

**UNIVERSIDAD DE CONCEPCION**



**TITULO:**

**COBRE MODULA LA FORMACION DE AGRESOMAS Y LA TRANSMISION  
AMPAérgica A TRAVES DE UN MECANISMO DEPENDIENTE DE  
UBIQUITINACION Y MICROTUBULOS**

Tesis de Magíster presentada a la Dirección de Postgrado de la  
Universidad de Concepción como parte de los requisitos para optar al  
grado de Magíster en Bioquímica y Bioinformática

Por

Christian Marcel Peters Pérez

2010

## RESUMEN

El ión cobre (Cu II/Cu I) participa como cofactor de enzimas que regulan la degradación de proteínas por el Sistema Ubiquitina-Proteosoma y también modula receptores del Sistema Nervioso Central (SNC) (Mathie et al, 2006). Sin embargo, no se ha determinado si el efecto de cobre sobre la excitabilidad neuronal está relacionado con cambios en la degradación de proteínas que regulan la transmisión neuronal. Resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio indican que cobre (CuCl<sub>2</sub>; 10 μM) induce la formación de agregados intracelulares y la poli-ubiquitinación de proteínas en células tratadas por 3hrs. En la presente tesis encontramos que este efecto depende de una red de microtúbulos estables, ya que colchicina bloquea el efecto de cobre sobre el patrón de ubiquitinación. Además determinamos que cobre no inhibe directamente la actividad de proteosoma 20S y 26S purificado, indicando que cobre actuaría sobre la maquinaria de ubiquitinación (Ubiquitina/E1/E2/E3) para inducir la formación de proteínas poli-ubiquitinadas. Sin embargo, la inducción de proteínas poli-ubiquitinadas inducidas por cobre saturaría la entrada de proteínas al proteosoma, facilitaría la acumulación de agregados endógenos citosólicos, inmunoreactivos para anticuerpos anti-ubiquitina, de un diámetro aproximado de 1-5 μm<sup>2</sup>, localizados en la cercanía de la membrana nuclear. Estudios realizados con un reportero de la actividad del proteosoma celular independiente de ubiquitinación, constituido por la proteína de fusión ornitina decarboxilasa (que contiene señal de degradación por proteosoma) y la proteína fluorescente Zsreen, indican que cobre a 12 hrs. de incubación induce eficientemente la formación de estructuras citosólicas, con carácter de agresoma, ya que éstas se acumulan en la cercanías del núcleo a través de un mecanismo dependiente de microtúbulos.

Para entender las posibles repercusiones funcionales que cobre pudiera ejercer sobre la red neuronal a tiempos cortos de incubación (3 hrs.), cuando ya se aprecia la acumulación de estructuras con carácter de agresoma, decidimos analizar la actividad sináptica de neuronas de hipocampo de rata, utilizando electrofisiología en célula completa, transitorias de calcio, inmunofluorescencia y Western blot. Los resultados indican que cobre aumenta la actividad sináptica de estas neuronas, aumentando la frecuencia de las corrientes AMPAérgicas (Control:  $0,210 \pm 0,046$  Hz, Cobre:  $0,680 \pm 0,159$  Hz), las transitorias de calcio intracelular (Control:  $0,050 \pm 0,013$  Hz; Cobre:  $0,113 \pm 0,020$  Hz) y la respuesta evocada a AMPA (Control:  $EC_{50} 8,3 \pm 0,5$   $\mu$ M; Cobre:  $EC_{50} 2,9 \pm 0,2$   $\mu$ M), lo que correlaciona con un aumento de los niveles de la subunidad GluR1 del receptor AMPA y PSD-95, determinado respectivamente por inmunofluorescencia indirecta y Western blot. Esto podría estar acompañado por un mayor anclaje de los receptores a la membrana debido al aumento de PSD-95 producto de la inhibición indirecta del proteosoma por cobre, ya que un inhibidor de ligasas E3 bloquea el efecto de cobre sobre la amplitud eléctrica. El aumento en la actividad sináptica inducida por cobre también sería mediado por microtúbulos, ya que colchicina inhibe este incremento (Cobre:  $0.379 \pm 0.128$  Hz; Cobre+Colchicina:  $0.174 \pm 0.013$  Hz). Los resultados de este trabajo pueden contribuir a entender el complejo papel que tiene el cobre sobre la regulación del sistema ubiquitina proteosoma, la formación de agresomas y el control de la transmisión sináptica. Estos hallazgos son relevantes para entender los efectos que este ión, pudiera tener en enfermedades que presentan una desregulación de cobre, como la observada en la enfermedad de Alzheimer (EA).