



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

ESCUELA NACIONAL DE MEDICINA Y HOMEOPATÍA
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
DOCTORADO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA

**Análisis conformacional de la familia de proteínas
reguladoras de la apoptosis Bcl-2**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORADO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

M. en C. Luis Alberto Caro Gómez

DIRECTORES:

D. en C. Absalom Zamorano Carrillo

D. en C. Claudia Guadalupe Benítez Cardoza



Ciudad de México, 2019



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

ESCUELA NACIONAL DE MEDICINA Y HOMEOPATÍA
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
DOCTORADO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA

Análisis conformacional de la familia de proteínas reguladoras de la apoptosis Bcl-2

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORADO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

M. en C. Luis Alberto Caro Gómez

Comité tutorial:

D. en C. Absalom Zamorano Carrillo - ENMH
D. en C. Claudia Guadalupe Benítez Cardoza - ENMH
D. en C. Laurence Marchat Marchau - ENMH
D. en C. Cynthia Ordaz Pichardo - ENMH
D. en C. Jorge Luis Rosas Trigueros - ESCOM



Ciudad de México, 2019

RESUMEN

Todos los organismos multicelulares deben mantener una regulación precisa de su recambio de masa celular durante toda su vida útil para evitar una variedad de trastornos de la salud tales como cáncer, enfermedades autoinmunes o neurodegenerativas. Las células dañadas o no deseadas son eliminadas por varios tipos de muerte celular, siendo la apoptosis el proceso más común en mamíferos. Este mecanismo se desencadena por la activación de los receptores de muerte en la superficie celular (vía extrínseca) o en respuesta al estrés celular que afecta a las mitocondrias (vía intrínseca).

Las proteínas de la familia Bcl-2 se consideran como los principales reguladores de la apoptosis. Las interacciones mutuas entre los miembros de la familia de proteínas Bcl-2 regulan estos eventos. Esta familia está compuesta de proteínas que impiden (anti-apoptótica) o promueven (pro-apoptótica) la apoptosis, así como miembros que regulan a las proteínas pro-apoptóticas y anti-apoptóticas de la familia.

La proteína Bcl-2 es el miembro arquetípico de proteína anti-apoptótica de la familia, la cual actúa como el guardián principal de la membrana mitocondrial externa, supervisando la liberación del citocromo c desde este organelo al citosol durante el proceso de apoptosis. Otro miembro anti-apoptótico de la familia Bcl-2 es la proteína Bcl-2A1, también conocida como A1/Bfl-1, que se expresa en varios linajes de células hematopoyéticas, incluidos linfocitos T-cooperadores, macrófagos y neutrófilos. Bcl-2A1 tiene una vida media de 30 min, mientras que Bcl-2 tiene una vida media de 24 h. Por lo tanto, Bcl-2 y Bcl-2A1 son reguladores fundamentales de la muerte celular programada. Ambas proteínas son miembros de la familia Bcl-2 que comparten una estructura similar formada por cuatro dominios BH (BH1-BH4). Además, en el extremo C-terminal tienen un dominio transmembrana (TM). La principal diferencia es que Bcl-2 contiene una región intrínsecamente desordenada (IDR) identificada en este trabajo como el dominio largo flexible (FLD) mientras que Bcl-2A1 carece de este dominio (bucle corto). Estas regiones conectan las hélices $\alpha 1$ y $\alpha 2$ en cada proteína.

En este estudio, estamos interesados en investigar las contribuciones de los dominios TM y FLD (individual y colectivamente) en la estabilidad estructural, la dinámica conformacional y su función en las proteínas de la familia Bcl-2. Examinamos los espacios conformacionales de Bcl-2, Bcl-2A1 y dos construcciones artificiales que carecen de TM

(Bcl-2 Δ TM y Bcl-2A1 Δ TM) utilizando simulaciones de dinámica molecular (DM) a diferentes temperaturas (310, 400 y 500 K).

Los resultados más importantes de las simulaciones de DM fueron que ambos dominios (FLD y TM) mostraron una tendencia a acercarse al núcleo cuando están presentes en la proteína. Estos cambios conformacionales bloquean el acceso al surco de unión formado por los dominios BH1, BH2 y BH3, lo que impide la interacción con otros miembros de la familia. Estos resultados sugieren que tanto FLD como TM tienen una contribución importante en la regulación de la función de Bcl-2 al dificultar el acceso del ligando al surco de unión.

Además, identificamos y ubicamos sitios ricos en prolina, ácido glutámico, serina y treonina (sitios PEST) dentro del FLD y bucle corto. Estos sitios son susceptibles a la degradación, ya sea a través de la escisión de μ -calpaína o la degradación de la proteína desencadenada por la ubiquitinación, regulando así la vida media de las proteínas. Los cambios conformacionales mostrados por FLD fueron: plegarse sobre sí mismo y acercarse al núcleo principal, por lo que algunos de estos sitios PEST se vuelven menos accesibles para las proteasas. Por el contrario, el bucle corto de Bcl-2A1 no mostró cambios conformacionales. Por lo tanto, no ocultó ninguno de los sitios potenciales PEST. Creemos que esto podría explicar las diferencias de la vida media reportada para estas proteínas.

En resumen, tanto el FLD como TM mostraron una tendencia a acercarse al núcleo cuando están presentes en la proteína. Estos eventos podrían promover la estabilización y compactación de Bcl-2 manteniendo la estructura general a través de la formación de nuevas interacciones.

Esta información contribuye a la comprensión de la regulación de la apoptosis por estos elementos estructurales.

ABSTRACT

All multicellular organisms must maintain precise regulation of their cell mass turnover during the entirety of their lifespan to avoid a variety of health disorders such as cancer, autoimmunity, and neurodegenerative dysfunction. Damaged or unwanted cells are eliminated by one of the several cell death types, with apoptosis being the most common process in mammals. This mechanism is triggered by activation of death receptors on the cell surface (extrinsic pathway) or in response to cellular stress involving the mitochondria (intrinsic pathway).

The proteins of the Bcl-2 family are considered as the major regulators of apoptosis. The mutual interactions among Bcl-2 family protein members regulate these events. This family is composed of proteins that either impede (anti-apoptotic) or promote (pro-apoptotic) apoptosis, or regulate pro-apoptotic and anti-apoptotic members of the family.

Bcl-2 protein is the archetypical member of the anti-apoptotic family, acts as the primary gatekeeper of the external mitochondrial membrane, supervising the release of cytochrome c from this organelle to the cytosol during apoptosis. Another anti-apoptotic member of the Bcl-2 family is Bcl-2A1, also known as A1/Bfl-1, expressed in several hematopoietic cell lineages, including T-helper lymphocytes, macrophages, and neutrophils. Bcl-2 and Bcl-2A1 have half-lives of 24 h and 30 min, respectively. Thus, Bcl-2 and Bcl-2A1 are fundamental regulators of programmed cell death. Both proteins are members of the Bcl-2 family that share a similar scaffold formed by four BH domains (BH1-BH4) and additionally at the C-terminus they have a transmembrane domain (TM). The main difference is that Bcl-2 contains an intrinsically disordered region (IDR) identified in this work as the flexible loop domain (FLD) while Bcl-2A1 lacks this domain (has instead a short loop). These regions connect $\alpha 1$ and $\alpha 2$ helices in each protein.

In this study, we are interested in investigating the contributions of FLD and TM domains (individually and collectively) to the structural stability, conformational dynamics, and function of Bcl-2 family proteins. We examined the conformational spaces of Bcl-2, Bcl-2A1, and two artificial constructs lacking the TM (Bcl-2 Δ TM and Bcl-2A1 Δ TM) using molecular dynamics simulations (MD) at different temperatures (310, 400, and 500 K).

The most important results of the MD simulations were that both TM and FLD showed a tendency to approach the core when they are present in the protein. These conformational

changes block the access to the binding groove formed by BH1, BH2, and BH3 domains, thus impeding the interaction with other members of the family.

These results suggest that FLD and TM have an essential contribution to the regulation of Bcl-2 function by hindering ligand access to the binding groove.

Also, we identified and located regions rich in proline, glutamic acid, serine and threonine (PEST sites) within the FLD and short loop. These sites are susceptible to protein degradation either through μ -Calpain cleavage or ubiquitination-triggered protein degradation, thus governing the half-life of the proteins. The conformational changes shown by FLD were: to fold on itself and to approach the central core; thus, some of these PEST sites become less accessible to proteases. On the contrary, the short loop of Bcl-2A1 did not show conformational changes, therefore not hiding any of the potential PEST sites. We believe that this might explain the differences of the half-life reported for these proteins.

In summary, both TM and FLD showed a tendency to approach the core when they are present in the protein. These events might promote stabilization and compaction of Bcl-2, maintaining the overall structure through the formation of new interactions.

This information contributes to the understanding of the regulation of apoptosis by these structural elements.

ÍNDICE

RESUMEN	I
ABSTRACT	III
ÍNDICE	V
ÍNDICE DE FIGURAS	VII
ÍNDICE TABLAS	IX
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Apoptosis.....	1
1.2 Vías de activación de la apoptosis	2
1.3 Apoptosis y procesos fisiopatológicos.....	4
1.4 Familia Bcl-2.....	4
1.5 Proteína Bcl-2.....	7
1.6 Proteína Bcl-2A1.....	8
1.7 Modelado y simulación de biomoléculas	10
1.8 Estudios de dinámica molecular de proteínas de la familia Bcl-2	11
2. JUSTIFICACIÓN	13
3. OBJETIVOS	14
3.1 Objetivo general.....	14
3.2 Objetivos particulares	14
4. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	15
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
5.1 Simulaciones de DM para el estudio proteínas	16
5.2 GROMACS	17
5.3 Campo de fuerza OPLS-AA.....	18
5.4 Simulaciones de DM de proteínas de la familia Bcl-2.....	19
6. RESULTADOS	22
6.1 Análisis secuencial de las proteínas Bcl-2 y Bcl-2A1	22

6.2	Análisis estructural de las proteínas Bcl-2 y Bcl-2A1.....	23
6.3	Análisis de las simulaciones de dinámica molecular	27
6.3.1	Proteína Bcl-2	28
6.3.2	Proteína Bcl-2 Δ TM.....	30
6.3.3	Proteína Bcl-2A1	31
6.3.4	Proteína Bcl-2A1 Δ TM	32
6.3.5	Análisis de dinámicas esenciales	33
6.3.6	Análisis de modos normales	34
7.	DISCUSIÓN.....	48
8.	CONCLUSIONES	50
9.	PERSPECTIVAS	51
10.	REFERENCIAS	52

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Vía intrínseca y extrínseca de la apoptosis [4]	3
Figura 2. Clasificación de los miembros de la familia de Bcl-2	5
Figura 3. Interacciones de las proteínas de la familia de Bcl-2 con diferentes dominios BH3	6
Figura 4. Proteínas de la familia de Bcl-2. a) Bcl-2 b) Bcl-2A1	9
Figura 5. Representación esquemática de las diferentes construcciones de proteínas de la familia Bcl-2	15
Figura 6. Esquema de un estudio in-silico usando GROMACS	17
Figura 7. Modelos tridimensionales de las diferentes construcciones de la proteína Bcl-219	
Figura 8. Alineamiento de las secuencias de Bcl-2 y Bcl-2A1	22
Figura 9. Análisis estructural de Bcl-2 vs las demás construcciones (Bcl-2 Δ TM, Bcl-2A1 y Bcl-2A1 Δ TM)	24
Figura 10. Identificación de regiones IDR dentro de las secuencias Bcl-2 y Bcl-2A1	25
Figura 11. Identificación de sitios PEST dentro de las secuencias Bcl-2 y Bcl-2A1.....	26
Figura 12. Imágenes representativas de los cambios conformacionales observados a 310, 400 y 500 K para Bcl-2 observados cada 20 ns	35
Figura 13. Imágenes representativas de los cambios conformacionales observados a 310, 400 y 500 K para Bcl-2 Δ TM obtenidos cada 20 ns	36
Figura 14. Imágenes representativas de los cambios conformacionales observados a 310, 400 y 500 K para Bcl-2A1 obtenidos cada 20 ns.....	37
Figura 15. Imágenes representativas de los cambios conformacionales observados a 310, 400 y 500 K para Bcl-2A1 Δ TM obtenidos cada 20 ns	38
Figura 16. Evolución temporal de la estructura secundaria de Bcl-2 (A, B y C), Bcl-2 Δ TM (D, E y F), Bcl-2A1 (G, H y I) y Bcl-2A1 Δ TM (J, K y L)	39
Figura 17. Raíz de la Desviación Cuadrática Media (RMSD) de las estructuras A) Bcl-2; B) Bcl-2 Δ TM; C) Bcl-2A1 y D) Bcl-2A1 Δ TM durante la simulación de DM	40
Figura 18. Raíz de la Fluctuación Cuadrática Media (RMSF) de las estructuras A) Bcl-2; B) Bcl-2 Δ TM; C) Bcl-2A1 y D) Bcl-2A1 Δ TM durante la simulación de DM	41
Figura 19. Radio de giro (Rg) de las estructuras A) Bcl-2; B) Bcl-2 Δ TM; C) Bcl-2A1 y D) Bcl-2A1 Δ TM durante la simulación de DM.....	42
Figura 20. Área superficial expuesta al solvente (SASA) de las estructuras A) Bcl-2; B) Bcl-2 Δ TM; C) Bcl-2A1 y D) Bcl-2A1 Δ TM durante la simulación de DM	43

Figura 21. Número de puentes de hidrógeno presentes en las estructuras A) Bcl-2; B) Bcl-2 Δ TM; C) Bcl-2A1 y D) Bcl-2A1 Δ TM durante la simulación de DM	44
Figura 22. Mapas de contacto formados entre los residuos de cada una de las estructuras; Bcl-2 (A, B y C), Bcl-2 Δ TM (D, E y F), Bcl-2A1(G, H y I) y Bcl-2A1 Δ TM (J, K y L)	45
Figura 23. Matriz de covarianza	46
Figura 24. Visualización de los análisis de modos normales de las proteínas (A) Bcl-2 y (B) Bcl-2A1	47

ÍNDICE TABLAS

Tabla 1. Estudios de simulaciones de DM de proteínas pertenecientes a la familia Bcl-2	11
Tabla 2. Resultados de los modelos en términos de análisis estructural.....	20
Tabla 3. Datos del sistema para cada construcción utilizada en simulaciones de dinámica molecular	21