminoácidos Met152 y Met145, estos están en la entrada del bolsillo y afectan la estructura de la proteína, al sufrir una variante en esa posición en particular. Por otra parte, en la isoforma APP_{695} , las mutaciones más frecuentes y que contribuyen al desarrollo de la EAF son la Asparagina, Metionina y Glicina, como se presentan en la Figura 5A.

De igual forma, no se han reportado mutaciones a los aminoácidos cisteína, ácido glutámico y tirosina, además las mutaciones hasta el momento que generan cambios para ácido aspártico y serina, no favorecen la aparición de la enfermedad de Alzheimer familiar. Por otro lado, se observa

que las mutaciones a metionina son frecuentes tanto en PS2₄₄₈ como en APP₆₉₅. En relación a lo anterior, se complementa la información con un análisis de la composición aminoacídica para el péptido amiloide de 99 aminoácidos en su carboxi-terminal (APP₉₉), ya que éste es el que se encuentra

implicado en la generación de polipéptidos A β ; ello con el propósito de comprender como se encuentran distribuidas las características moleculares y químicas de los residuos en la secuencia primaria como se muestra en la Figura 5B. Se procede con la cuantificación en composición

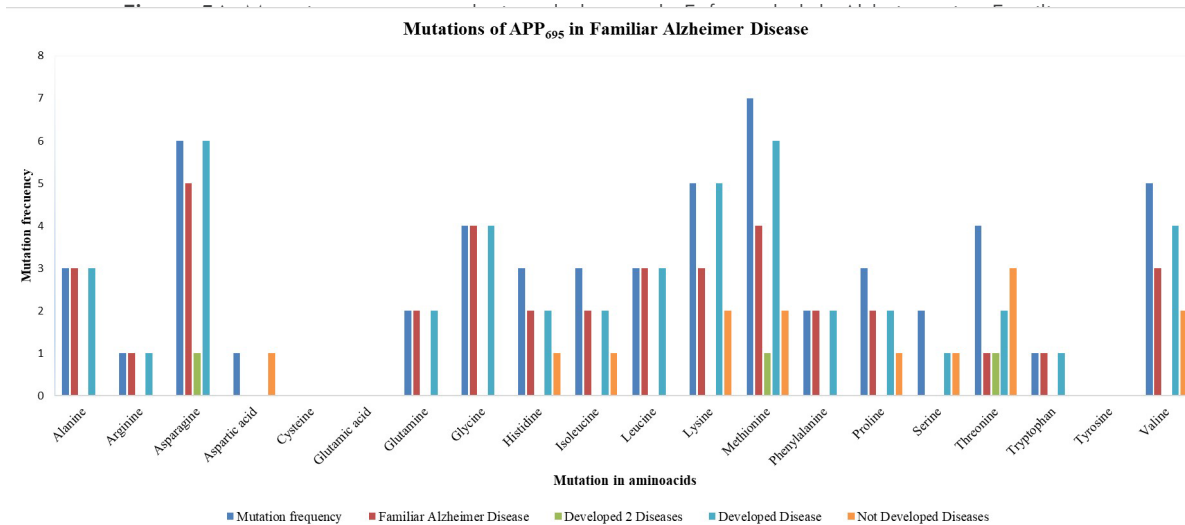


Figura 5B



Figura 5. Mutaciones no sinónimas en la Proteína Precursora de Amiloide (sustrato de la enzima γ -secretasa) relacionadas con la enfermedad de Alzheimer tipo familiar: A) Frecuencia de la mutación (azul), mutaciones que desarrollan la enfermedad de Alzheimer (vinotinto), mutaciones que desarrollan dos enfermedades neurodegenerativas (verde oliva), mutaciones que conllevan al desarrollo de enfermedades neurodegenerativas (aguamarina) y mutaciones que no conllevan al desarrollo de enfermedades neurodegenerativas (naranja); B) Diagrama de sectores para el péptido APP₉₉

porcentual de los aminoácidos en la secuencia primaria de APP₉₉ y los resultados se presentan en la Tabla 3. Según los datos tabulados, se aprecia que en la columna de aminoácidos no polares el residuo de Val presenta mayor frecuencia con 13.1 %, del cual un 6.0 % se encuentra en la región de transmembrana e igualmente, se tiene que hay ausencia del aminoácido Trp en APP₉₉ y que el porcentaje correspondiente a los mismos en el sustrato es de un 41.5 %. En cuanto a los residuos polares cargados, éstos representan una composición porcentual total de 31.3%, donde el aminoácido Glu es el más recurrente con 8.1%; además, cabe notar que ninguno de estos residuos se

Tabla 3. Distribución y composición porcentual de aminoácidos en el péptido APP-CTF99

Aminoácidos	Composición %	Aminoácidos	Composición %	Aminoácidos	Composición %
Polares cargados		Polares neutros		No polares	
Glu (E)	8.1	Cys (C)	-	Ala (A)	6.1
Asp(D)	4.0	Gly (G)	8.1	Phe (F)	5.1
His (H)	6.1	Asn (N)	4.0	Ile (I)	6.1
Lys (K)	7.1	Gln (Q)	6.1	Leu (L)	5.1
Arg (R)	2.0	Ser (S)	4.0	Met (M)	4.0
Tyr (Y)	4.0	Thr (T)	5.1	Pro (P)	2.0
				Val (V)	13.1
				Trp (W)	-

encuentra en la región transmembranal. Por último, los aminoácidos polares neutros poseen una composición porcentual total de 27.3%, siendo el residuo de Gly el de mayor frecuencia con 8.1%, del cual un 3.0% se encuentra en transmembrana; además se observa la ausencia de residuo

Cys en el sustrato de 99 aminoácidos. De igual forma, se procede con un análisis de APP₉₉ similar al realizado para las proteínas PS1₄₆₇ y PS2₄₄₈ en las que se resaltan las regiones susceptibles a mutaciones, las cuales conllevan a cambios estructurales en el sustrato como se presenta en la Figura 6.

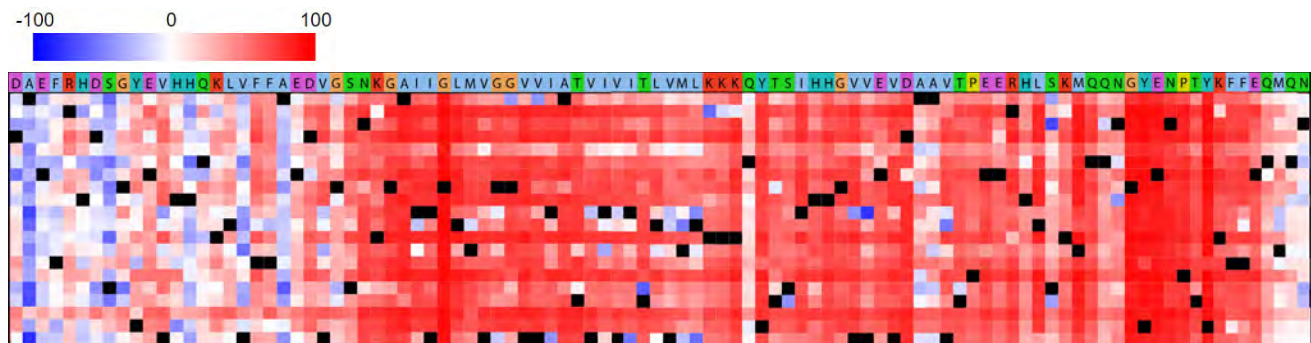


Figura 6. Diagrama en mapa de calor de susceptibilidad de las variantes asociadas a APP₉₉, en la escala de -100 a 100, la cual representa los efectos en la estructura: en rojo oscuro (fuertes) con una puntuación >50, en blanco (débiles) puntuación entre -50 y 50, en azul (neutrales) con una puntuación inferior a -50 y negro correspondiente a los residuos de la wild type

En el diagrama de mapa de calor, se aprecian las regiones más susceptibles a mutaciones en el fragmento carboxilo terminal de 99 aminoácidos, las cuales se presentan con mayor frecuencia en residuos de la región transmembranal (desde el aminoácido en la posición 30 hasta el aminoácido en la posición 52) y en el fragmento que se encuentra en el citosol y transloca al núcleo (AICD). En la región de transmembrana donde ocurre el procesamiento del sustrato APP₉₉ por γ -secretasa, se observa que esta región es ampliamente variable y presenta efectos muy representativos de mutaciones (color rojo). A partir de ello, es que se procede con la posterior selección de mutaciones para la caracterización bioinformática.

Caracterización bioinformática de las mutaciones en PS1, PS2 y APP

Se realiza el cálculo a nivel bioinformático para diez mutaciones establecidas en las regiones implicadas en el metabolismo patogénico, como un acercamiento preliminar al entendimiento del sistema enzimático. Las mutaciones seleccionadas en PS1 fueron T245P, A246E, Y256S, V261F, C263R, G378R, L381V, G384A, F386S y V391F que son mutaciones pertenecientes a las transmembranas implicadas en el bolsillo catalítico. Para PS2 que tiene menos mutaciones reportadas, se analizan no solo las transmembranas implicadas en el bolsillo catalíticos con TMD 6 y TMD 7, sino también algunas mutaciones en las TMD 2, TMD 3 y TMD 5 que están orientadas en la

entrada del bolsillo catalítico y en la estructuralidad de la proteína. Para APP se seleccionan las mutaciones ubicadas en el CTF99, como se muestra en la Tabla 4.

La Tabla 4 queda consignada la caracterización bioinformática para cada una de las proteínas y algunas mutaciones reportadas experimentalmente relacionadas con las diferentes cantidades de péptido A β 40 y A β 42 producido experimentalmente y reportado en la literatura a partir del estudio enzimático.

Discusión y conclusiones

Por consiguiente, observamos para la proteína PS1 la disponibilidad de 42 sitios de fosforilación, los cuales pueden alterarse al presentarse cambios estructurales debido a posibles mutaciones en algunos genes que son expresados mediante procesos de transcripción y traducción. Según lo mencionado, se aprecia en las diez mutaciones evaluadas que las mutaciones A246E, Y256S y V261F mostraron desactivación de la vía PKA, debido a que se modifica el arreglo estructural en la región, con posterior pérdida de disponibilidad de la S-254 en el complejo γ -secretasa dinámico; mientras que la mutación F386S favorece la conformación estructural para que la fosforilación de la posición S-390 active la vía adicional de PKC, para un total de 43 sitios. Las demás mutaciones presentaron patrones de fosforilación normales.

Tabla 4. Caracterización bioinformática de las proteínas PS1, PS2 y APP-CTF99; siendo ND: No se encontraron datos reportados en la literatura

Proteína	Sitios de fosforilación	Sitios de N-glicosilación	HMM transmembrana (Localización)	Cantidad experimental total de péptido Aβ40	Cantidad experimental total de péptido Aβ42
PS1-Wild type	42 sitios de fosforilación	279 NETL 0.6114 405 NTTI 0.5734	9 pases transmembranales (82-100, 132-154, 161-183, 193-215, 224-241, 246-268, 281-298, 404-426, 431-453)	1.000	1.000
T245P	No hubo cambios con WT	No hubo cambios con WT	No hubo cambios con WT	0.001	0.016
A246E	No activa vía PKA de la wild type, porque no posee la S-254	No hubo cambios con WT	Pérdida de TMD 7 Cambios en TMD 1 (83-105), TMD 3 (164-183), TMD 4 (191-213), TMD 5 (223-240) y TMD 6 (247-264)	0.010	0.071
Y256S	No activa vía PKA de la wild type, porque no posee la S-254	No hubo cambios con WT	Pérdida de TMD 6 y TMD 7 Cambios en TMD 5 (228-250)	0.031	0.291
V261F	No activa vía PKA de la wild type, porque no posee la S-254	No hubo cambios con WT	No hubo cambios respecto a la WT	0.024	0.135
C263R	No hubo cambios con WT	No hubo cambios con WT	Pérdida de TMD 7 Cambios en TMD 6 (245-262) y TMD 8 (408-427)	0.111	0.349
G378E	No hubo cambios con WT	279 NETL 0.6116 Sin cambios de potencial en 405	No hubo cambios respecto a la WT	0.412	1.662
L381V	No hubo cambios con WT	No hubo cambios con WT	No hubo cambios respecto a la WT	0.878	2.384
G384A	No hubo cambios con WT	279 NETL 0.6116 Sin cambios de potencial en 405	No hubo cambios respecto a la WT	0.011	1.870
F386S	Se activa extra la vía PKC en S-390	279 NETL 0.6116 Sin cambios de potencial en 405	No hubo cambios respecto a la WT	0.075	0.619
V391F	No hubo cambios con WT	No hubo cambios con WT	No hubo cambios respecto a la WT	0.448	0.986
PS2-Wild type	63 sitios de fosforilación	386 NTTL 0.6210	9 pases transmembranales (88-106, 138-160, 167-189, 204-223, 230-247, 252-274, 287-304, 385-407, 412-434)	1.000	1.000
R62H	No hubo cambios con WT	No hubo cambios con WT	No hubo cambios con WT	1.010	0.930
T122P	No activa vía cdk5 de la wild type, porque no posee la T-122	No hubo cambios con WT	No hubo cambios con WT	0.360	2.920
S130L	No activa vía cdk5, unsp y PKC de la wild type, porque no posee la T-122 y S-130. Aumento en la disponibilidad en T-128 vía p38MAPK y disminución en T-128 vía unsp, S-138 vía PKA, S-138 vía cdc2	No hubo cambios con WT	No hubo cambios con WT	0.860	1.220
N141I	Hay cambios respecto a la WT, aumento en la disponibilidad en S-138 vía cdc2 y disminución en S-138 vía PKA, T-142 vía PKC, S-147 vía PKA	No hubo cambios con WT	No hubo cambios con WT	0.180	3.740
V148I	No activa vía cdc2 de la Wild type, porque no posee la T-142 Aumento en la disponibilidad en S-147 vía PKA	No hubo cambios con WT	No hubo cambios con WT	0.990	1.580
M239V	No hubo cambios con WT	No hubo cambios con WT	No hubo cambios con WT	0.310	3.300
M239I	No hubo cambios con WT	No hubo cambios con WT	No hubo cambios con WT	0.440	3.140
A252T	No hubo cambios con WT	No hubo cambios con WT	No hubo cambios con WT	ND	ND
A377V	Hay cambios respecto a la WT, disminución en la disponibilidad en S-371 vía cdc2 y en S-382 vía PKC	386 NTTL 0.6179	No hubo cambios con WT	ND	ND
D439A	Hay cambios respecto a la WT, aumento en la disponibilidad en T-440 vía PKC	No hubo cambios con WT	Pérdida de TMD 7 Cambios en TMD 8 (387-409) y TMD 9 (413-430)	0.760	0.850

Proteína	Sitios de fosforilación	Sitios de N-glicosilación	HMM transmembrana (Localización)	Cantidad experimental total de péptido Aβ40	Cantidad experimental total de péptido Aβ42
APP-CTF99 Wild type	18 sitios de fosforilación	No posee sitios de N-glicosilación	1 pase transmembranal (626-648)	1.000	1.000
G38S	Se activa extra la vía cdc2 en S-38	No hubo cambios con WT	No hubo cambios respecto a la WT	ND	ND
A42T	Se activa extra la vía cdc2 en T-42	No hubo cambios con WT	No hubo cambios respecto a la WT	ND	ND
T43I	No activa vía PKA de la wild type, porque no posee la T-43	No hubo cambios con WT	No hubo cambios respecto a la WT	0.200	1.540
V44A	No hubo cambios con WT	No hubo cambios con WT	No hubo cambios respecto a la WT	0.550	1.630
V44M	No hubo cambios con WT	No hubo cambios con WT	No hubo cambios respecto a la WT	0.300	1.125
I45M	No hubo cambios con WT	No hubo cambios con WT	No hubo cambios respecto a la WT	ND	ND
I45V	No hubo cambios con WT	No hubo cambios con WT	No hubo cambios respecto a la WT	1.021	1.667
V46F	No hubo cambios con WT	No hubo cambios con WT	No hubo cambios respecto a la WT	ND	ND
V46G	No hubo cambios con WT	No hubo cambios con WT	No hubo cambios respecto a la WT	ND	ND
T48P	No hubo cambios con WT	No hubo cambios con WT	No hubo cambios respecto a la WT	0.372	0.163

Respecto a la N-glicosilación, las posiciones 279 y 405 son regiones susceptibles a glicosilarse por carbohidratos en esa región polar con probabilidades de 0.6114 y 0.5734 respectivamente. Las mutaciones G378E, G384A y F386S, aumentan ligeramente la probabilidad de glicosilación a valores de 0.6116 en 279, el resto de mutaciones se glicosilan igual que la wild type. Además, del cálculo de las transmembranas con *Hidden Markov Models*, se logra determinar que $\psi 1$ tiene 9 pases transmembranales, en las posiciones definidas como: (82-100; 132-154; 161-183; 193-215; 224-241; 246-268; 281-298; 404-426; 431-453). La mutación A246E afecta el TMD 7 y modifica la orientación de las estructuras secundarias α -hélices (83-105, 164-183; 191-213; 223-240, 247-264). Igualmente, la mutación C263R afecta el TMD 7 y causa desplazamientos de los TMD 6 y TMD 8. En cuanto a la mutación Y256S, se aprecia la pérdida de los TMD 6 y 7, y el cambio en la localización del plegamiento de α -hélice (228-250). El resto de mutaciones no presentan cambios respecto al modelo oculto de markov de la proteína wild type. Por otro lado, se tiene que las mutaciones que aportan mayor cantidad total de péptido A β 42 referente a la WT son: G378E, L381V, G384A con diferencias de 0.662, 1.384 y 0.870. Asimismo, se tiene para $\psi 2$ la posibilidad de 63 sitios de fosforilación que pueden verse afectados por algunas mutaciones en la proteína; para el caso de las mutaciones abordadas, se aprecian diversos cambios que van desde la pérdida de uno o tres sitios como ocurre con las mutaciones T122P y V148I, las cuales inactivan las vías cdk5 y cdc2 en su respectivo orden, debido a la ausencia de T-122 y T-142, por lo que disponen finalmente de 62 sitios de fosforilación, y la mutación S130L que inactiva en la proteína tres vías enzimáticas cdk5, quinasa inespecífica (unsp) y PKC, ya que se pierden los residuos T-122 (primera vía) y S-130 (dos últimas vías), por lo que

se hacen probables 60 de sus sitios; hasta el aumento o disminución de la disponibilidad de los mismos, como ocurre con las mutaciones S130L, N141I, V148I y D439A, las cuales aumentan la probabilidad de ser fosforiladas por las kinasas p38MAPK, cdc2, PKA y PKC en los residuos T-128, S-138, S-147, T-440, y las mutaciones S130L, N141I y A377V, las cuales disminuyen la probabilidad de fosforilación de los sitios: T-128 vía unsp, S-138 vía PKA y cdc2 (S130L), S-138 vía PKA, T-142 vía PKC y S-147 vía PKA (N141I), S-371 vía cdc2 y en S-382 vía PKC (A377V); en cuanto a las otras mutaciones, se observa que no hubo cambios respecto a la proteína objetivo.

Siguiendo el análisis para la proteína, reportamos un único sitio de N-glicosilación que se encuentra en la secuencia de aminoácidos en la posición 386 con un potencial de 0.6210 e igualmente, observamos una disminución del mismo cuando se presenta la mutación A377V, que puede relacionarse con el cambio conformacional y modificación del ambiente químico. A su vez, se datan 9 pasos transmembranales, de las que se parten para evaluar posibles cambios en los TMDs ligados a las mutaciones que exhibe la proteína; es así como se aprecia que la mutación D439A afecta el TMD 7 y desplaza los TMDs 8 y 9. Además, se evidencia que las mutaciones que aportan mayores cantidades totales de péptido A β 42 respecto a la wild type son: T122P, S130L, N141I, V148I, M239V, M239I con diferencias de 1.920, 0.220, 2.740, 0.580, 2.300 y 2.140. Desde nuestro estado del arte, no encontramos reportes que informaran desde lo experimental el aporte de las mutaciones A252T y A377V a las cantidades totales de péptidos A β 40 y A β 42.

Por último, examinamos el péptido de 99 aminoácidos, el cual presenta un pase transmembranal (626-648),

18 sitios de fosforilación y ningún sitio de N-glicosilación. Referente a los sitios de fosforilación, observamos que las mutaciones G38S y A42T incorporan en la proteína residuos con grupos hidroxilo y cambios conformacionales en la α -hélice que posibilitan la activación de las vías cdc2 en S-38 y cdc2 en T-42 respectivamente, por lo que se obtienen con las anteriores mutaciones un nuevo sitio para un total 19 sitios disponibles. En cuanto a la mutación T43I, vemos que hay una pérdida del residuo de treonina, lo que conlleva a la inactivación de la vía PKA, cambios conformacionales y de ambiente químico en el péptido APP₉₉; por consiguiente, el anterior solo disponible 17 regiones que probablemente pueden ser fosforiladas. Ya para las otras mutaciones, no se observan cambios ni en los sitios de fosforilación y N-glicosilación ni en los pasos transmembranales. Ahora, para la cantidad experimental total de péptido A β 40, se aprecia un leve incremento del mismo al darse la mutación I45V con una diferencia respecto a la WT de 0.021; de igual forma, se tienen incrementos de la cantidad experimental total de péptido A β 42, relacionadas con las mutaciones T43I, V44A, V44M y I45V con diferencias de 0.540, 0.630, 0.125 y 0.667 respectivamente. Cabe notar que, desde nuestro estado del arte, no encontramos reportes asociados a las cantidades experimentales totales de péptidos A β 40 y A β 42 para las mutaciones G38S, A42T, I45M, V46F y V46G.

Visualización y alineamiento tridimensional

Las proteínas PS1₄₆₇, PS2₄₄₈ y el péptido APP₉₉ presentan, a nivel estructural, motivos alpha-loop-alpha y plegamientos en α -hélices como se observa en los modelos de cintas con silueta negra en la Figura 7. De igual manera, se señalan en color rojo las diez regiones donde ocurren las mutaciones evaluadas, con el fin de visualizarlas e identificarlas en las estructuras proteicas y permitirle al lector dimensionar los análisis realizados en la caracterización bioinformática para las mismas.

Las mutaciones missense en alguno de los genes de PSEN-1, PSEN-2 y APP ubicados en los cromosomas 21, 14 y 1, que luego traducen a cambios de aminoácidos en las proteínas PS1₄₆₇, PS2₄₄₈ y APP₉₉, son las promotoras y causantes de la EAF. Las 282 mutaciones no sinónimas en PS1₄₆₇, 52 mutaciones no sinónimas en PS2₄₄₈ y 54 mutaciones no sinónimas en APP₉₉ reportadas hasta la fecha, nos llevan a constatar la gran susceptibilidad que presentan dichos genes a mutar, especialmente el gen de PS1, y que la expresión génica de dichas mutaciones desencadenan cambios en la traducción de las proteínas, al igual que en su maduración, es decir, en los procesos post-traduccionales que se dan en el retículo endoplasmático y en el aparato de Golgi, los cuales confieren

a la proteína su organización y estructuración tridimensional. Igualmente, se hace notoria la mayor frecuencia de las mutaciones al aminoácido valina en PS1₄₆₇ y al aminoácido metionina en PS2₄₄₈ y APP₆₉₅, lo cual nos lleva a inferir que dichas mutaciones confieren a las proteínas un aumento en la composición porcentual total de aminoácidos no polares, por consiguiente, un aumento en la hidrofobicidad en las mismas.

Por otro lado, de los diagramas de calor y los pasos transmembranales enunciados en la Tabla 4 para cada una de las proteínas wild type, concluimos que las regiones transmembranales exhiben gran susceptibilidad a presentar mutaciones, exceptuando un poco al fragmento APP-CTF99, debido a que también presenta una alta susceptibilidad a mutaciones en la región citosólica, ya que solo tiene un solo pase transmembranal y una porción soluble extracelular. Asimismo, de los diagramas en mapa de calor para las proteasas PS1₄₆₇ y PS2₄₄₈, nos permitimos afirmar que: En PS1, la región implicada en el sitio catalítico, para TMD6 y TMD7 en Asp257 y Asp385 respectivamente, es una región ampliamente variable y presenta efectos muy representativos de mutaciones, y que en PS2 la región en las vecindades del sitio activo para

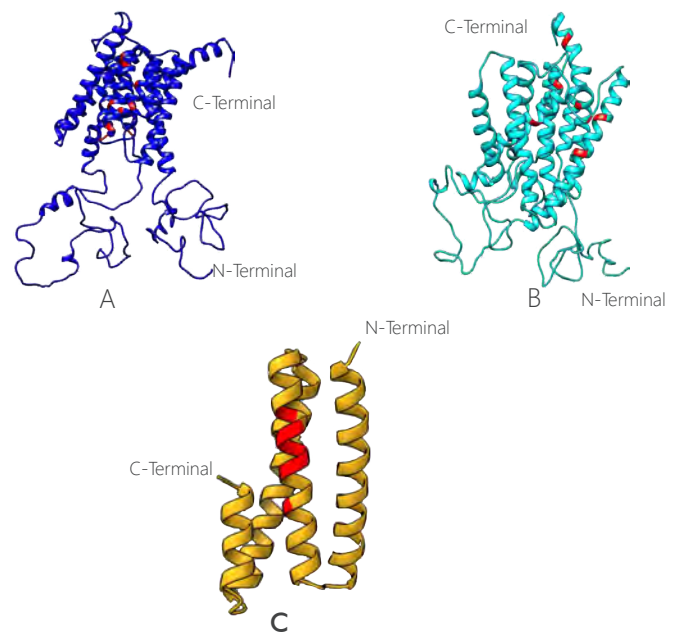


Figura 7. Visualización tridimensional de las mutaciones (Rojo) localizadas en las proteínas implicadas en la enfermedad de Alzheimer familiar: A) Modelo de la proteína PS1₄₆₇ (Azul oscuro) con las mutaciones evaluadas; B) Modelo de la proteína PS2₄₄₈ (Azul ciano) con las mutaciones evaluadas; C) Modelo del péptido APP₉₉ (dorado) propuesto con las mutaciones evaluadas.

la TMD6 y TMD7 en las posiciones Asp263 y Asp366, donde está ubicado el sitio catalítico, tiene gran variabilidad y afecta enormemente la estructura de la proteína; igualmente, la región TMD5 con la posición Met239, TMD3 con la posición Met178 y TMD2 con los aminoácidos Met152 y Met145, los cuales se encuentran en la entrada del bolsillo y afectan la estructura de la proteína, al sufrir una variante en esa posición en particular.

Consecuentemente, la caracterización realizada a las diez mutaciones en PS1₄₆₇, PS2₄₄₈ y en el péptido APP₉₉, hace visible los posibles cambios que cada una de las mutaciones efectúa en las proteínas respecto a procesos post-traduccionales como lo son: los sitios de fosforilación relacionados con procesos de señalización que dan cabida a la activación o desactivación de las proteínas, los sitios de N-Glicosilación, donde los glicanos en las glicoproteínas enmarcan procesos relacionados con la modulación de las interacciones célula-célula, célula-matriz y célula-molécula, y actúan como señales que determinan cómo se procesan las glicoproteínas dentro de la célula y a qué compartimentos debe dirigirse¹⁹; de igual forma, las modificaciones que dichas mutaciones generan en la localización de los dominios transmembranales y la influencia de las mismas con relación a la cantidad de polipéptidos β A40 y β A42. De este modo, notamos en PS1₄₆₇, PS2₄₄₈ y APP₉₉ como algunas mutaciones inactivan ciertas vías de fosforilación, otras aumentan o disminuyen la posibilidad de las quinasas correspondientes a realizar la fosforilación del sitio, otras activan nuevas vías de fosforilación y otras no afectan estas regiones; igualmente, en las N-glicosilaciones exceptuando a APP₉₉, se presentan situaciones similares, donde algunas mutaciones contribuyen con el aumento o disminución del potencial para que ocurra la glicosilación y otras no establecen cambios para dicho proceso; no obstante aclaramos que la cantidad de sitios de N-glicosilación que encontramos es muy inferior a los de fosforilación, por lo cual la probabilidad de afectación disminuye, pero esto no quiere decir que las N-glicosilaciones tengan un menor grado de importancia que las fosforilaciones a nivel funcional en las neuronas; es por ello que ambos factores los tuvimos en cuenta en nuestra investigación. En cuanto a la localización de los pasos transmembranales, exceptuando nuevamente a APP₉₉, hacemos notar las implicaciones que algunas mutaciones establecen respecto a cambios (desplazamientos) y pérdidas de los TMDs como de aquellas que no efectúan ningún cambio en estos; pero lo que hallamos de nuevo en ambas proteínas, es la relación de mutaciones cerca al sitio activo a residuos en su mayoría no polares y la mayor cantidad de polipéptidos β A42 respecto a los β A40, lo que nos permite inferir que dichas mutaciones no solo modifican el sitio activo

morfológicamente sino que aumentan la hidrofobicidad del bolsillo (fuerzas de dispersión de London), por consiguiente, el ambiente químico cambia y las interacciones enzima-sustrato durante el procesamiento de APP₉₉ favorecen el corte de polipéptidos de β A42, debido a que el fragmento de 42 aminoácidos presenta mayor carácter hidrofóbico que el fragmento de 40 aminoácidos; es así como aumenta la cantidad de polipéptidos de β A42, sus oligomerizaciones y la toxicidad que éste genera al ambiente extracelular de las neuronas. No obstante, aún se desconoce cómo son los mecanismos de enlace tanto de los residuos del sitio catalítico como los del sitio activo en el procesamiento del sustrato APP₉₉, al igual que la cinética enzimática involucrada en el mismo. Finalmente, resaltamos la importancia de visualizar tridimensionalmente las mutaciones evaluadas en cada una de las proteínas y el péptido amiloide de 99 aminoácidos, con el fin de dar claridad a las modificaciones conformacionales y estructurales a las que nos referimos en el contenido de nuestra investigación, aunque es clave, de igual manera, la contextualización de las mismas a nivel de la membrana celular.

Financiamiento

Este trabajo fue elaborado gracias a la financiación por parte del Ministerio de Ciencia Tecnología e Innovación de Colombia (Minciencias) del proyecto "Caracterización clínica y genética de grupos familiares con enfermedad de Alzheimer y trastornos de movimiento con patrones de herencia mendelianos", identificado con el código 111565741597.

AS-O fue financiado por la beca de Colciencias Francisco José de Caldas para doctorados nacionales en Colombia (FP44842-124-2017) con número 23411.

Contribución

AS-O y EC-S trabajaron por igual en la ejecución de los análisis y en la recolección de la información, además construyeron el manuscrito. AVL, PAM y GB han hecho el aporte crítico al manuscrito, la revisión y la orientación en la investigación.

Referencias

1. B. Dubois et al. Advancing research diagnostic criteria for Alzheimer's disease: the IWG-2 criteria. *Lancet Neurol.* 2014;13(6): 614-629 doi: 10.1016/S1474-4422(14)70090-0.

2. A. Delacourte. Fisiopatología de la enfermedad de Alzheimer. EMC Tratado Med. 2002; 6(4): 1–11. doi: 10.1016/S1636-5410(02)70234-1.
3. K. Blennow, M. J. de Leon, and H. Zetterberg. Alzheimer's disease. *Lancet* (London, England). 2006; 368(9533): 387–403. doi: 10.1016/S0140-6736(06)69113-7.
4. M. Kidd. Alzheimer's Disease--An Electron Microscopical Study. *Brain*. 1964; 87(2): 307- 320. doi: 10.1093/brain/87.2.307.
5. Lu W., Xu Y., Shao X., et al. Uric Acid Produces an Inflammatory Response through Activation of NF- κ B in the Hypothalamus: Implications for the Pathogenesis of Metabolic Disorders. *Sci Rep*. 2015; 5(1):12144. doi: 10.1038/srep12144.
6. Ballard C., Gauthier S., Corbett A., Brayne C., Aarsland D., Jones E. Alzheimer's disease. *Lancet*. 2011; 377(9770):1019–31. doi: 10.1016/S0140-6736(10)61349-9.
7. Arbor S.C., Lafontaine M., Cumbay M. Amyloid-beta Alzheimer targets-protein processing, lipid rafts, and amyloid-beta pores. *Yale J Biol Med*. 2016; 89(1): 5–21.
8. Yu X., Zheng J. Cholesterol promotes the interaction of alzheimer β -amyloid monomer with lipid bilayer. *J Mol Biol*. 2012; 421(4–5): 561–71. doi: 10.1016/j.jmb.2011.11.006.
9. Venugopal C., Demos C.M., Jagannatha Rao K.S., et al. Beta-secretase: structure, function and evolution. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2008; 7(3): 278-294. doi: 10.2174/187152708784936626.
10. Bush A. I. Drug Development Based on the Metals Hypothesis of Alzheimer's disease. *J. Alzheimer's Dis*. 2008; 15: 223-240, 2008. doi: 10.3233/jad-2008-15208
11. Kanekiyo T. and Bu G. Apolipoprotein E and Amyloid-beta-Independent Mechanisms in Alzheimer's Disease. Elsevier Inc., 2016. doi: 10.1016/B978-0-12-802851-3.00006-1
12. Annaert W., De Strooper B. A cell biological perspective on Alzheimer's disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol*. 2002;18:25-51. doi: 10.1146/annurev.cellbio.18.020402.142302.
13. Rostagno A., Holton JL, Lashley T, Revesz T, et al. Cerebral amyloidosis: Amyloid subunits, mutants and phenotypes. *Cell. Mol. Life Sci*. 2010; 67(4):581–600. doi: 10.1007/s00018-009-0182-4.
14. Rosenberg RN. The molecular and genetic basis of AD: the end of the beginning: the 2000 Wartenberg lecture. *Neurology*. 2000; 54 (11): 2045–2054. doi: 10.1212/WNL.54.11.2045.
15. Hardy J. Amyloid, the presenilins and Alzheimer's disease. *Trends Neurosci*. 1997; 20(4):154-9. doi:10.1016/S0166-2236(96)01030-2.
16. Guven G., Erginel-Unaltuna N., Samanci B., et al. A patient with early-onset Alzheimer's disease with a novel PSEN1 p.Leu424Pro mutation. *Neurobiol Aging*. 2019; 1, 2–5. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2019.05.014.
17. Cai Y., An A., Kim S. Mutations in presenilin 2 and its implications in Alzheimer's disease and other dementia-associated disorders. *Clin Interv Aging*. 2015; 14(10):1163-72. doi: 10.2147/CIA.S85808. eCollection 2015.
18. Sun L., Zhou R., Yang G., Shi Y. Analysis of 138 pathogenic mutations in presenilin-1 on the in vitro production of A β 42 and A β 40 peptides by γ -secretase. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2017; 114(4):E476–E485. doi: 10.1073/pnas.1618657114.
19. Szaruga M. Munteanu B., Lismont S. Alzheimer's-Causing Mutations Shift A β Length by Destabilizing γ -Secretase-A β n Interactions. *Cell*. 2017; 170(3):443-456.e14. doi: 10.1016/j.cell.2017.07.004.
20. Paschkowsky S., Hamzé M., Oestereich F., Munter LM. Alternative processing of the amyloid precursor protein family by rhomboid protease RHBDL4. *J Biol Chem*. 2016; 291(42): 21903-12. doi: 10.1074/jbc.M116.753582.
21. Szaruga M., Veugelen S, Benurwar M., et al. Qualitative changes in human γ -secretase underlie familial Alzheimer's disease. *J Exp Med*. 2015; 212(12):2003–13. doi: 10.1084/jem.20150892.
22. Lichtenthaler S. Alpha-secretase cleavage of the amyloid precursor protein: proteolysis regulated by signaling pathways and protein trafficking. *Curr Alzheimer Res*. 2012; 9(2): 165–177. doi: 10.2174/156720512799361655.
23. Eggert S., Paliga K., Soba P., et al. The proteolytic processing of the amyloid precursor protein gene family members APLP-1 and APLP-2 involves alpha-, beta-, gamma-, and epsilon-like cleavages: modulation of APLP-1 processing by n-glycosylation. *J Biol Chem*. 2004; 279(18):18146-56. doi:10.1074/jbc.M311601200.
24. Chávez-Gutiérrez L., Bammens L., Benilova I., et al. The mechanism of γ -Secretase dysfunction in familial Alzheimer disease. *EMBO J*. 2012; 31(10):2261-74. doi:10.1038/emboj.2012.79.
25. Vassar R. BACE1: the beta-secretase enzyme in Alzheimer's disease. *J Mol Neurosci*. 2004;23(1-2):105-114. doi: 10.1385/JMN:23-1-2:105.
26. Sanabria-Castro A, Alvarado-Echeverría I, Monge-Bonilla C. Molecular pathogenesis of alzheimer's disease: An update. *Ann Neurosci*. 2017; 24(1):46–54. doi: 10.1159/000464422.
27. Apweiler R, Bateman A, Martin M, O'Donovan C, Magrane M, Alam-Faruque Y, et al. Activities at the Universal Protein Resource (UniProt). *Nucleic Acids Res*. 2014; 42(D1):191–8. doi: 10.1093/nar/gkt1140.
28. The UniProt Consortium. The Universal Protein Resource (UniProt). *Nucleic Acids Res*. 2007; 35(S1): D193–D197. doi: 10.1093/nar/gkl929.
29. Alzforum. ALZFORUM Networking for a cure. Biomedical Research Forum. 2021. <https://www.alzforum.org/>
30. Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, Mcgettigan PA,

- McWilliam H, et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*. 2007; 23(21):2947–8. doi: 10.1093/bioinformatics/btm404.
31. Waterhouse AM, Procter JB, Martin DMA, Clamp M, Barton GJ. Jalview Version 2-a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics*. 2009; 25(9):1189–91. doi: 10.1093/bioinformatics/btp033.
 32. Hecht M, Bromberg Y, Rost B. Better prediction of functional effects for sequence variants. *BMC Genomics*. 2015; 16(S8):S1. doi: 10.1186/1471-2164-16-S8-S1.
 33. Hecht M, Bromberg Y, Rost B. News from the protein mutability landscape. *J Mol Biol*. 2013; 425(21):3937–48. doi: 10.1016/j.jmb.2013.07.028.
 34. Bromberg Y, Rost B. SNAP: Predict effect of non-synonymous polymorphisms on function. *Nucleic Acids Res*. 2007; 35(11):3823–35. doi: 10.1093/nar/gkm238.
 35. Artimo P, Jonnalagedda M, Arnold K, Baratin D, Csardi G, De Castro E, et al. ExPASy: SIB bioinformatics resource portal. *Nucleic Acids Res*. 2012; 40(W1):597–603. doi: 10.1093/nar/gks400.
 36. Blom N, Sicheritz-Pontén T, Gupta R, Gammeltoft S, Brunak S. Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence. *Proteomics*. 2004; 4(6):1633–49. doi: 10.1002/pmic.200300771.
 37. Blom N, Gammeltoft S, Brunak S. Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *J Mol Biol*. 1999;294(5):1351–62. doi: 10.1006/jmbi.1999.3310.
 38. Gupta R, Jung E, Brunak S. Prediction of N-glycosylation sites in human proteins. 2004; 46:203-206.
 39. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, et al. UCSF Chimera-A visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem*. 2004; 25(13):1605–12. doi: 10.1002/jcc.20084.
 40. Phillips JC, Braun R, Wang W, Gumbart J, Tajkhorshid E, Villa E, et al. Scalable molecular dynamics with NAMD. *J Comput Chem*. 2005; 26(16):1781–802. doi: 10.1002/jcc.20289.
 41. Humphrey W, Dalke A, Schulten K. VMD-Visual molecular dynamics. *J Mol Graph*. 1996; 14(1):33–8. doi: 10.1016/0263-7855(96)00018-5.
 42. Schedin-Weiss S, Winblad B, Tjernberg LO. The role of protein glycosylation in Alzheimer disease. *FEBS J*. 2014; 281(1):46–62. doi: 10.1111/febs.12590.

Artículo sin conflicto de interés

© Archivos de Neurociencias