



Instituto Politécnico Nacional

Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía

Sección de Estudios de Posgrado e Investigación

Programa Institucional de Biomedicina Molecular

***Purificación y modelado molecular de la proteína pro-
apoptótica Bax***

Tesis

Que para obtener el grado de
Maestro en Ciencias de Biomedicina Molecular

Presenta

Biól. Mar. Roberto Isaac López Cruz

Directores:

Dr. Absalom Zamorano Carrillo

Dra. Francisca Pérez Severiano

México D.F, 2011

Dedicado a mi dulce compañera - Lilián-.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca de maestría.

Al CONACYT-SEP en Ciencia Básica 61319 CB-2007-01.

Al Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal (ICyTDF) por la compra del espectropolarímetro que permitió la obtención de resultados de esta tesis.

Al sistema de becas institucional y PIFI por las becas complementarias.

A mis directores de tesis, el Dr. Absalom Zamorano y la Dra. Francisca Pérez por brindarme su confianza, paciencia y consejos, no solo a nivel académico sino en cuestiones personales. Los admiro mucho y deseo seguir compartiendo pequeños logros junto a ustedes.

A mi comité tutorial, Dra. Claudia Benítez mil gracias por su tiempo y disposición, disfruté mucho la cuestión académica y las pláticas personales, gracias por los ánimos. A la Dra. Laurence Marchat y al Dr. César Sandino, gracias por ayudarme a mejorar el trabajo con su conocimiento, disposición y voluntad.

Al los M en C, Gerardo Resendiz y Jorge Rosas por compartirme su experiencia en el campo experimental y computacional, respectivamente, sin su conocimiento hubiera sido imposible completar este trabajo. Al Dr. Jaime Ortega por permitirme trabajar en su laboratorio de Biotecnología de proteínas, consejos y apoyo.

A la Dra. Ma. Elena Chánez por recibirme en el laboratorio de Patología Vascul ar Cerebral del INNyN y brindarme su apoyo y consejos.

Al Dr. Sergio Montes del departamento de Neuroquímica del INNyN por su amabilidad y disposición para la realización del proyecto.

A todos mis compañeros de generación por los momentos compartidos, en especial a Berenice Juárez y a Rocío Tolentino por su valiosa y singular amistad, por compartirme su fuerza y enseñarme con su ejemplo, ahora son parte importante en mi vida. A mi amigo Jonathan Carrillo, gracias por las innumerables anécdotas y consejos.

A mis compañeros de laboratorio, gracias a todos, ya somos demasiados como para poner nombres, les agradezco en especial a todos los que me enseñaron desde hacer un gel hasta experimentos de mayor esfuerzo, gracias por la convivencia, los buenos ratos y las risas.

A mi familia, por siempre apoyarme dándome de comer, un techo y su cariño, en especial a Leticia Cruz, eres la mejor. A mis siempre amigos Noé Serrano y Marco Salazar, gracias por impulsarme a ser lo que ustedes.

A Lilián Arzeta y Jacob Ramos, son mi esperanza, mi felicidad y lo más importante, deseo que Dios nos bendiga siempre.

Índice

Lista de abreviaturas.....	4
Lista de figuras	5
Lista de tablas.....	7
Resumen	8
Abstract	9
1. Introducción.....	10
2. Antecedentes	14
2.1. Purificación de la proteína recombinante.....	14
2.2. Interacción de Bax con membranas lipídicas.....	15
2.3. Dinámica molecular de Bax.....	17
2.4. Espectrometría de Bax recombinante.....	18
3. Justificación.....	20
4. Objetivos	21
5. Materiales y métodos	22
5.1. Análisis bioquímicos y de biología molecular.....	22
5.2. Amplificación por PCR de la secuencia de ADN codificante de Bax.....	22
5.3. Clonación del ADN de Bax en el vector pET28a.....	23
5.4. Inducción de la expresión de Bax.....	24

5.5. Extracción de proteínas totales	24
5.6. Salting out	25
5.7. Purificación de la proteína recombinante Bax.....	25
5.8. Cromatografía de interacción hidrofóbica	25
5.9. Cromatografía de afinidad	26
5.10. Dinámica molecular	26
5.11. Espectro UV-Vis	28
5.12. Espectro de dicroísmo circular	29
5.13. Espectro de emisión de fluorescencia	29
6. Resultados	30
6.1. Obtención y análisis de ADN plasmídico de pOTB7	30
6.2. Estandarización de la reacción de PCR a partir del vector pOTB7 para la amplificación de la secuencia correspondiente a Bax.....	31
6.3. Clonación en el vector de expresión pET28a y su confirmación por digestión enzimática y PCR.....	32
6.4. Sobreexpresión de la proteína recombinante Bax	35
6.5. Purificación de la proteína recombinante Bax.....	35
6.6. Cromatografía por interacción hidrofóbica.....	36
6.7. Cromatografía de afinidad	36
6.8. Dinámica molecular	38

6.8.1. Parámetros del orden del deuterio de las cadenas acilo (SCD).....	40
6.8.2. Densidad de la membrana.....	41
6.8.3. RMSD y RMSF	42
6.8.4. Estructura secundaria.....	43
6.8.5. Snapshots	44
6.9. Espectro UV-Vis	47
6.10. Espectro de dicroísmo circular.....	48
6.11. Espectro de fluorescencia	49
7. Discusión.....	50
8. Conclusiones.....	54
9. Perspectivas.....	55
10. Bibliografía	56
11. Anexos	60

Lista de abreviaturas

2-YT: Triptona-extracto de levadura 2X.

Å²: Angstrom cuadrados.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

Bax: Proteína X asociada a Bcl-2.

cDNA: Ácido desoxirribonucleico complementario.

CTAB: Bromuro de hexadeciltrimetilamonio.

DC: Dicroísmo circular.

DM: Dinámica molecular.

DMPC: Dimiristoilfosfatidilcolina.

DPPC: Dipalmitoilfosfatidilcolina.

GROMACS: Groningen machine for chemical simulations.

GST: Glutación-S-transferasa.

IPTG: Isopropil -β-D-1-tiogalactopiranosido.

LB: Luria-Bertani.

MBP: Proteína de unión a maltosa.

NaCl: Cloruro de sodio.

Ni-NTA: Ácido nitriloacético-Niquel.

OPLS-AA: Potenciales optimizados para la simulación de líquidos-todos los átomos.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

PDB: Banco de datos de proteínas.

RMSD: Desviación cuadrática media.

RMSF: Fluctuación cuadrática media.

RMN: Resonancia magnética nuclear.

SCD: Parámetros del orden del deuterio.

SDS-PAGE: Electroforesis en geles de poliacrilamida.

Lista de figuras

Figura 1. Esquema de amplificación por PCR del ADN codificante para la proteína Bax a partir del vector de clonación pOTB7.	23
Figura 2. Purificación y digestión enzimática del plásmido pOTB7.....	30
Figura 3. Análisis de homología a partir de la secuencia de nucleótidos de Bax obtenido con blastn	31
Figura 4. Amplificación por PCR del ADN que codifica para la proteína Bax a partir del vector pOTB7	32
Figura 5. Análisis por digestión enzimática de la construcción pET28a-Bax	33
Figura 6. Confirmación por PCR del ADN de Bax a partir del plásmido pET28a-Bax	33
Figura 7. Alineamiento obtenido después de traducir la secuencia de nucleótidos resultante de la secuenciación y utilizar la herramienta blastp	34
Figura 8. Sobreexpresión de la proteína Bax por SDS-PAGE.....	35
Figura 9. Cromatograma del proceso de purificación por interacción hidrofóbica	36
Figura 10. SDS-PAGE de las fracciones recuperadas de la cromatografía por interacción hidrofóbica que contienen a Bax	36
Figura 11. SDS-PAGE de las fracciones recolectadas que contenían a Bax después de pasar por cromatografía de afinidad	37
Figura 12. Parámetros de orden de las cadenas acilo	40
Figura 13. Densidad de la membrana lipídica	41
Figura 14. Desviación cuadrática media durante 10 ns y fluctuación cuadrática media de los 192 aminoácidos correspondientes a Bax	42

Figura 15. Análisis de estructura secundaria	43
Figura 16. Snapshots de la estructura de Bax a distintos tiempos de simulación.....	44
Figura 17. Snapshots de Bax embebida en la membrana de DPPC	45
Figura 18. Bax inserta en una membrana de 123 DPPC solvatada en moléculas de agua.....	46
Figura 19. Espectro UV-Vis de Bax recombinante	47
Figura 20. Espectro de DC obtenido de la proteína Bax monomérica	48
Figura 21. Comparación del espectro de emisión intrínseca del triptófano del monómero de Bax	49

Lista de tablas

Tabla 1. Condiciones de amplificación del ADN de Bax por PCR Anexo 1

Resumen

Bax es un miembro de la familia Bcl-2 que tiene un papel importante en la inducción de la apoptosis. Esta proteína se ha detectado en la membrana mitocondrial externa (MEM) como consecuencia de un estrés celular, involucrando una homo- o hetero-dimerización. En esta tesis reportamos la clonación del vector pET28a-Bax que permitió la expresión y purificación de la proteína Bax humana recombinante (23 kDa). Además, la fluorescencia intrínseca del triptófano (FT) y la espectroscopia de dicroísmo circular (DC) evidencian que la proteína se obtuvo en forma de monómero, y que su estructura secundaria coincide con la reportada previamente. Por otro lado, debido a que el mecanismo molecular de la interacción de Bax con la MEM no se ha aclarado por completo, construimos un sistema DPPC-H₂O-Bax para simular el comportamiento global de los componentes estructurales de Bax dentro de una bicapa lipídica mediante dinámica molecular. Interesantemente, las hélices alfa que se han reportado como hidrofóbicas o hidrofílicas corresponden a una localización respectiva en la membrana en la mayor parte de la simulación. Esta tesis propone un método alternativo para obtener a la proteína Bax humana y se hipoteiza acerca de sus dominios de interacción con la membrana.

Abstract

Bax is a member of the Bcl-2 family that plays a key role in apoptosis induction. This protein has been detected in mitochondrial external membrane (MEM) as a result of a cellular stress, and it undergoes both homo- or hetero- dimerization. Herein we report the obtaining of pET28a-Bax vector that allowed the expression and purification of a human recombinant Bax protein (23 kDa). Additionally, Tryptophan-fluorescence (TF) and circular dichroism spectroscopy (CD) evidenced that a monomeric form was obtained, and its secondary structure coincided with the previously reported. In turn, as molecular mechanism of the interaction of Bax with MEM has not fully clarified, we constructed a DPPC-H₂O-Bax system to simulate the global behavior of Bax structural components within a lipid bilayer by molecular dynamics. Interestingly, alpha-helices that have been reported as hydrophobic or hydrophilic corresponded with a respective location on membrane for most simulation. This thesis proposes an alternative method to obtain human Bax protein and hypothesize about interaction of Bax with the membrane.

1. Introducción

La muerte celular programada (apoptosis) desempeña un papel indispensable durante el crecimiento y desarrollo, el mantenimiento de la homeostasis tisular, la eliminación de células infectadas, mutadas y dañadas en los organismos multicelulares (Mancinelli et al. 2006; Sas et al. 2007; Teles et al. 2008; Jourdain y Martinou 2009; Chipuk et al 2010) Las características morfológicas que caracterizan a las células apoptóticas son: condensación de la cromatina, fragmentación del ADN, desintegración de la membrana nuclear y formación de vesículas en la superficie celular (cuerpos apoptóticos) (Jiang y Wang 2004; Von Bernhardi, 2004).

Existen varias alteraciones en el mecanismo de apoptosis que están involucradas en distintas patologías humanas como el cáncer, desordenes neurodegenerativos o infecciones virales (Sas et al. 2007; Jourdain y Martinou, 2009). De manera general las cascadas de señalización que desencadenan en apoptosis se dividen en dos categorías: la vía extrínseca (mediada por receptores de muerte) y la vía intrínseca (vía apoptótica mitocondrial) (Putcha et al. 2002; Fulda & Debatin 2006). La vía apoptótica mitocondrial es un mecanismo biológico altamente regulado que involucra la permeabilización de la membrana externa mitocondrial, permitiendo la liberación de proteínas secuestradas en el espacio intermembranal de la mitocondria hacia el citosol, donde participan en la activación de caspasas (Lalier et al. 2007; Chipuk et al. 2010). La permeabilización de la mitocondria está regulada por la familia de proteínas Bcl-2, las cuales pueden formar homo- y hetero-oligómeros en la membrana y determinar el destino de la célula (Lewis et al. 1998; Bocharov et al. 2007; Lalier et al. 2007). La familia de proteínas Bcl-2 incluye proteínas con actividades pro-apoptóticas y anti-apoptóticas, se pueden clasificar en 3 subgrupos: proteínas anti-apoptóticas tipo Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-x_L y Bcl-w), proteínas pro-apoptóticas multidominio (Bax y Bak) y las proteínas pro-apoptóticas de un solo dominio BH3 (Bik, Bid, Bad) (Teles et al. 2008; Jourdain y Martinou, 2009, Bleicken et al. 2010). Estas proteínas comparten de uno a cuatro dominios homólogos (denominados BH1-4) con Bcl-2, y son susceptibles de homo- y hetero-dimerización (Lalier et al. 2007).

Esquemáticamente las proteínas antiapoptóticas y algunas BH3 inhiben la activación de las proteínas multidomínios Bax y Bak y su oligomerización en la membrana externa mitocondrial (Lalier et al. 2007).

De manera particular Bax es una proteína esencial para el proceso de apoptosis (Lalier et al. 2007), promueve activamente la alteración del potencial de la membrana mitocondrial y la activación de caspasas (Brambrink et al. 2000). Generalmente Bax se encuentra como una proteína globular en su conformación nativa (Lalier et al. 2007) e inactiva en el citoplasma de las células sanas (Cartron et al. 2004). Durante la apoptosis, Bax sufre cambios conformacionales que permiten la exposición de sus dominios (N y C terminales) y se transloca del citoplasma a la mitocondria (Hou & Hsu 2005) insertándose en la membrana externa de ésta y permeabilizándola (Lalier et al. 2007), por lo tanto la activación de Bax debe ser estrictamente regulada, en el contexto de que una muerte celular descontrolada es perjudicial para los organismos multicelulares (Bleicken et al. 2010). Los cambios conformacionales que involucran la translocación de Bax a la mitocondria se dan a nivel de estructura secundaria y principalmente en la estructura terciaria (Lalier et al. 2007).

La estructura tridimensional de Bax se compone de 9 hélices alfa ($H\alpha 1-9$) separadas por “loops” no estructurados (Lalier et al. 2007), dos hélices alfa hidrofóbicas en el centro, rodeadas por siete hélices alfa anfipáticas de distintas longitudes (Mancinelli et al. 2006). Existe un núcleo hidrofóbico en esta proteína formado por segmentos de las hélices alfa 4, 5, 6, 7 y 8 que a su vez es cubierto por el extremo carboxilo terminal ($H\alpha 9$) (Mancinelli et al. 2006). En su forma activa los dominios hidrofóbicos de Bax ($H\alpha 5$ y $H\alpha 6$) son expuestos, incrementando su afinidad por las membranas biológicas, e incluso se ha demostrado que son dominios transmembranales (Lalier et al. 2007). Estos cambios conformacionales pueden ser provocados por cambios en el pH o exposición a detergentes, obteniendo como resultado epítopes similares a los observados durante la apoptosis (Cartron et al. 2004; Lalier et al. 2007). Sin embargo, la conformación de Bax asociada a la membrana estructuralmente no

ha sido descrita de manera precisa, por lo tanto, su mecanismo de asociación debe ser estudiado. La importancia de este tipo de estudios radica en que Bax es una proteína que tiene múltiples dominios, juega un papel importante en la apoptosis mediada por citocromo *c*, y es relevante en la modulación del número de células en un tejido, lo cual en ocasiones se asocia a condiciones patológicas (Mancinelli et al. 2006).

Con el fin de desarrollar conocimiento sobre la inserción de Bax a la membrana mitocondrial, en esta tesis se emplearon simulaciones de dinámica molecular, las cuales son una herramienta importante para entender las bases físicas de la estructura y función de macromoléculas biológicas (Karplus y McCammon 2002). Además, describen los procesos generales de los sistemas químicos en términos de un modelo realista atómico con el propósito de entender y predecir propiedades macroscópicas basadas en un conocimiento preciso a nivel de una escala atómica y a una resolución que experimentalmente no es posible demostrar (Lindahl et al. 2001). En un modelo dinámico se pueden observar los movimientos internos de las moléculas que dan lugar a los cambios conformacionales que juegan un papel esencial en su función (Karplus y McCammon, 2002). Existen diversos ejemplos relevantes acerca de proteínas de la familia Bcl-2 simuladas por dinámica molecular (DM), tal es el caso de la descripción de las interacciones de dominios homólogos BH3 de la proteína anti-apoptótica Bcl-x_L con los dominios BH3 de proteínas antagonistas o con la misma función (Moroy et al. 2009); la interacción del dominio transmembranal de BNip3 con una membrana de DMPC donde se exhibe un transporte iónico a través de éste (Bocharov et al. 2007). En el caso de proteínas de otras familias la simulación de la proteína acuaporina-1 en una bicapa de palmitoiloleoilfosfatidilcolina, por ejemplo, revela un motivo importante cerca del extremo N-terminal y el acomodo de una fila de moléculas de agua dentro de los monómeros (Zhu et al. 2001), incluso los estudios de dinámica molecular permiten estudiar proteínas virales como PB1-F2 del virus de influenza A que forman canales iónicos no selectivos en las membranas y promueven la apoptosis (Henkel et al. 2010).

Tomando en cuenta la importancia estructural de Bax, existen diversas técnicas que permiten complementar este estudio, como son: la espectroscopía de dicroísmo circular (DC) y la emisión de fluorescencia intrínseca del triptófano (FT). La técnica del DC en la región espectral del UV lejano (190-250 nm) permite estimar el contenido de estructura secundaria de las proteínas (Ranjbar & Gill 2009). En el caso de Bax el espectro de DC en el UV lejano está reportado (Yethon et al. 2003; Bleicken & Zeth 2009). En este trabajo, se obtuvo el espectro de DC de Bax para compararlo con el espectro reportado en la literatura y así verificar su integridad estructural y su correcto plegamiento. Por otra parte, la técnica de FT permite evaluar la estructura terciaria de una proteína, ya que un espectro de emisión de los aminoácidos aromáticos (principalmente el triptófano, que presenta mayor rendimiento cuántico comparado con tirosina y fenilalanina) brinda información sobre la hidrofobicidad del entorno de los triptófanos presentes en la proteína de interés. Así, mediante el entorno de los triptófanos sea más hidrofóbico el máximo de emisión de fluorescencia se desplaza hacia longitudes de onda menores, respecto al espectro de emisión de una proteína con triptófanos mayormente expuestos al solvente acuoso, es decir con un ambiente más hidrofílico. El espectro de FT de Bax también se ha reportado en la literatura por Bleicken y Zeth, 2009 y se utiliza para compararlo con nuestros datos experimentales.

Por lo anterior, en el presente trabajo se reporta la purificación de la proteína pro-apoptótica Bax humana con el fin de que en estudios futuros se evalúe su actividad en experimentos *in vitro* e *in vivo*. Por otro lado, se construyó un modelo dinámico del comportamiento de un monómero de la proteína Bax inserta en una bicapa lipídica por medio de la técnica de dinámica molecular y, se comparan los espectros de DC y FT con espectros anteriormente reportados para validar los experimentos realizados en este estudio.

2. Antecedentes

2.1. Purificación de la proteína recombinante

Hasta hace una década la purificación de Bax representaba un reto, debido a que en su estructura el dominio C-terminal presenta características hidrofóbicas que le confieren poca solubilidad a la proteína y dificultan su obtención en cantidades considerables, por lo tanto, la mayoría de los estudios sobre Bax se desarrollaron con el extremo C-terminal truncado. Además eran necesarias grandes cantidades de detergentes para lograr que Bax no precipitara y, al mismo tiempo modificaban en cierto grado la función de la proteína obtenida.

Lewis et al. (1998) purificaron a la proteína recombinante Bax humana, truncando los últimos 20 aminoácidos que correspondían al dominio hidrofóbico del C-terminal, con el fin de obtener grandes cantidades de proteína soluble. La proteína truncada fue expresada como una proteína de fusión unida a glutatión-S-transferasa (GST), se utilizó una columna de glutatión-Sefarosa para retenerla y se liberó a Bax de la enzima GST utilizando trombina. Posteriormente Bax se purificó utilizando una columna cromatográfica de heparina-Sefarosa y DEAE-Sefarosa de manera secuencial obteniendo una pureza de 94%. Los autores encontraron que la proteína truncada tenía la capacidad de formar poros en las membranas lipídicas e inducía muerte celular mediante microinyecciones de cDNA en neuronas simpáticas.

Montessuit y colaboradores (1999) lograron expresar y purificar por primera vez la forma completa de la proteína Bax utilizando un tracto de histidinas en el extremo N-terminal y, cromatografía de afinidad en Ni-NTA-agarosa seguida de cromatografía de intercambio iónico en Q-Sefarosa. La pureza de la proteína obtenida fue mayor al 98%. La proteína en su forma completa fue 25 veces más eficiente en formar poros en liposomas artificiales y promover la liberación de carboxifluoresceína en comparación con la proteína

Bax truncada del extremo C-terminal. Por lo tanto, demostraron que éste dominio contribuye de manera importante a la formación de canales en las membranas y, además, que la formación de canales se incrementa en medida que se aumenta la dosis de Bax.

Suzuki y colaboradores (2000) obtienen la proteína completa y sin aminoácidos adyacentes a la proteína de interés. Esta proteína fue utilizada para determinar sus coordenadas atómicas por medio de resonancia magnética nuclear (RMN), mismas que se encuentran depositadas en el banco de datos del Protein Data Bank (PDB) con número de acceso 1F16.

Eliseev y colaboradores (2004) utilizaron un sistema de proteína de unión a maltosa (MBP) y una columna de afinidad a cobalto para expresar y purificar la forma p18 de la proteína Bax. La MBP le confiere a Bax p18 la solubilidad necesaria para que no se precipite y obtenerla en grandes cantidades. Durante el proceso de apoptosis la forma completa de Bax (p21) puede ser procesada por la enzima calpaina, dando como resultado la forma p18 de Bax (Choi et al. 2001), que pierde los primeros 38 aminoácidos en el extremo N-terminal. Sin embargo, observaron que ésta proteína conserva la capacidad para formar canales y promover la liberación de citocromo *c*, aunque en menor medida que Bax p21. La proteína Bax p18 generalmente se encuentra en mayores proporciones en las últimas fases de la apoptosis, por lo que los autores sugieren que Bax p18 contribuye a la liberación de más citocromo *c*, lo que provoca que el proceso de apoptosis sea irreversible. Por último proponen el sistema MBP como una estrategia posible para expresar y purificar la forma completa de Bax.

2.2. *Interacción de Bax con membranas lipídicas*

En un intento por aproximarse a la determinación de la estructura de Bax en las membranas lipídicas se han desarrollado diversos trabajos *in vitro* en los cuales como característica principal se promueve la interacción de la proteína con membranas lipídicas, tanto artificiales como mitocondriales. Yethon y colaboradores (2003) junto con Annis y colaboradores (2005) determinan que

los lípidos tienen un papel importante en la interacción de Bax con la membrana. El primer grupo de investigación establece que los lípidos de liposomas artificiales, membranas mitocondriales y de retículo endoplásmico (RE) inducen cambios conformacionales en Bax que pueden ser detectados por inmunoprecipitación utilizando un anticuerpo monoclonal (6A7) que reconoce un segmento de el extremo N-terminal. Descubren que el cambio conformacional en Bax mediado por lípidos es reversible una vez que los lípidos son retirados, y éste no implica que Bax se inserte en las membranas. Por medio de dicroísmo circular (DC) y calorimetría diferencial de barrido (CDB) descubren que los lípidos artificiales causan que Bax adquiera una conformación más estable, aunque el resultado no converge con mitocondrias o RE, las diferencias son atribuidas al sistema *in vitro* ya que cuando Bax es incubada con liposomas artificiales no existen moléculas que intervengan o presenten actividad anti-apoptótica (proteínas de la familia Bcl-2, humanina y Ku70 entre otras), a diferencia de las que se encuentran en las membranas mitocondriales y de RE. Finalmente concluyen que el cambio conformacional representa un paso de sensibilización y es una de las primera etapas en el proceso de activación de Bax *in vivo*. Posteriormente (Annis et al. 2005) demuestran que la oligomerización de Bax ocurre en la membrana una vez que múltiples monómeros están insertados en ésta; debido a cambios conformacionales en el extremo N-terminal los monómeros sufren un rearrreglo para formar los oligómeros que permeabilizan la MEM.

Brustovetsky y colaboradores (2010) demuestran que la inserción y oligomerización de Bax en la MEM no implica la liberación masiva de citocromo c, sin embargo, cuando Bax es activada por tBID (forma activa de la proteína BID) o las concentraciones de Ca^{2+} son altas se incrementa la liberación de citocromo c. Además, señalan que las mitocondrias son fundamentales para la oligomerización de Bax, los investigadores concluyen que en su ausencia las altas concentraciones de Ca^{2+} o la presencia de tBID no inducen la oligomerización de la proteína. Al incluir a la proteína recombinante Bcl-x_L para prevenir la inserción y oligomerización de Bax en la MEM no observan ninguna disminución en estos procesos, aunque la liberación de citocromo c se atenúa drásticamente y al agregar un agente reductor (DTT, ditiotreitól 20 mM) se

inhibe la inserción y oligomerización de Bax aún cuando tBid está presente y en altas concentraciones de Ca^{2+} .

2.3. *Dinámica molecular de Bax*

En el contexto de los modelos moleculares (Chen et al. 2007) desarrollaron un modelo matemático basado en ecuaciones diferenciales ordinarias, y un modelo *in silico* a través de los cuales examinan la activación de Bax como un factor determinante para el proceso de apoptosis. Los modelos proponen que cuando Bax se polimeriza se activa de manera irreversible, y, que aun cuando los estímulos apoptóticos disminuyan o se atenúen, la permeabilización de la membrana externa mitocondrial compromete a la célula a morir incluso cuando no hay activación de caspasas.

Mancinelli y colaboradores (2007) realizaron una simulación de dinámica molecular entre Bax y la formación de un complejo con un péptido de características anti-apoptóticas similares a las de la proteína Bip. La simulación reveló detalles estructurales necesarios para la interacción de Bax con otras proteínas regulatorias. La región de Bax con mayor afinidad para Bip se localiza en la proximidad de su dominio BH3 e involucra también a las $\text{H}\alpha 1$ y $\text{H}\alpha 9$. Encuentran también que los movimientos a 300 y 400 K antes y después de la formación del complejo con Bip evidencian que la unión con éste afecta los movimientos colectivos de regiones específicas de Bax, que se consideran con relevancia funcional. Específicamente estas regiones involucran un segmento en el extremo N-terminal y la $\text{H}\alpha 1$, que se consideran importantes en el inicio de la interacción de Bax con la membrana externa mitocondrial, la región de unión a Bip, y a la $\text{H}\alpha 9$, cuyo desplazamiento es necesario para el acceso al núcleo hidrofóbico, que a su vez interactúa con el dominio BH3 de Bax u otras proteínas Bcl-2 en el proceso de oligomerización en la mitocondria.

Debido a que las aproximaciones que explican la interacción de Bax en membranas lipídicas tienen limitaciones de resolución en cuanto los modelos propuestos (Annis et al. 2005; Lalier et al. 2007) es necesario desarrollar

modelos que confirmen y representen de manera atómica las estructuras reportadas como relevantes para el proceso de inserción de Bax en la MEM.

2.4. *Espectrometría de Bax recombinante*

Yethon y colaboradores (2003) reportan el primer espectro de DC de la proteína Bax obteniendo un patrón predominante de hélices alfa; estiman el contenido de estructura secundaria obteniendo: 66% de hélices alfa, 6% de estructuras beta, 12% de giros beta y un 16% restante de estructuras aleatorias. El análisis mediante CDB no demuestra cambios significativos en el contenido de estructura secundaria (67% de hélices alfa, 8% de estructuras beta, 15% de giros beta y un 10% de estructuras aleatorias, sin embargo, al realizar análisis de desplegamiento térmico por DC y CDB incubando Bax con lípidos (liposomas artificiales), logran caracterizar cambios conformacionales que sustentan vuelven a la proteína mucho más estable, lo anterior debido a las altas temperaturas en las que se muestra una transición del despegamiento (un intervalo entre 77° y 88 °C para el análisis por DC).

Bleicken y Zeth (2009) retoman los experimentos de DC realizados por Yethon et al. (2003) y analizan los espectros de la proteína en su conformación monomérica y oligomérica, sin encontrar diferencias estructurales significativas y corroborando un espectro característico de una proteína estructurada solamente por hélices alfa. Además analizan por medio de FT la influencia de detergentes o lípidos en el ambiente local de los residuos de triptófano durante la oligomerización de Bax. Los autores demuestran que la oligomerización de Bax provoca cambios en el espectro de emisión proponiendo que durante el proceso la proteína sufre cambios conformacionales en el extremo C-terminal (en ésta región se encuentran los 6 triptófanos que contiene Bax) provocando que los triptófanos se tornen menos accesibles, el significado biológico de este cambio conformacional proponen que permite a este extremo protección o inaccesibilidad a proteasas; lo anterior lo demuestran al incubar a Bax en su conformación monomérica con proteinasa K (proteasa con preferencia a digerir la unión peptídica adyacente a aminoácidos aromáticos) y detectar que hay proteólisis en el C-terminal a diferencia de cuando se incubaba a la proteasa con

Bax oligomérica. Finalmente, evalúan el desplegamiento térmico de Bax observando que la proteína es estable a altas temperaturas. Bax en su forma monomérica comienza a desplegarse a temperaturas de 75° C y a 90° C aun no está desplegada totalmente, por demás interesante resulta la evaluación del desplegamiento térmico de Bax oligomérica la cual es más estable y resiste temperaturas de 90° C.

3. Justificación

Dada la importancia de la actividad biológica de Bax y los procesos de regulación en los que se encuentra involucrada, es importante comprender las alteraciones e interacciones moleculares de Bax con la membrana externa mitocondrial. Se ha demostrado que Bax provoca la liberación de citocromo c en membranas lipídicas. Sin embargo, no existe un modelo preciso sobre la exposición, interacción y topología de las regiones involucradas entre Bax y las membranas lipídicas. Con el objetivo de elucidar un mecanismo detallado en una resolución atómica este trabajo realiza la descripción detallada de la participación de la proteína Bax al integrarse en una membrana lipídica por medio de la simulación con dinámica molecular. Además de obtener la proteína purificada para posteriores estudios biofísicos de su estabilidad.

4. Objetivo general

Expresar y purificar la proteína recombinante Bax humana, y construir un modelo molecular que describa de manera atómica la interacción de Bax con una membrana bilipídica.

Objetivos específicos

I.- Clonar la secuencia de ADN codificante de Bax en el vector de expresión pET28a.

II.- Expresar y purificar la proteína Bax recombinante.

III.- Proponer mediante un modelo de dinámica molecular las estructuras de interés que participan en la interacción de Bax con las membranas lipídicas.

IV.- Analizar por medio de DC y fluorescencia intrínseca del triptófano la estructura secundaria y terciaria, respectivamente, de Bax recombinante.

5. Material y métodos

5.1 Análisis bioquímicos y de biología molecular

Las enzimas de restricción fueron adquiridas de Fermentas y/o New England Biolabs (NEB), la enzima T4 DNA ligasa de NEB. El HEPES, Imidazol, MgCl₂, DTT y TEMED fueron adquiridos de Research Organics (Cleveland, OH). Todos los demás químicos utilizados fueron de las marcas Sigma-Aldrich (San Louis, MO, EUA) , Bio-rad (Richmond, CA, EUA) y JT Baker (Phillipsburg, NJ, EUA) a menos que se indique lo contrario. En todas las soluciones se utilizó agua desionizada (Milli Q system) y filtrada por una membrana de 0.45 µm (Millipore).

5.2 Amplificación por PCR de la secuencia de ADN codificante de Bax.

La secuencia de ADN codificante para la proteína Bax humana fue adquirida de Invitrogen (San Diego, CA) insertada en el vector de clonación pOTB7, contenido en la cepa bacteriana de *Escherichia coli* DH10B. El vector pOTB7 fue purificado utilizando el QIAprep Miniprep kit (QIAGEN) y la secuencia de Bax se amplificó por medio de la técnica de PCR estándar en un termociclador Mastercycler gradient (Eppendorf, Germany) utilizando oligonucleótidos específicos; en las secuencias de los oligonucleótidos se incluyeron sitios de restricción que reconocen las enzimas NdeI y EcoRI en el oligonucleótido sentido y antisentido respectivamente.

Secuencias de los oligonucleótidos (en negritas se señala la secuencia correspondiente a los sitios de restricción):

NDEI

Sentido: 5'-ATCG**CATATGG**ACGGGTCCGGGGA-3'

ECORI

Antisentido: 5'-GAGGG**GAATT**CCTAGCCCATCTTCTTCCAGAT-3'.

Las condiciones de amplificación de la PCR se muestran en la Tabla 1 (Anexo 1).

5.3 Clonación del ADN de Bax en el vector pET28-a

Los amplicones se digirieron con las enzimas NdeI y EcoRI, se desfosforilaron utilizando fosfatasa alcalina (NEB) y se purificaron utilizando el QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN). El proceso de desfosforilación y purificación se llevó a cabo dos veces. Posteriormente los amplicones se subclonaron entre los sitios de restricción NdeI y EcoRI del vector de expresión pET28a utilizando a la enzima T4 ligasa (NEB) y dejando toda la noche la reacción de ligación a 16 °C (Fig. 1). pET28a contiene una secuencia de nucleótidos que codifica para seis histidinas orientadas río arriba del sitio de policonación.

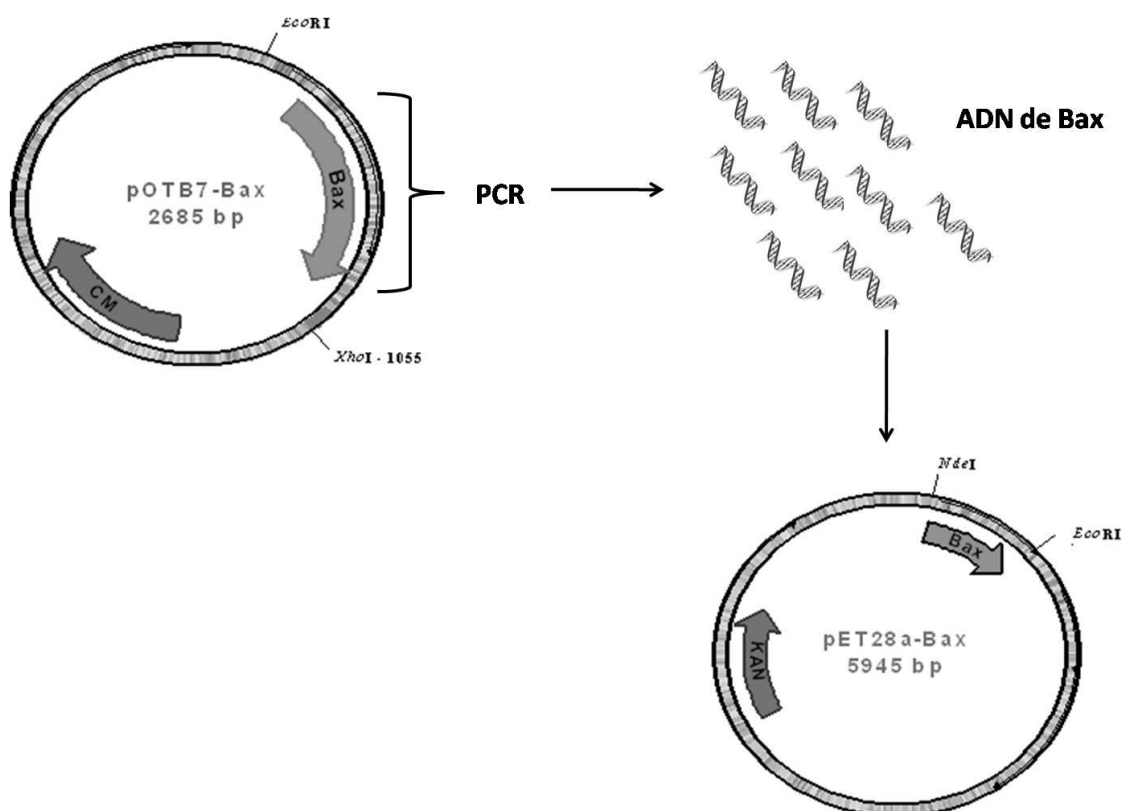


Figura 1. Representación esquemática de la amplificación por PCR de la secuencia de ADN codificante para la proteína Bax a partir del vector de clonación pOTB7. En el vector pOTB7 la secuencia de ADN correspondiente a Bax se encuentra entre los sitios de corte de las enzimas EcoRI y XhoI en el sentido 5' a 3', utilizando oligonucleótidos específicos que hibridan con la secuencia de ADN de Bax se realizó una PCR (véase anexo 1, tabla 1) para amplificar dicha secuencia; los amplicones fueron digeridos con las enzimas NdeI y EcoRI y se ligaron al vector de clonación pET28a digerido previamente con las mismas enzimas de restricción obteniendo la construcción pET28a-Bax.

Se transformó la reacción de ligación en bacterias competentes de *E. coli* DH5 α y se sembraron en una placa de LB (Luria Bertani)- agar con kanamicina (0.03 mg mL⁻¹) y se dejaron crecer durante 16 horas. Posteriormente se purificó el ADN plasmídico utilizando el detergente CTAB (bromuro de hexadeciltrimetilamonio) siguiendo el protocolo propuesto por Del sal et al. 1988. Una vez purificado el plásmido se confirmó la construcción (pET28a-Bax) por medio de digestión enzimática (Fig. 5), PCR (Fig. 6) y secuenciación.

5.4 Inducción de la expresión de Bax

La construcción se transformó en células competentes de la línea celular BL21(DE3)pLysS de *E. coli* y se seleccionaron las células resistentes a kanamicina. A partir de una colonia de *E. coli* con la construcción de interés se realizó un precultivo en 5 mL de medio LB con kanamicina durante 16 horas, el precultivo fue transferido a 1000 mL de medio 2-YT y se dejó crecer el cultivo celular hasta alcanzar una densidad óptica de 0.6 nm ($A_{600}= 0.6$) a 37 °C. Una vez alcanzada la densidad óptica deseada se indujo la sobreexpresión de Bax añadiendo IPTG (Isopropil $-\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido) a una concentración de 1 mM. Se tomaron alícuotas de 1 mL cada hora durante 5 horas y una más al día siguiente para determinar el tiempo de mayor sobreexpresión de la proteína, las muestras fueron analizadas por medio de SDS-PAGE (16%) (Fig. 8) utilizando una cámara de electroforesis Mini-PROTEAN (Bio-Rad), y tiñendo los geles con azul de Coomassie G-250. Una vez determinado el mejor tiempo de sobreexpresión (más de 16 horas) se colectaron las bacterias por centrifugación a 5000 rpm durante 25 min a 4 °C a partir de 250 mL del cultivo y se mantuvieron a -70 °C hasta su uso.

5.5 Extracción de proteínas totales

Las bacterias se resuspendieron en solución de lisis (100 mM HEPES-NaOH pH 8.0, 1 mM PMSF, 5 mM 2-Mercaptoetanol, 300 mM NaCl, 1 mM MgCl₂) utilizando vortex, posteriormente se agregó 0.1 mg/mL de lisozima y se dejaron en agitación

durante 20 min a 4 °C. Las células se lisaron mediante 6 ciclos de congelamiento/descongelamiento y se centrifugaron a 13000 rpm durante 30 min a 4 °C. Se recuperó el sobrenadante (extracto crudo) con la proteína recombinante y se añadió polietilenimina (0.01% v/v), dejando en agitación 20 min a 4 °C seguido de centrifugación a 13000 rpm durante 30 min a 4 °C.

5.6 Salting out

Con el fin de eliminar proteínas contaminantes por medio de precipitación, al extracto crudo se le agregaron lentamente concentraciones crecientes de sulfato de amonio granular, este procedimiento fue realizado en agitación a 4 °C hasta alcanzar una saturación del 40%, éste se mantuvo en agitación a 4 °C durante 30 min y se centrifugó a 13000 rpm durante 30 min a 4 °C.

5.7 Purificación de la proteína recombinante Bax

La purificación de la proteína recombinante Bax se realizó en dos pasos. El primero, mediante cromatografía por interacción hidrofóbica en un cromatógrafo de baja presión (Biologic HR Workstation, Bio-Rad) y su análisis mediante el software Biologic HR, Bio-Rad. El segundo, utilizando cromatografía de afinidad a flujo por gravedad.

5.8 Cromatografía de interacción hidrofóbica

Se recuperó el sobrenadante y se filtró a través de una membrana de 0.5 µm; posteriormente se aplicó por una columna de fenil-sefarosa (Amersham Biosciences) en una relación ($V_{\text{columna}}: V_{\text{muestra}}$; 1: 20), previamente equilibrada con solución amortiguadora de unión (100 mM HEPES-NaOH pH 8.0, 5 mM 2-Mercaptoetanol, 300 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 1.7 M sulfato de amonio). La columna se lavó con 20 mL de solución amortiguadora de unión, y se eluyó con 100 mL de solución de elución (25 mM HEPES-NaOH pH 8.0, 50 mM NaCl, 0.2 mM DTT, 40% etilenglicol) en un gradiente lineal de 100% solución de unión a 100% solución de elución, seguido de una elución con 20 mL con ésta última. El flujo programado

fue de 1 mL/min durante todo el proceso y se colectaron 28 fracciones de 5 mL cada una; todas las fracciones fueron analizadas mediante SDS-PAGE, 16% (Fig. 10) Las fracciones que contenían a la proteína Bax fueron dializadas contra la solución de almacenamiento (25 mM HEPES-NaOH pH 8.0, 300 mM NaCl, 0.2 mM DTT).

5.9 Cromatografía de Afinidad

Una vez dializadas las muestras obtenidas del paso anterior de purificación, se aplicaron a una columna de Ni-agarosa (Qiagen) previamente equilibrada con solución amortiguadora de unión (25 mM HEPES-NaOH pH 8.0, 300 mM NaCl, 0.2 mM DTT, 1.5 mM Imidazol) en una relación ($V_{\text{columna}}: V_{\text{muestra}}$; 1: 5) y se dejó interactuar por 5 min en agitación suave y continua; éste paso fue repetido 3 veces debido al volumen de la muestra (aprox. 15 mL). Se realizó una serie de lavados con 10 volúmenes de columna con solución de lavado I (25 mM HEPES-NaOH pH 8.0, 300 mM NaCl, 0.2 mM DTT, 2 mM Imidazol); 10 volúmenes de solución de lavado II (25 mM HEPES-NaOH pH 8.0, 300 mM NaCl, 0.2 mM DTT, 3 mM Imidazol); 10 volúmenes de solución de elución III (25 mM HEPES-NaOH pH 8.0, 300 mM NaCl, 0.2 mM DTT, 4 mM Imidazol); finalmente se lavó la columna con 10 volúmenes de solución de elución IV (25 mM HEPES-NaOH pH 8.0, 300 mM NaCl, 0.2 mM DTT, 45 mM Imidazol). Se colectaron fracciones de 1 mL para los primeros 5 volúmenes de columna de cada lavado y eluido y una fracción de 5 mL para los 5 volúmenes restantes. Todas las fracciones fueron analizadas mediante SDS-PAGE, 16% (Fig. 11). Las fracciones que contenían a la proteína Bax fueron dializadas contra 25 mM HEPES-NaOH pH 7.5, 50 mM NaCl, 0.2 mM DTT y almacenadas a 4 °C ó -80 °C.

5.10 Dinámica molecular

El procesamiento de la dinámica molecular (DM) se llevó a cabo en el servidor de la ENMyH (IP 148.204.10.139) utilizando dos nodos cada uno con 8 procesadores, mediante el paquete GROMACS (GRoningen MACHine for CHEmical Simulations) v.4.0.4. La configuración inicial de Bax (estructura 3D) y sus coordenadas atómicas se tomaron en base a la estructura obtenida por

resonancia magnética nuclear (RMN) (Suzuki et al. 2000) depositadas en el Protein Data Bank (PDB), cuyo número de entrada es 1F16. Se diseñó un modelo de membrana biológica utilizando las coordenadas atómicas del fosfolípido dipalmitilfosfatidilcolina (DPPC) siguiendo el tutorial (KALP15 in DPPC, establecido por Lemkul J.) disponible en:

http://www.bevanlab.biochem.vt.edu/Pages/Personal/justin/gmxtutorials/membrane_protein/index.html

Se obtuvieron las coordenadas atómicas de la membrana de DPPCs (128 moléculas), la topología de los lípidos y sus parámetros del campo de fuerzas en http://moose.bio.ucalgary.ca/index.php?page=Structures_and_Topologies.

Se estableció el campo de fuerzas a utilizar para Bax y la membrana de DPPCs, OPLS-AA (Potenciales optimizados para la simulación de líquidos-todos los átomos) (Jorgensen et al. 1996) y Berger lipids (Berger et al. 1997), respectivamente) por lo tanto, en este último se incluyeron parámetros con la nomenclatura del campo de fuerza OPLS-AA. Bax se orientó en el centro de la membrana, se empaquetaron los lípidos alrededor de la proteína concatenando el archivo de la proteína y la membrana en un solo sistema y se realizaron 24 minimizaciones de energía hasta alcanzar un área por lípido de $\sim 71 \text{ \AA}^2$ (cerca de los valores experimentales), después de las minimizaciones quedaron un total de 123 moléculas de DPPC. Se añadió agua como solvente (3646 moléculas) evitando que moléculas de H_2O quedaran dentro de la región hidrofóbica de la membrana y se delimitó el sistema dentro de una caja tridimensional. Posteriormente el sistema se equilibró electrostáticamente añadiendo tres moléculas de sodio (Na) de manera aleatoria para neutralizar la carga del sistema, y se realizó una minimización de energía para verificar que todos los componentes del sistema convergieran y se confirmara que la temperatura y presión eran estables (323 K y 1 Bar, respectivamente). Se realizó la dinámica molecular del sistema completo que consta de 3773 moléculas (20068 átomos) a temperatura y presión constante durante 10 ns. Por último se realizaron los análisis para validar el sistema que incluyen:

- Parámetros del orden del deuterio de las cadenas acilo
- Densidad de la membrana

- RMSD (desviación cuadrática media)
- RMSF (fluctuación cuadrática media)
- Análisis de estructura secundaria

En los anexos 2, 3 y 4 se encuentra una breve explicación de los comandos más significativos utilizados durante la dinámica molecular en GROMACS, los parámetros de la minimización de energía y los parámetros de la simulación de dinámica molecular durante los 10 ns, respectivamente.

5.11 Espectro UV-Vis

Los espectros de UV-Vis se determinaron usando un espectrofotómetro (BECKMAN DU-600) registrando la absorbancia de la muestra en un intervalo de 220 nm a 400 nm en una celda de cuarzo 1 cm de recorrido óptico. La concentración de proteína se evaluó en solución amortiguadora (25 mM HEPES-NaOH pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.2 mM DTT) dividiendo la absorbancia a 280 nm entre el coeficiente de absorción reportado (<http://www.signaling-gateway.org/>) y sustituyendo los valores en la siguiente fórmula:

$$A_{280} = \epsilon c l$$

donde: A_{280} es la absorción a 280 nm
 ϵ es el coeficiente de absorción ($\epsilon = 1.7$)
 c es la concentración en mg/mL
 l es el recorrido óptico de la celda en cm

Las unidades (mg/mL) se convirtieron a $\mu\text{g mL}^{-1}$ dividiendo el valor obtenido entre el peso molecular (21.395 kDa) y multiplicando por 1000.

5.12 Espectro de dicroísmo circular

Los espectros de DC se realizaron en un espectropolarímetro (JASCO J-815), equipado con un Peltier para el control de temperatura utilizando una celda de cuarzo de 1 cm de recorrido óptico. La muestra fue preparada diluyendo una solución “stock” (25 mM HEPES-NaOH pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.2 mM DTT) de Bax en solución amortiguadora de fosfato de sodio (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na₂HPO₄, 1.47 mM KH₂PO₄) en una proporción 1:2. La concentración de proteína utilizada fue de 13.67 µg mL⁻¹, los barridos se realizaron de 250 a 210 nm por triplicado y los resultados se promediaron. Los resultados fueron expresados como elipticidad molar por residuo [θ_{MRW}].

5.13 Espectro de emisión de fluorescencia

Las mediciones de los espectros de emisión de fluorescencia se realizaron en un espectrofluorómetro (Perkin Elmer LS-55) equipado con un portaceldas con camisa y un baño de circulación de agua para control de temperatura (25 °C), utilizando una celda de cuarzo de 1 cm de recorrido óptico. La emisión se analizó en un intervalo de 300 a 400 nm excitando a una longitud de onda de 280 nm. La muestra fue preparada diluyendo una solución “stock” (25 mM HEPES-NaOH pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.2 mM DTT) de Bax en solución amortiguadora de fosfato de sodio (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na₂HPO₄, 1.47 mM KH₂PO₄) en una proporción 1:2. La concentración de la proteína utilizada fue de 13.67 µg mL⁻¹; los espectros se obtuvieron por duplicado, se promediaron y se normalizaron a 1 utilizando el software OriginPro 8 (OriginLab Corporation).

6. Resultados

6.1 Obtención y análisis de ADN plasmídico pOTB7

Se verificó la presencia e integridad del ADN purificado a partir de células de *E. coli* DH10B por electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio, así como la linearización del plásmido al cortar con la enzima *EcoRI*, *XhoI*, o con ambas para observar la liberación del inserto correspondiente al ADN de Bax (Fig. 2)

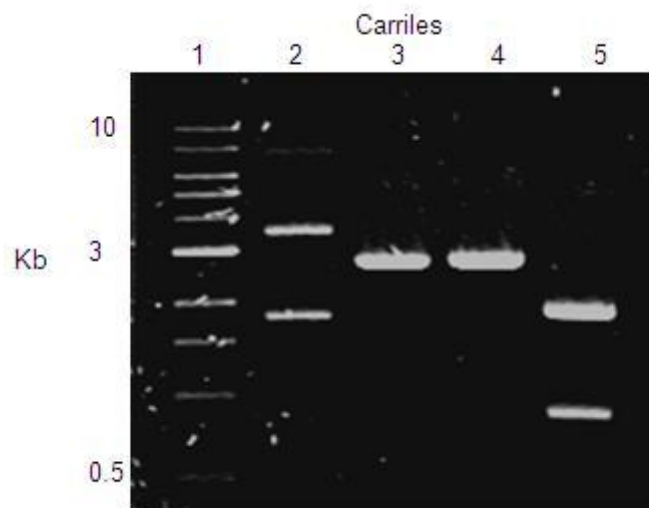


Figura 2. Análisis de la purificación del plásmido pOTB7 con la secuencia de Bax. Carril 1, marcador de tamaño molecular de 1 Kb; carril 2, ADN purificado; carril 3, digestión del ADN con la enzima de restricción *EcoRI*; carril 4, digestión del ADN con la enzima de restricción *XhoI*; carril 5, digestión de ADN con las enzimas de restricción *EcoRI* y *XhoI* (se observa la liberación de un fragmento aproximadamente de 0.9 Kb).

Se confirmó por secuenciación automática que la secuencia de nucleótidos dentro del vector pOTB7 correspondiera a la secuencia de ADN que codifica para la proteína BAX. A continuación se reporta el resultado de la secuencia en formato fasta:

```

>BAX_pOTB7_Fw_
CCTGAACTAGTAAGGCGGGGGCCACCAGCTCTGAGCAGATCATGAGACA
GGGGCCCTTTTGTTCAGGGTTTCATCCAGGATCGAGCAGGGCGAATGGG
GGGGGAGGCACCCGAGCTGGCCCTGGACCCGGTGCCTCAGGATGCGTCCA
CCAAGAAGCTGAGCGAGTGTCTCAAGCGCATCGGGGACGAACTGGACAGT
AACATGGAGCTGCAGAGGATGATTGCCGCCGTGGACACAGACTCCCCCG
AGAGGTCTTTTTCCGAGTGGCAGCTGACATGTTTTCTGACGGCAACTTCA
ACTGGGGCCGGGTTGTGCGCCCTTTTCTACTTTGCCAGCAAACCTGGTGCTC
AAGGCCCTGTGCACCAAGGTGCCGGAACATGATCAGAACCATCATGGGGCT
GGGACATTGGGACTTCCTCCGGGAGCGGCTGTTGGGGCTGGGATCCAAGA
CCACGGGGGGTTTGGGGACGGGCCTCCCTCTCCTACTATTGGGGACGCC
ACAGGGGCGCACCGTGACAATTTTTTGGTGGGGGGAGTGGTGAACGCC
CCACTC

```

Mediante la búsqueda de homología utilizando la herramienta blastn se determina que la secuencia corresponde a la secuencia reportada para la proteína Bax humana (Fig. 3)

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
Transcripts							
NM_138761.3	Homo sapiens BCL2-associated X protein (BAX), transcript variant alpha	824	824	97%	0.0	94%	U E G M
NM_004324.3	Homo sapiens BCL2-associated X protein (BAX), transcript variant beta	778	778	81%	0.0	97%	U E G M
NM_138765.3	Homo sapiens BCL2-associated X protein (BAX), transcript variant sigma	778	778	80%	0.0	98%	G M
NM_138764.3	Homo sapiens BCL2-associated X protein (BAX), transcript variant epsilon	625	833	97%	9e-177	99%	G M
NM_138763.3	Homo sapiens BCL2-associated X protein (BAX), transcript variant delta	460	460	62%	3e-127	91%	U E G M
Genomic sequences [show first]							
NT_011109.16	Homo sapiens chromosome 19 genomic contig, GRCh37 reference primary assembly	276	695	71%	1e-71	100%	
NW_001838497.2	Homo sapiens chromosome 19 genomic contig, alternate assembly (b)	276	695	71%	1e-71	100%	

Figura 3. Análisis del alineamiento obtenido utilizando la herramienta blastn. La secuencia templado tiene una identidad del 100% con secuencias reportadas para la especie *Homo sapiens* y el porcentaje de identidad en el caso de los transcritos es del 91 al 99% para la misma especie.

6.2 Estandarización de la reacción de PCR a partir del vector pOTB7 para la amplificación de la secuencia correspondiente a Bax

La reacción de PCR se estandarizó utilizando un gradiente de temperatura de 10 °C para el alineamiento de los oligonucleótidos a partir de una temperatura de 65 °C, obteniendo una amplificación específica y en mayor rendimiento a una temperatura de 60 °C, el resultado se analizó por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1% (Fig. 4)

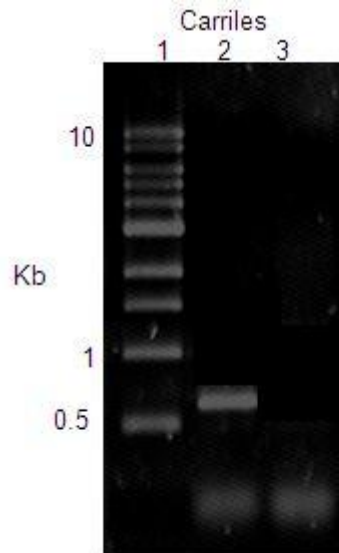


Figura 4. Amplificación por PCR del ADN que codifica para la proteína Bax a partir del vector pOTB7. Carril 1, marcadores de tamaño molecular 1 Kb; carril 2, producto amplificado de 584 pares de bases; carril 3, control negativo utilizando el plásmido pET28a.

6.3 Clonación en el vector de expresión pET28a y su confirmación por digestión enzimática y PCR

Una vez estandarizada al amplificación del ADNc de Bax, se realizó la reacción de ligación y ésta se transformó (ver materiales y métodos) obteniendo alrededor de 20 colonias, se purificó el ADN plasmídico de 12 de ellas y se analizó por digestión enzimática y PCR mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% (Fig. 5 y 6, respectivamente) para determinar en cual de ellas se encontraba la construcción pET28a-Bax.

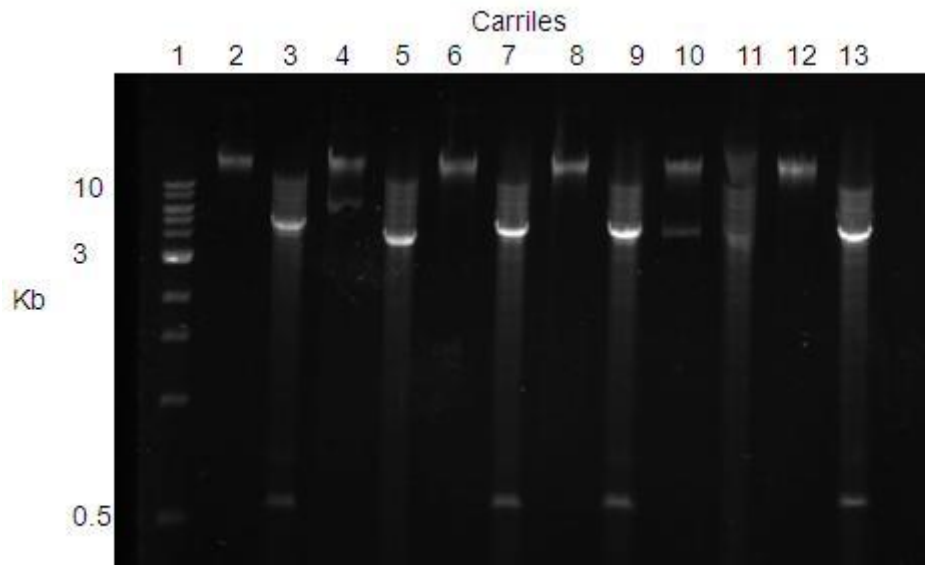


Figura 5. Análisis por digestión enzimática del plásmido pET28a-Bax proveniente de 12 distintas colonias (se muestran 6) Carril 1, marcadores de tamaño molecular 1 Kb; en los carriles pares se muestra el plásmido sin digerir; en los carriles nones se observan plásmidos digeridos con las enzimas *NdeI* y *EcoRI*; los carriles 3, 7, 9 y 13 muestran un fragmento liberado (aproximadamente 0.6 Kb) de que corresponde a la secuencia de nucleótidos de Bax.

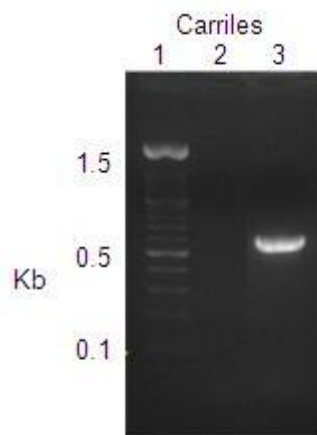


Figura 6. Amplificación por PCR de la secuencia de interés a partir del plásmido pET28a-Bax. Carril 1, marcadores de tamaño molecular; carril 2, control negativo utilizando el plásmido pET28a; carril 3, producto amplificado de tamaño aproximado de 0.6 Kb correspondiente a Bax.

Por último se corroboró mediante secuenciación automática que en el plásmido pET28a-Bax se encontrara la secuencia de nucleótidos correspondiente a Bax y que estuviera en el marco de lectura adecuado. A continuación se reporta el resultado de la secuencia en formato fasta:

```
>BAX_pET28a_Fw_
NNNNGTGAGCGGATACATTCCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAA
GAAGGAGATATAACCATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCATCACAGCAGC
GGCCTGGTGCCGCGCGGCAGCCATATGGACGGGTCCGGGGAGCAGCCCAG
AGGCGGGGGGCCACCAGCTCTGAGCAGATCATGAAGACAGGGGCCCTTT
TGCTTCAGGGTTTCATCCAGGATCGAGCAGGGCGAATGGGGGGGAGGCA
CCCAGCTGGCCCTGGACCCGGTGCCTCAGGATGCGTCCACCAAGAAGCT
GAGCGAGTGTCTCAAGCGCATCGGGGACGAACTGGACAGTAACATGGAGC
TGCAGAGGATGATTGCCGCCGTGGACACAGACTCCCCCGAGAGGTCTTT
TTCCGAGTGGCAGCTGACATGTTTTCTGACGGCAACCTCAACTGGGGCCG
GGTTGTGCGCCCTTTTCTACTTTGCCAGCAAAGTGGTGTCAAGGCCCTGT
GCACCAAGGTGCCGGAAGTATCAGAACCATCATGGGCTGGACATTGGAC
TTCTCCGGGAGCGGCTGTTGGGCTGGATCCAAGACCANGGTGGTTGGGA
CGGCCTCCTCTCTACTTTGGGACGCCCACGTGGCANNCCGTGACCATCTT
TTGTGGCGGGANTGCTCCCGCCTCCNTCACCATCTGGAAGAAGATGGGCT
AGGAATNNGGCTCCNTCNAAAAGCANNNGGCNNACTCNANAC
```

Utilizando la herramienta TRANSLATE (<http://expasy.org/tools/dna.html>) se tradujo la secuencia de nucleótidos a una secuencia de aminoácidos. Al realizar un alineamiento de la secuencia de aminoácidos reportada para Bax (Suzuki et al. 2000) con la secuencia obtenida, se confirma que la proteína tiene un 100% de identidad en comparación con la reportada y se encuentra en el marco de lectura correcto (Fig.7).

```
100.0% identity in 170 aa overlap (1-170:1-170); score: 1160 E(10000): 3.3e-110
      10      20      30      40      50      60
Bax   MDGSGEQPRGGGPTSSEQIMKTGALLLQGFIQDRAGRMGGEAPELALDPVPQDASTKKLS
      .....
Baxrec MDGSGEQPRGGGPTSSEQIMKTGALLLQGFIQDRAGRMGGEAPELALDPVPQDASTKKLS
      10      20      30      40      50      60

      70      80      90      100     110     120
Bax   ECLKRIGDELDSNMELQRMIAAVDTDSPREVFFRVAADMFS DGNFNWGRVVALFYFASKL
      .....
Baxrec ECLKRIGDELDSNMELQRMIAAVDTDSPREVFFRVAADMFS DGNFNWGRVVALFYFASKL
      70      80      90      100     110     120

      130     140     150     160     170
Bax   VLKALCTKVP ELIRTIMGWTLDFLRERLLGWIQDQGGWDGLLSYFGTPTW
      .....
Baxrec VLKALCTKVP ELIRTIMGWTLDFLRERLLGWIQDQGGWDGLLSYFGTPTW
      130     140     150     160     170
```

Figura 7. Análisis del alineamiento obtenido después de traducir la secuencia de nucleótidos resultante de la secuenciación y utilizar la herramienta blastp desde la página www.expasy.org. Se muestra que la secuencia de aminoácidos de la proteína es idéntica a la proteína Bax de humano previamente reportada.

6.4 Sobreexpresión de la proteína recombinante Bax

Al confirmarse la construcción pET28a-Bax ésta se transformó a una cepa de expresión más adecuada (BL21(DE3)pLysS); y se agregó IPTG para inducir la expresión de la proteína recombinante. Se realizó una cinética de expresión de proteínas totales a distintos tiempos determinando mediante SDS-PAGE al 16% que el mayor rendimiento de proteína recombinante es a las 16 horas (Fig. 8).

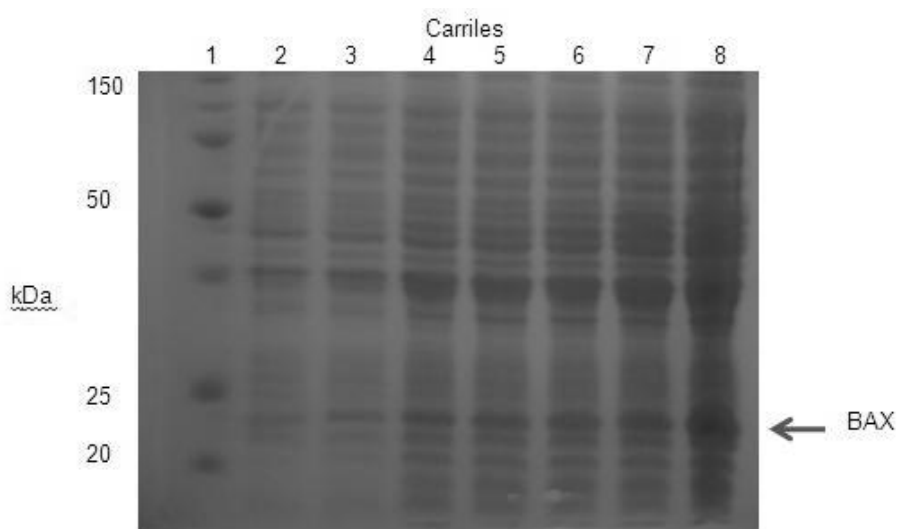


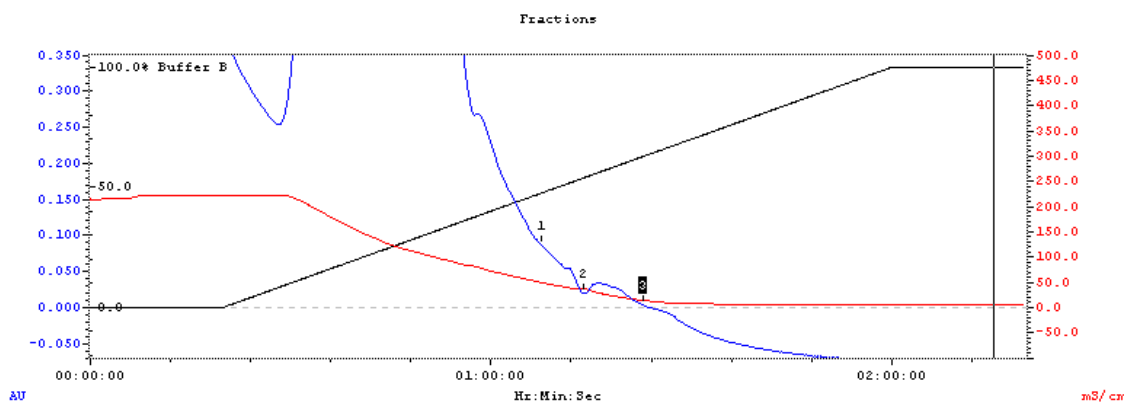
Figura 8. Sobreexpresión de la proteína Bax en la cepa *E. coli* BL21 (pLysS) analizada por SDS-PAGE. Carril 1, marcadores de masa molecular (Precision Plus Protein Standards, Bio-Rad); carril 2, extractos de proteínas totales antes de inducir con IPTG; carriles 3, 4, 5, 6, 7 y 8 extractos de proteínas totales después de la inducción con IPTG a 1, 2, 3, 4, 5 y 16 horas respectivamente.

6.5 Purificación de la proteína recombinante Bax

Como un paso previo a la purificación de Bax por cromatografía por interacción hidrofóbica se precipitaron algunas proteínas saturando la solución donde se lisaron las células con 40% de sulfato de amonio. Para determinar el porcentaje de saturación adecuado previamente se realizó una cinética del extracto total de proteínas desde 0 a 100 % de saturación (datos no mostrados).

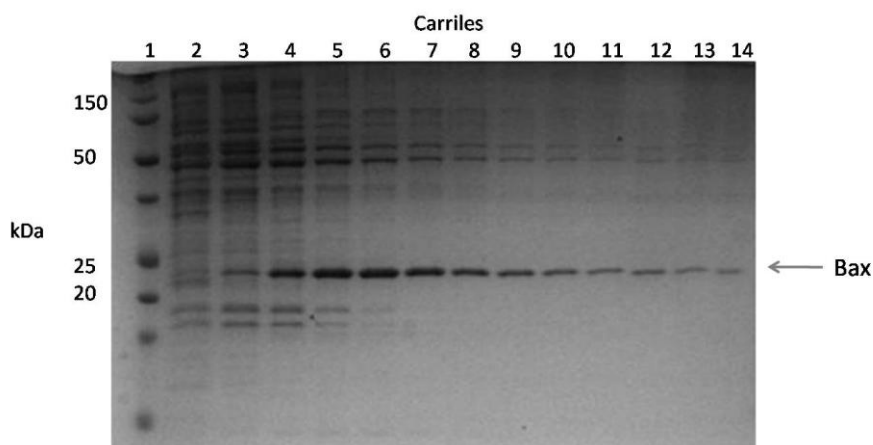
6.6 Cromatografía por interacción hidrofóbica

El cromatograma obtenido durante el desarrollo del programa de purificación por intercambio hidrofóbico muestra dos picos, uno de alta absorbancia y otro de baja absorbancia (Fig. 9).



6.7 Cromatografía de afinidad

Las fracciones obtenidas en la purificación por interacción hidrofóbica fueron analizadas mediante SDS-PAGE, 16% (Fig. 10)



Debido a que algunas de las fracciones provenientes de la purificación por interacción hidrofóbica presentaban demasiadas contaminantes i.e carriles 2-7, se agruparon las fracciones con menores contaminantes (carriles 8-14) (Fig. 10) y se purificaron por cromatografía de afinidad en una resina de Ni-agarosa. Las fracciones colectadas fueron analizadas y se determinó que la proteína de interés eluye a concentraciones muy bajas de imidazol (3mM) y que se encuentra en un estimado de pureza del 95% a juzgar basándose en la tinción por Azul de Coomassie de geles SDS-PAGE (Fig. 11).

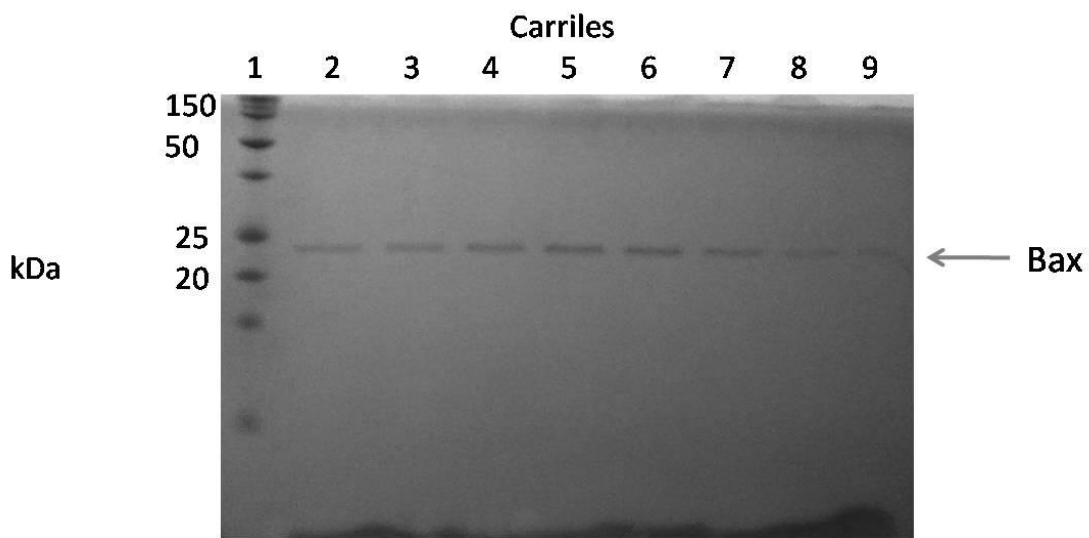


Figura 11. Análisis mediante SDS-PAGE de las fracciones recolectadas que contenían a Bax después de pasar por cromatografía de afinidad. Se observa a la proteína Bax de aproximadamente 23 kDa sin ningún contaminante. Carril 1, marcadores de masa molecular. Carriles 2-9, muestras de las fracciones de en donde se observa a la proteína Bax.

6.8 Dinámica molecular

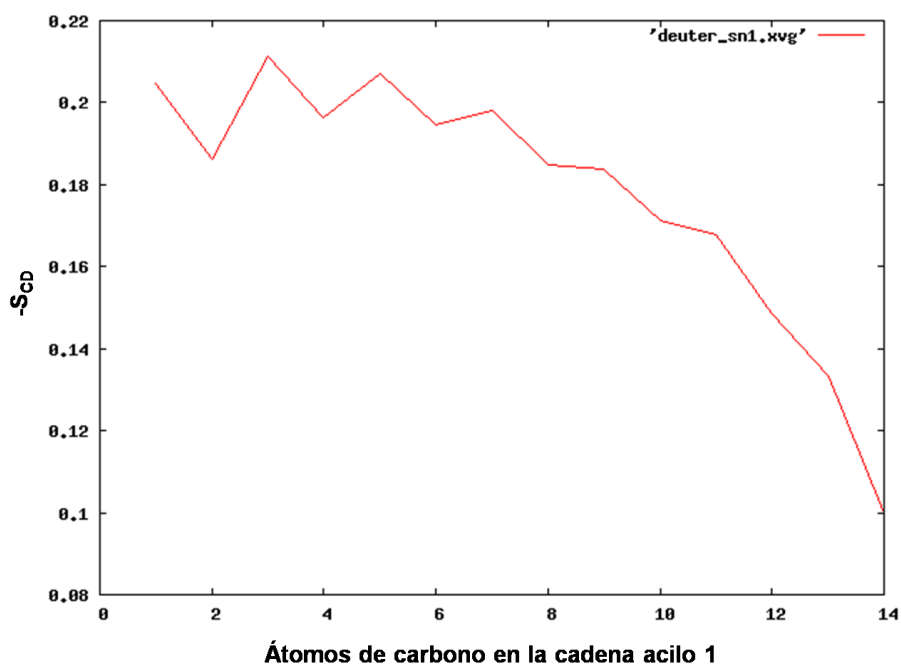
Se calcularon diversos parámetros que validan la construcción de la membrana lipídica y la simulación molecular. La figura 12 muestra los parámetros del orden del deuterio de las cadenas acilo (SCD), en los cuales se observa el orden de los segmentos (enlaces entre dos carbonos consecutivos) de ambas cadenas hidrocarbonadas; esto es, el parámetro del orden del segmento está relacionado a la amplitud estadística de los movimientos moleculares, y por lo tanto, a la conformación molecular promedio. Siendo así, el extremo de la cadena más cercana a la región hidrofílica se mueve menos, mientras que el otro extremo hay mayor movimiento. Este gráfico es obtenido, calculando la variación del ángulo formado por la el vector perpendicular a la membrana y los enlaces entre carbonos idealizados como segmentos de la cadena hidrocarbonada. El resultado es comparable con el generado experimentalmente en el estudio de membranas por RMN con deuterio, lo que valida que la membrana sea aceptable para su simulación. Siguiendo con los estudios de geometría de la bicapa se calculó la de las regiones polar e hidrofóbica las cuales revelan proporciones atómicas esperadas y un ancho de membrana de aproximadamente 6 nm (Fig. 13). En relación al comportamiento de la proteína Bax embebida en la bicapa de DPPC, se observa que el RMSD llegó al equilibrio aproximadamente a los 2 ns, y posteriormente no se observaron cambios significativos en este parámetro (Fig. 14A). En cuanto al estudio de movilidad de la proteína Bax se analizó el RMSF, el cual muestra una conducta más flexible en el extremo N-terminal y C-terminal, además de una alta movilidad de la Glicina 40 (Fig.14B). El análisis de estructura secundaria representa el comportamiento (pérdida o ganancia) de estructura a lo largo de la simulación (Fig. 15), en la cual se observa una ligera pérdida de estructura secundaria en la H α 9, a diferencia de las demás hélices que se presentan más estables.

Con fines prácticos para la presentación de los resultados gráficos de la simulación se presentan “snapshots” de la proteína sola a distintos tiempos de simulación, a saber, 0, 3, 6 y 9 ns. En los cuales no se aprecian cambios significativos de estructura terciaria de la proteína (Fig. 16). Sin embargo, para

caracterizar un poro formado por un monómero de Bax en una bicapa de DPPC, en la figura 17 se muestra la proteína embebida en la membrana a 0, 3, 6 y 9 ns de simulación. En la cual la H α 9 se encuentra en contacto con los lípidos y la H α 4 se encuentra en la región soluble cercana al eje del poro y cercana a la superficie del agua. Por otra parte, mostramos el sistema completo (Bax, DPPC y agua) para determinar si los dominios reportados como transmembranales o expuestos al solvente se confirmaban como tales a los 10 ns de la simulación (Fig. 18). En efecto las H α 5, H α 6 y H α 9 se presentan como transmembranales; la H α 4 se encuentra en la región soluble (expuesta al agua); la región correspondiente al dominio BH3 queda expuesto a la interface, posiblemente para interactuar con tBid u otro activador/inhibidor; la región en el extremo N-terminal (residuos 12 al 26) que puede ser reconocida por el anticuerpo 6A7 sólo cuando Bax se encuentra en su forma activa, se encuentra expuesta en nuestro modelo (Fig. 18). Por último, estructuralmente se puede apreciar un reordenamiento de los lípidos alrededor de la proteína, posiblemente el acomodo por la inserción de Bax da como resultado una curvatura en la membrana de DPPC la cual se ha reportado para Bax y otras proteínas de membrana.

6.8.1 Parámetros del orden del deuterio de las cadenas acilo (SCD)

A)



B)

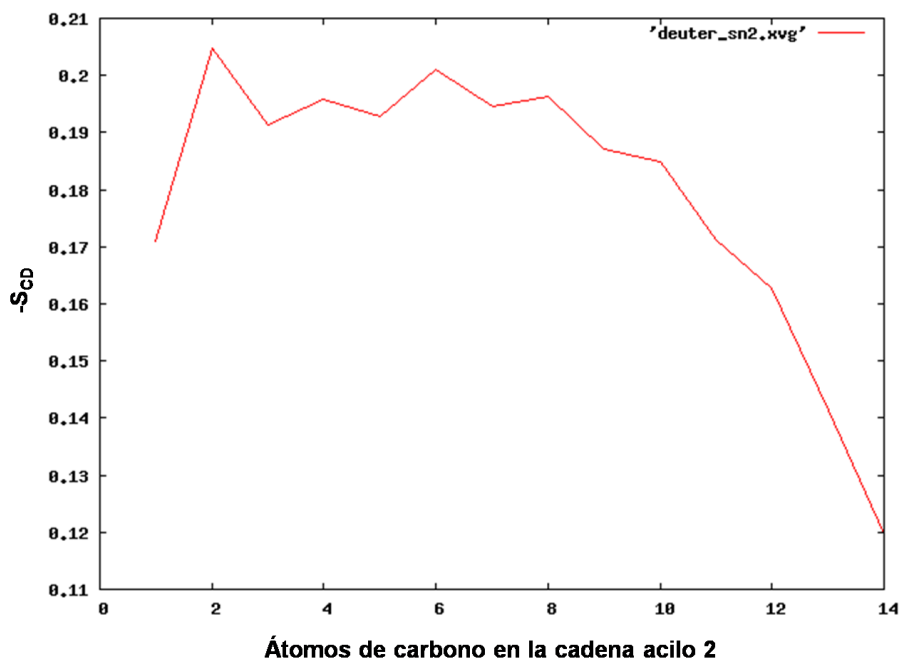
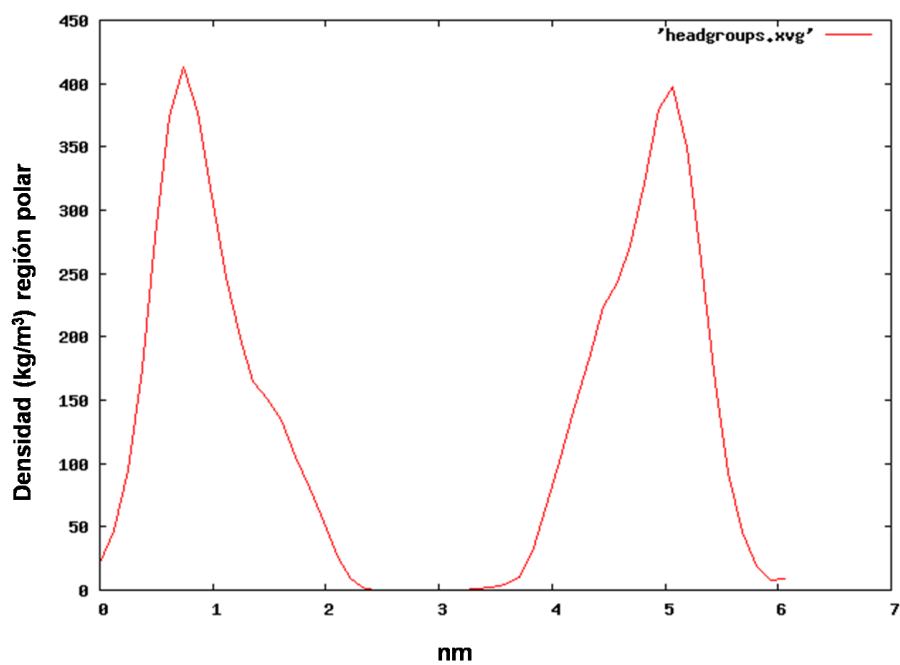


Figura 12. Parámetros de orden de las cadenas acilo. A) Cadena acilo 1. B) Cadena acilo 2

6.8.2 Densidad de la Membrana

A)



B)

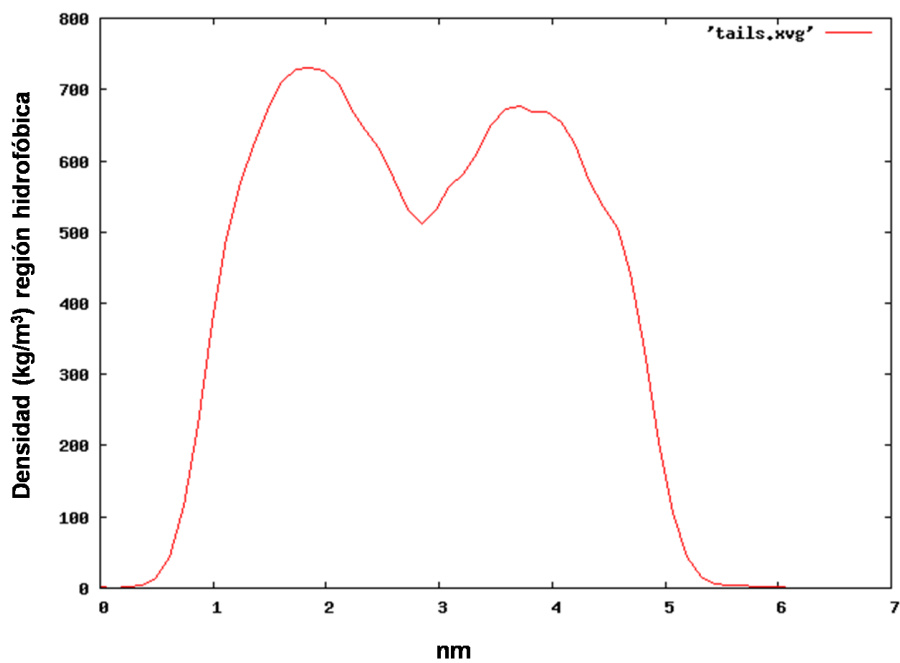
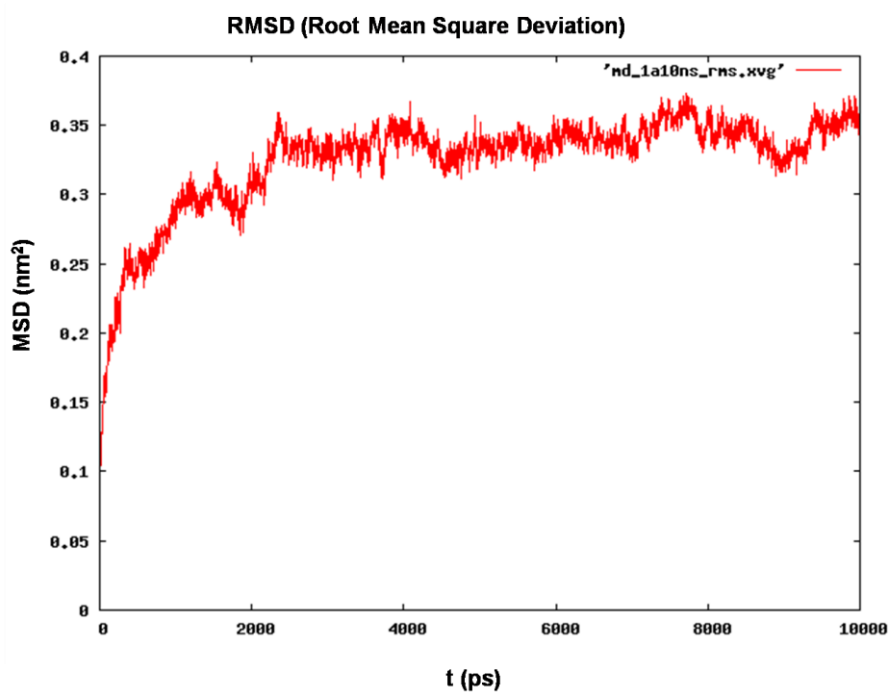


Figura 13. Densidad de la membrana lipídica. A) Densidad de las cabezas lipídicas. B) Densidad de las cadenas acilo.

6.8.3 RMSD y RMSF

A)



B)

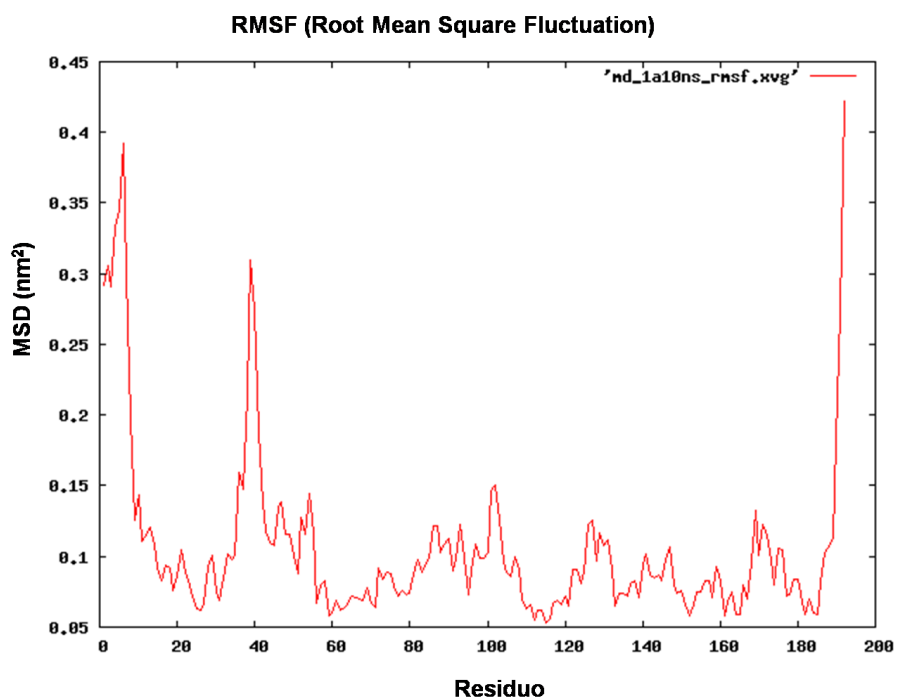
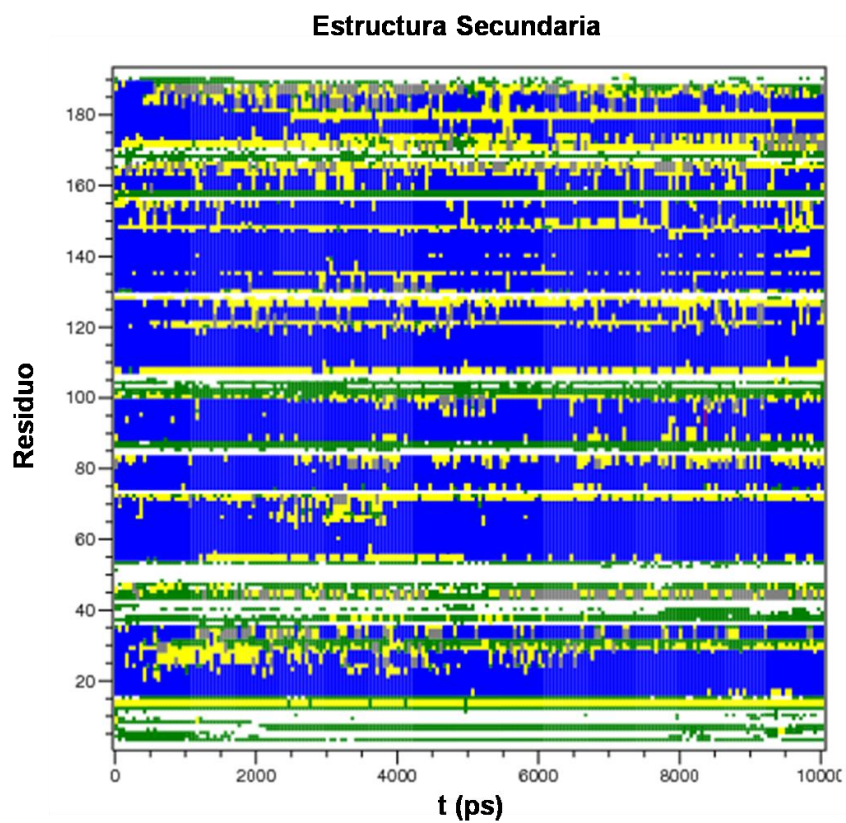


Figura 14. A) Desviación cuadrática media durante 10 ns. B) Fluctuación cuadrática media de los 192 aminoácidos correspondientes a la secuencia completa de Bax

6.8.4 Estructura Secundaria



○ loop ● curva ● giro ● hélice alfa ● hélice-3

Figura 15. Análisis de estructura secundaria.

6.8.5 Snapshots

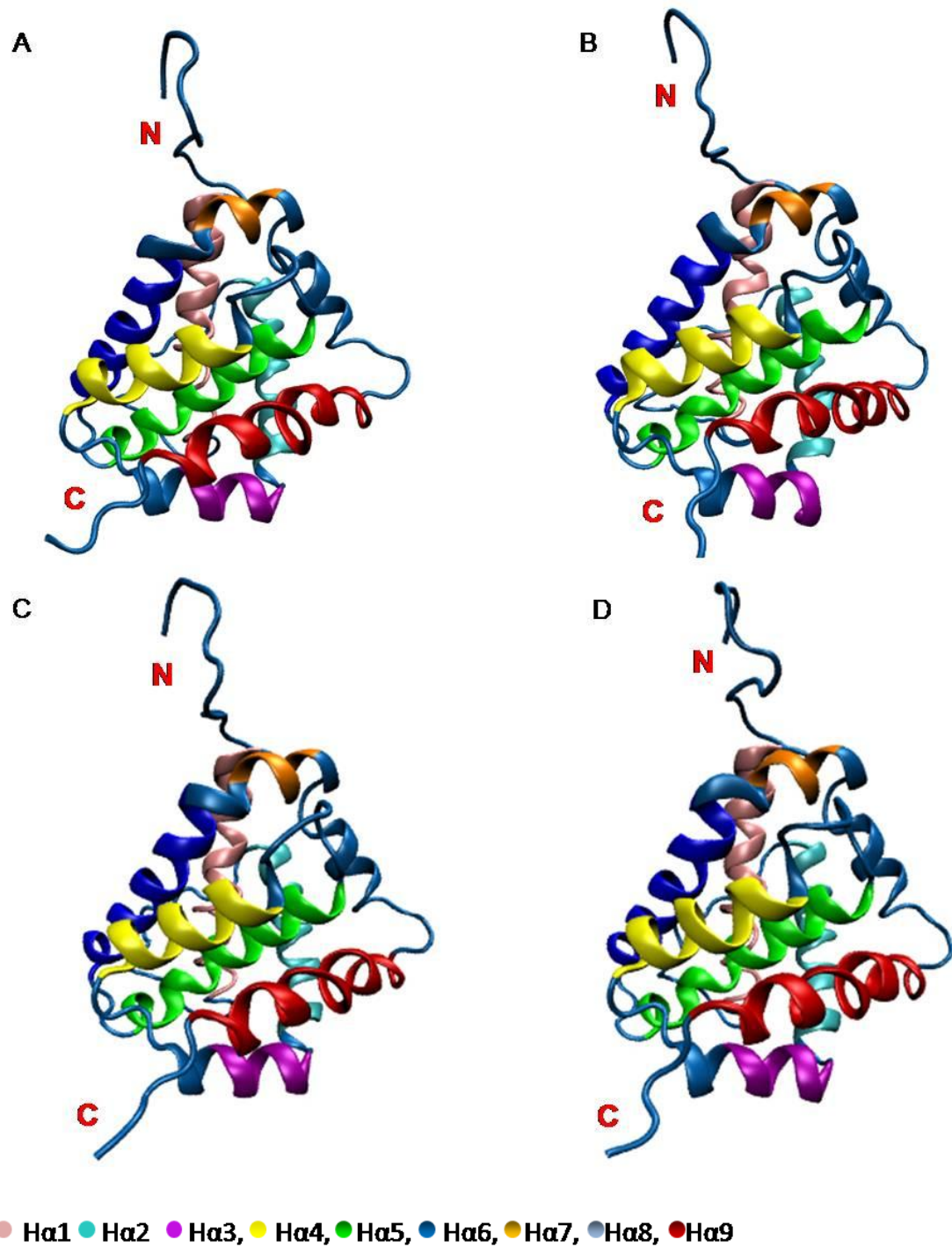


Figura 16. Snapshots de la estructura de Bax a distintos tiempos de simulación; la proteína se representa en listones. A) Configuración inicial 0 ps. B) Configuración a 3000 ps. C) Configuración a 6000 ps. D) Configuración a 9000 ps. N (extremo amino terminal). C (extremo carboxilo terminal).

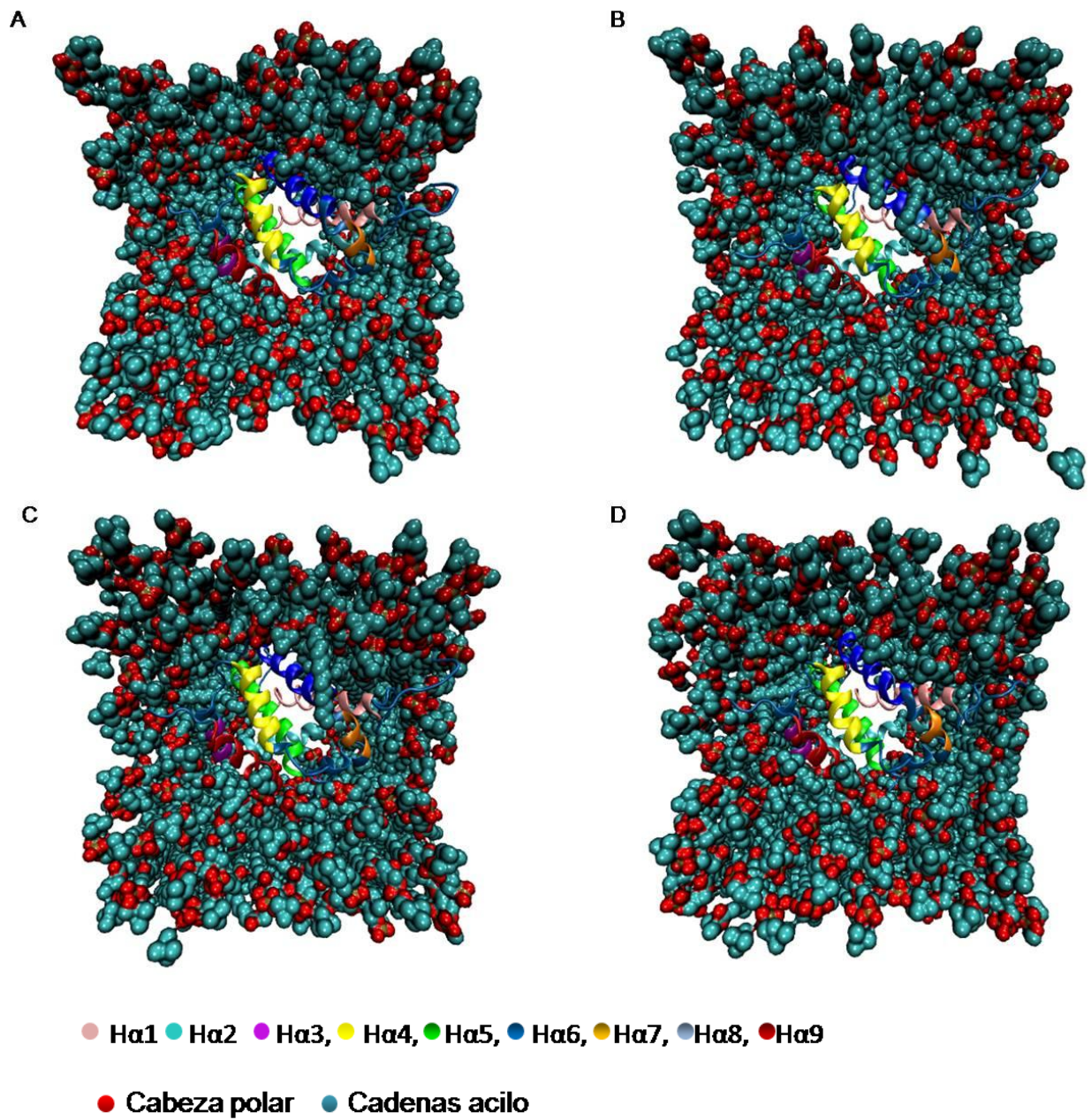


Figura 17. Snapshots de Bax embebida en la membrana de DPPC (vista superior). A) Configuración inicial 0 ps. B) Configuración a 3000 ps. C) Configuración a 6000 ps. D) Configuración a 9000 ps. La proteína se representa en listones y los lípidos en *Surf*.

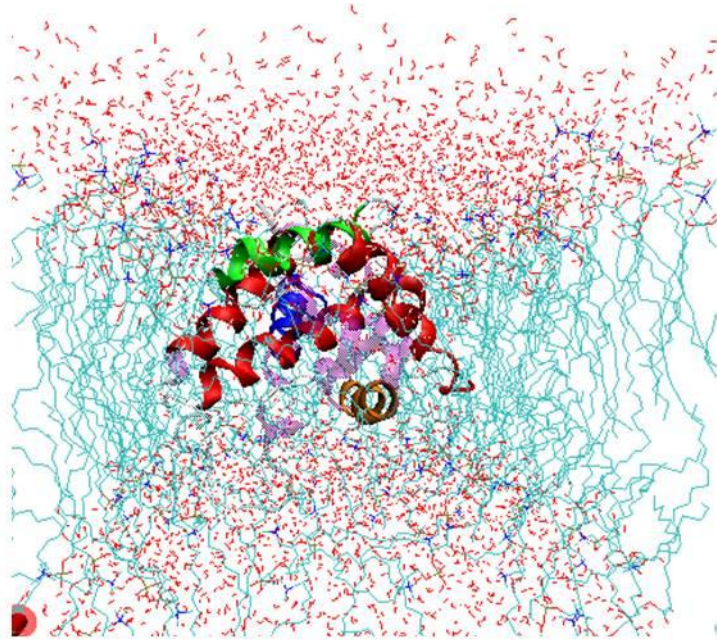
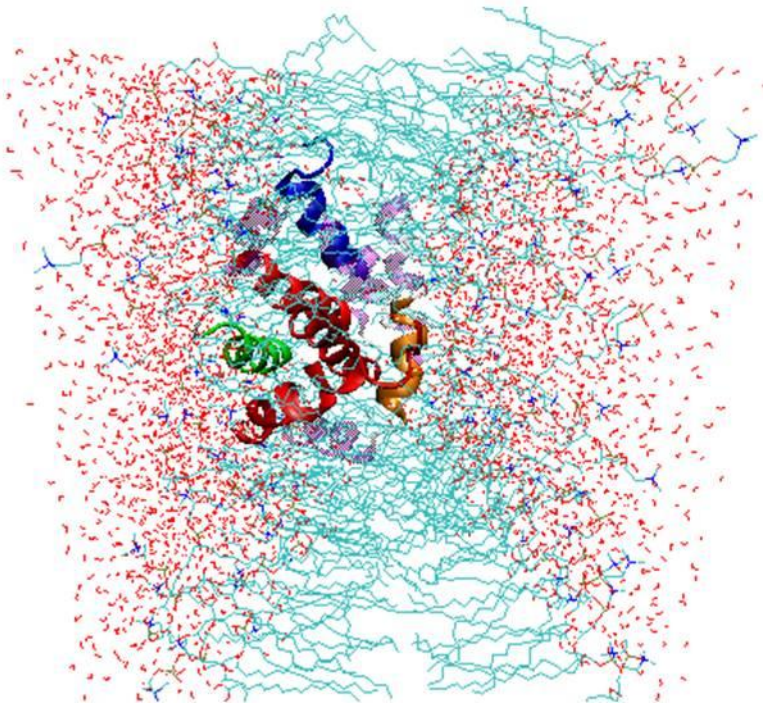
A**B**

Figura 18. Bax inserta en una membrana de 123 DPPCs solvatada en moléculas de agua. A) H α 4 (88-101) en la región soluble, verde; H α 5 (107-126), H α 6 (132-140), H α 9 (169-189) en la membrana, rojo. B) Anti-6A7 (12-26) expuesta, azul. BH3 (63-72) expuesto para conectar a tBid, anaranjado.

6.9 Espectro UV-Vis

Se obtuvo el espectro de UV-Vis de Bax recombinante en el que se observa un pico máximo de absorción a 280 nm (Fig. 19). El espectro reportado es característico de proteínas que contienen aminoácidos aromáticos en su estructura.

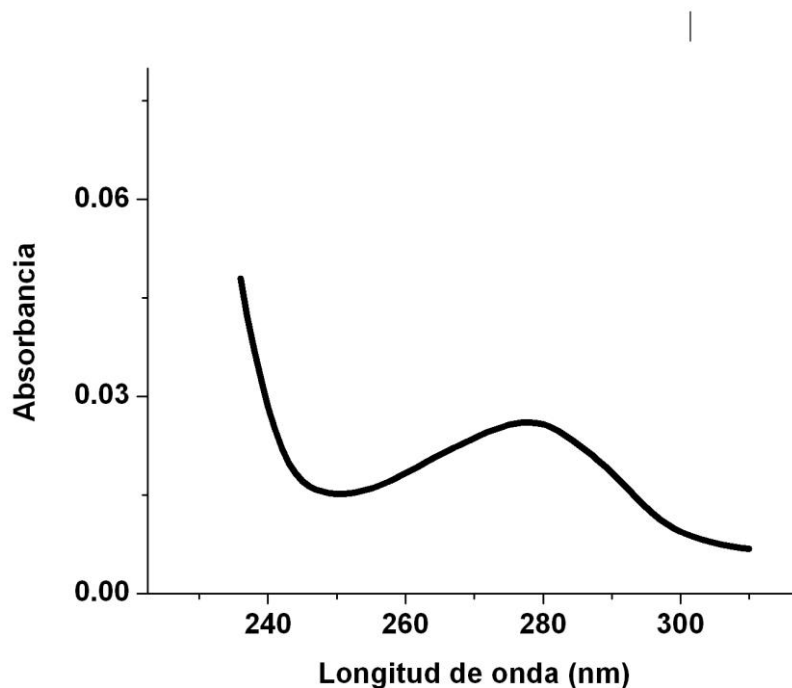


Figura 19. Espectro UV-Vis de Bax recombinante. Se obtuvieron los datos de absorbancia en un intervalo de longitud de onda de 200 a 400 nm. La figura sólo hace referencia al intervalo de 235 a 310 nm, observando la mayor absorbancia a 280 nm. La muestra analizada se encontraba disuelta en una dilución 1:2 de soluciones amortiguadoras 25 mM HEPES-NaOH pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.2 mM DTT y 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na₂HPO₄, 1.47 mM KH₂PO₄ pH 7.4, respectivamente.

6.10 Espectro de dicroísmo circular

Se comparó la estructura secundaria de Bax en su conformación de monómero con el espectro reportado por Bleicken y Zeth (2009). Se muestra que el espectro obtenido se asemeja al espectro reportado entre las longitudes de onda 247 a 210 nm y éste corresponde a un típico espectro de DC donde la proteína está estructurada solo por hélices alfa (Fig.20). En nuestro estudio la composición de la solución amortiguadora impidió registrar información de manera confiable a longitudes de onda menores a 210 nm debido a que la relación señal-ruido disminuía, por lo tanto, esos datos fueron eliminados.

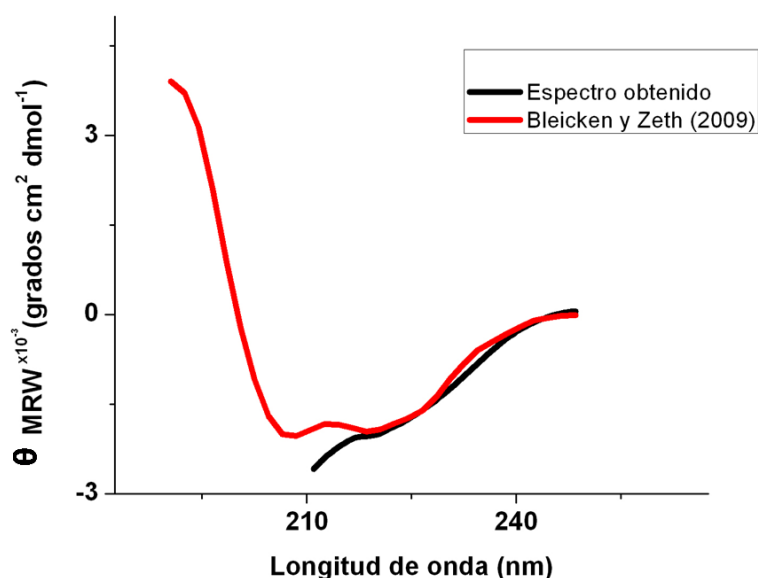


Figura 20. Espectro de DC obtenido de la proteína Bax monomérica ($13.67 \mu\text{g mL}^{-1}$) mediante la técnica de dicroísmo circular (negro) en comparación con un espectro de Bax monomérica reportada por Bleicken y Zeth (2009) (rojo). La muestra fue analizada en una dilución 1:2 de soluciones amortiguadoras 25 mM HEPES-NaOH pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.2 mM DTT y 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na_2HPO_4 , 1.47 mM KH_2PO_4 pH 7.4, respectivamente.

6.11 Espectro de Fluorescencia

El espectro de emisión intrínseca de fluorescencia obtenido es muy similar al reportado para el monómero de Bax en la literatura (Fig. 21). El experimento desarrollado muestra un máximo de emisión a 341 nm, en comparación con el máximo de emisión para el espectro reportado (336 nm), el ligero desplazamiento hacia la derecha indica una mayor exposición de los triptófanos al solvente, sin embargo, el desplazamiento hacia la derecha es menor que cuando el monómero se encuentra desnaturado con 6 M de cloruro de guanidinio (GndCl) donde el máximo de emisión es a 348 nm.

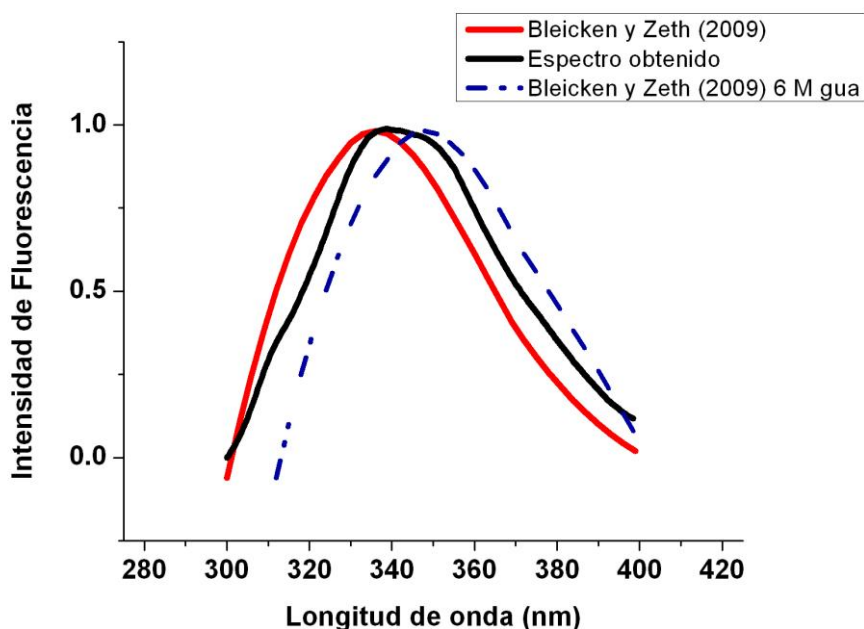


Figura 21. Comparación del espectro de emisión intrínseca del triptófano del monómero de Bax. En rojo se observa el espectro reportado en la literatura, el pico máximo de emisión se encuentra a los 336 nm, en negro se reporta el espectro obtenido bajo nuestras condiciones: Bax en una concentración de $13.67 \mu\text{g mL}^{-1}$ en una dilución 1:2 de soluciones amortiguadoras 25 mM HEPES-NaOH pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.2 mM DTT y 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na_2HPO_4 , 1.47 mM KH_2PO_4 pH 7.4, respectivamente, con un máximo de emisión a los 341 nm. La línea punteada en azul representa el espectro del monómero desnaturado con 6 M de cloruro de guanidinio y un máximo de emisión a los 348 nm.

7. Discusión

El estudio de la interacción de Bax con las membranas lipídicas continúa siendo de gran interés, principalmente debido a que estudios recientes aportan información sobre diferentes mecanismos de activación de la proteína y generan nuevas hipótesis sobre su inserción y oligomerización en la MEM. De manera particular se ha demostrado que los monómeros de Bax se auto-integran ampliamente en la MEM y se auto-oligomerizan (Brustovetsky et al. 2010) en divergencia con estudios anteriores que establecen que los monómeros de Bax difícilmente se asocian a las mitocondrias y que la oligomerización de ésta es un prerrequisito para su función pro-apoptótica (Eskes et al. 2000; Antonsson et al. 2001). Con la finalidad de contribuir a elucidar la interacción de Bax con las membranas lipídicas se desarrollo este trabajo de tesis.

En primera instancia el protocolo de la purificación de la proteína no pudo ser reproducido conforme lo establecido por Montessuit et al. (1999) debido a que nuestra proteína recombinante no mostraba gran afinidad a la resina de Ni-Agarosa. Aunque el sistema de expresión es *E.coli* los autores utilizan el vector pBAD que les permite tener una etiqueta de 6 histidinas adyacentes al extremo N-terminal del primer aminoácido (metionina) de Bax. En nuestro caso el vector de expresión pET28a la etiqueta de 6 histidinas también se encuentra en el extremo N-terminal; sin embargo, la etiqueta se encuentra separada por 10 aminoácidos (Ser-Ser-Gly-Leu-Val-Pro-Arg-Gly-Ser-His) antes de la primer metionina que codifica para Bax. Posiblemente la estructura de Bax internalice o esconda el tracto de histidinas evitando que nuestra proteína se una de manera eficiente a la resina. Nuestro argumento se basa en que la afinidad de la proteína recombinante de Montessuit et al. (1999) eluye a concentraciones relativamente bajas de imidazol (~20 a 40 mM) (Antonsson B. comunicación personal) lo que demuestra que Bax recombinante no muestra una afinidad fuerte a la resina de Ni-Agarosa. Por lo anterior, se optó por aprovechar la característica de hidrofobicidad de Bax (R. Eskes 1998; Lewis et al. 1998; Montessuit et al. 1999; Eliseev et al. 2004) y se realizó cromatografía por interacción hidrofóbica, seguida de cromatografía de

afinidad, lo cual nos permitió obtener una especie monomérica reconocida por detecciones espectroscópicas. Con una estimación del 95 % de pureza.

El espectro de DC nos permite concluir que nuestra proteína recombinante está pura, se encuentra plegada correctamente y está constituida sólo por hélices alfa. El espectro obtenido es comparable (Fig. 20) a los datos anteriormente reportados (Yethon et al. 2003; Bleicken y Zeth 2009), de esta forma validamos todos nuestros experimentos previos a la purificación de Bax recombinante. Los datos obtenidos en el espectro de DC no son suficientes para completar el espectro de Bax a longitudes de ondas menores a 210 nm. Existen diversas causas por las que no fue posible obtener estimaciones confiables en esas longitudes de onda. Técnicamente se recomienda que al realizar los análisis de DC en el UV lejano la proteína se utilice en un rango de concentraciones de 50 µg/mL a 1 mg/mL, en soluciones amortiguadoras que no contengan compuestos que presenten una alta absorbancia en esa región del espectro, entre algunos de los compuestos que pueden interferir con las mediciones se encuentran las altas concentraciones de DTT, histidina, imidazol, NaCl, HEPES y TRIS (Kelly et al. 2005; Ranjbar & Gill 2009). Una de las causas puede ser la sobreestimación de la concentración de Bax, provocando la disminución de la tasa señal-ruido a longitudes de ondas menores a 210 nm. Otro factor a tomar en consideración es que la muestra utilizada para realizar el espectro de DC contiene varios de estos compuestos que interfieren con las mediciones, por lo que la contribución de cada uno de ellos provocó estimaciones no confiables en la parte final del espectro.

El espectro de FT muestra que en nuestra proteína recombinante los triptófanos están accesibles o al menos parcialmente expuestos, lo cual concuerda con la estructura obtenida por RMN (Suzuki et al. 2000) y el espectro de fluorescencia previamente reportado (Bleicken & Zeth 2009). Respecto a este último, nuestro espectro se encuentra desplazado 5nm hacia longitudes de onda mayores, sin embargo, no se sobrepone con los datos del monómero de Bax desnaturalizado (Fig. 21). De lo anterior podemos concluir que nuestra proteína purificada se encuentra como monómero, que el desplazamiento hacia longitudes de onda mayores puede deberse a la

contribución de la solución amortiguadora provocando que los triptófanos de Bax queden más expuestos, y que el espectro de fluorescencia ajusta mejor con nuestros resultados debido a que hay una tasa muy alta de la señal de la muestra en comparación con la señal del ruido (Royer 2006);

En cuanto los análisis de la dinámica molecular, los parámetros del orden del deuterio se utilizan para validar o calibrar las simulaciones de dinámica molecular, y, son considerados una fuente crítica de información respecto a las propiedades estructurales y dinámicas de los lípidos (Heller et al. 1993; Vermeer et al. 2007). Se ha demostrado que los datos experimentales y aquellos obtenidos en simulaciones son similares en la región hidrofóbica de la membrana tanto para fosfolípidos y colesterol, en la región hidrofílica la relación es menos representativa, posiblemente debido a la alta polaridad de la región que provoca que el cálculo computacional de las interacciones electrostáticas sea más complejo (Vermeer et al. 2007). En relación al análisis de SCD en las cadenas acilo de la simulación de Bax con una membrana lipídica se observan resultados similares a los reportados para cadenas acilo de DMPC (dimiristoilfosfatidilcolina) y DPPC (Pandit et al. 2003; Vermeer et al. 2007) y que son comparables con los resultados experimentales obtenidos en DMPC (Vermeer et al. 2007), permitiendo concluir que el diseño de la membrana lipídica es válido para desarrollar los análisis por medio de las simulaciones de dinámica molecular. Las diferencias encontradas en la orientación de los átomos de carbono de las cadenas acilo se explica principalmente debido a la presencia de la proteína Bax y el desplazamiento que ésta provoca en los lípidos adyacentes, ya que los lípidos pueden influenciar la estructura y función de las proteínas de membranas, y, por otro lado, las proteínas tienen una influencia en las dinámicas de los lípidos (Biggin y Bond 2008)

La densidad de la membrana puede ser medida de manera muy precisa experimentalmente, en cambio para validar el campo de fuerzas utilizado en la simulación molecular de una membrana deben introducirse parámetros que le den robustez al sistema que nos permitan tener una mejor densidad de la membrana. Lo anterior se logra optimizando los parámetros del campo de fuerza OPLS-AA para las cadenas de hidrocarbonadas con potenciales del tipo

Lennard-Jones (Berger et al. 1997; Marrink et al. 1998). Los parámetros de densidad de la membrana que se presentan en este trabajo (Fig. 13) son comparables a datos experimentales y datos de dinámicas moleculares (Nagle & Tristram-Nagle 2000; D. P. Tieleman 2006). La simetría de la membrana es evidente y la sutil diferencia entre las densidades estimadas se debe a que la capa superior de la membrana tiene 5 moléculas de DPPC más que la capa inferior de esta, ya que al momento de centrar a Bax en la membrana los DPPC que se sobreponían en la proteína se eliminaron.

Finalmente, conseguimos representar a escala atómica los dominios estructurales de Bax más relevantes para su interacción con membranas lipídicas. Una de las limitantes de los modelos que explican la inserción de Bax es que los datos o información provienen de experimentos con condiciones muy distintas, i.e. la proteína sin el extremo C-terminal, con aminoácidos adyacentes al N-terminal, péptidos sintéticos (García-Saez et al. 2005), liposomas artificiales constituidos por distintas clases de lípidos y detergentes (Yethon et al. 2003; Bleicken y Zeth 2009). En resumen, la simulación de dinámica molecular nos permitió establecer que efectivamente hay dominios transmembranales (C-terminal, H α 5, H α 6), que el “loop” entre la H α 1 y H α 2 presenta una alta movilidad y está expuesto al solvente por el lado que correspondería al espacio intermembranal de la mitocondria, y el extremo N-terminal siempre se encuentra en la región del solvente. El dominio BH3 que se ha reportado como un dominio canónico para la oligomerización de Bax o su activación por tBid permanece expuesto al solvente una vez que Bax está insertada en la membrana; éste punto en particular tiene un significado biológico importante ya que los experimentos más recientes comprueban que Bax puede estar asociada a la membrana sin permeabilizar la MEM (T. Brustovetsky et al. 2010), entonces, al encontrarse accesible el dominio BH3 la proteína inserta en la membrana es susceptible a oligomerizarse y/o activarse.

8. Conclusiones

Desarrollamos el primer modelo sobre la interacción de Bax con una membrana lipídica a nivel atómico.

El modelo describe los cambios de conformación en la proteína al interactuar con los lípidos y confirma las estructuras reportadas como dominios transmembranales.

Las técnicas de purificación aquí reportadas permiten la obtención de una proteína pura que puede utilizarse para ensayos de espectrométricos.

La proteína recombinante aquí reportada en este trabajo se encuentra en una conformación monomérica.

Por medio de los métodos de FT y DC se confirma que la proteína recombinante Bax humana se encuentra correctamente plegada.

9. Perspectivas

Una vez obtenida la proteína pura se pueden realizar experimentos que confirmen los descubrimientos aquí reportados. Mediante mutagénesis dirigida se pueden provocar cambios en las estructuras de interés que modulen la actividad de Bax. Particularmente, en nuestro grupo de estudio un aspecto que debe ser evaluado es la alteración de la función Bax por el fármaco probenecid el cual ha mostrado niveles importantes de neuroprotección en enfermedades neurodegenerativas.

10. Bibliografía

- Annis, M.G. et al., 2005. Bax forms multispinning monomers that oligomerize to permeabilize membranes during apoptosis. *The EMBO Journal*, 24(12), págs.2096-2103.
- Antonsson, B. et al., 2001. Bax is present as a high molecular weight oligomer/complex in the mitochondrial membrane of apoptotic cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(15), págs.11615-11623.
- Berger, O., Edholm, O. & Jähnig, F., 1997. Molecular dynamics simulations of a fluid bilayer of dipalmitoylphosphatidylcholine at full hydration, constant pressure, and constant temperature. *Biophysical Journal*, 72(5), págs.2002-2013.
- Biggin, P.C. & Bond, P.J., 2008. Molecular dynamics simulations of membrane proteins. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 443, págs.147-160.
- Bleicken, S. & Zeth, K., 2009. Conformational changes and protein stability of the pro-apoptotic protein Bax. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 41(1), págs.29-40.
- Bocharov, E.V. et al., 2007. Unique dimeric structure of BNip3 transmembrane domain suggests membrane permeabilization as a cell death trigger. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(22), págs.16256-16266.
- Brambrink, A.M. et al., 2000. Tolerance-Inducing dose of 3-nitropropionic acid modulates bcl-2 and bax balance in the rat brain: a potential mechanism of chemical preconditioning. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 20(10), págs.1425-1436.
- Brustovetsky, T. et al., 2010. BAX insertion, oligomerization, and outer membrane permeabilization in brain mitochondria: role of permeability transition and SH-redox regulation. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1797(11), págs.1795-1806.
- Cartron, P.F. et al., 2004. Impact of pH on Bax alpha conformation, oligomerisation and mitochondrial integration. *FEBS Letters*, 578(1-2), págs.41-46.
- Chen, C. et al., 2007. Modeling of the role of a Bax-activation switch in the mitochondrial apoptosis decision. *Biophysical Journal*, 92(12), págs.4304-4315.
- Chipuk, J.E. et al., 2010. The BCL-2 family reunion. *Molecular Cell*, 37(3), págs.299-310.
- Choi, W.S. et al., 2001. Cleavage of Bax is mediated by caspase-dependent or -independent calpain activation in dopaminergic neuronal cells: protective role of Bcl-2. *Journal of Neurochemistry*, 77(6), págs.1531-1541.
- Eliseev, R., Alexandrov, A. & Gunter, T., 2004. High-yield expression and purification

- of p18 form of Bax as an MBP-fusion protein. *Protein Expression and Purification*, 35(2), págs.206-209.
- Eskes, R. et al., 2000. Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane. *Molecular and Cellular Biology*, 20(3), págs.929-935.
- Eskes, R., 1998. Bax-induced Cytochrome C Release from Mitochondria Is Independent of the Permeability Transition Pore but Highly Dependent on Mg²⁺ Ions. *The Journal of Cell Biology*, 143(1), págs.217-224.
- Fulda, S. & Debatin, K., 2006. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene*, 25(34), págs.4798-4811.
- Heller, H., Schaefer, M. & Schulten, K., 1993. Molecular dynamics simulation of a bilayer of 200 lipids in the gel and in the liquid crystal phase. *The Journal of Physical Chemistry*, 97(31), págs.8343-8360.
- Henkel, M. et al., 2010. The proapoptotic influenza A virus protein PB1-F2 forms a nonselective ion channel. *PloS One*, 5(6), pág.e11112.
- Hou, Q. & Hsu, Y., 2005. Bax translocates from cytosol to mitochondria in cardiac cells during apoptosis: development of a GFP-Bax-stable H9c2 cell line for apoptosis analysis. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 289(1), págs.H477-487.
- Jiang, X. & Wang, X., 2004. Cytochrome C-mediated apoptosis. *Annual Review of Biochemistry*, 73, págs.87-106.
- Jourdain, A. & Martinou, J., 2009. Mitochondrial outer-membrane permeabilization and remodelling in apoptosis. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 41(10), págs.1884-1889.
- Karplus, M. & McCammon, J.A., 2002. Molecular dynamics simulations of biomolecules. *Nature Structural Biology*, 9(9), págs.646-652.
- Kelly, S.M., Jess, T.J. & Price, N.C., 2005. How to study proteins by circular dichroism. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1751(2), págs.119-139.
- Lalier, L. et al., 2007. Bax activation and mitochondrial insertion during apoptosis. *Apoptosis: An International Journal on Programmed Cell Death*, 12(5), págs.887-896.
- Lewis, S. et al., 1998. Purification and biochemical properties of soluble recombinant human Bax. *Protein Expression and Purification*, 13(1), págs.120-126.
- Lindahl E., Hess B., van der Spoel D. 2001. GROMACS 3.0: a package for molecular simulation and trajectory analysis. *J. Mol. Mod.* 7:306-317
- Mancinelli, F. et al., 2006. Molecular dynamics simulation and automated docking of

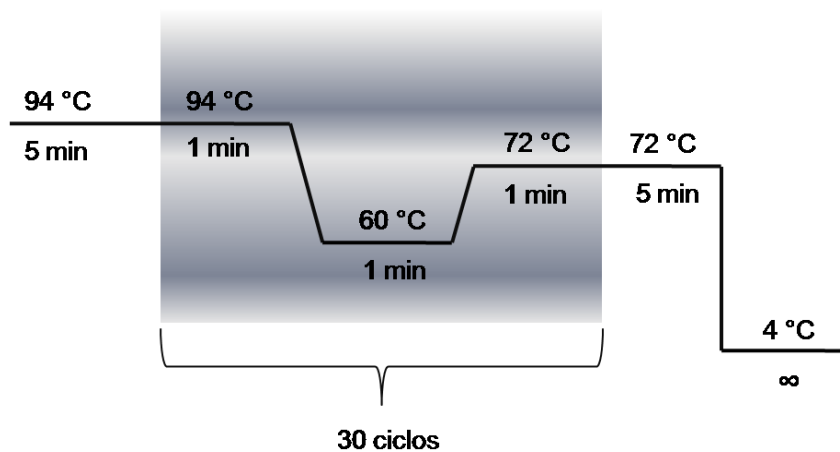
- the pro-apoptotic Bax protein and its complex with a peptide designed from the Bax-binding domain of anti-apoptotic Ku70. *Journal of Cellular Biochemistry*, 99(1), págs.305-318.
- Marrink, S.J. et al., 1998. Adhesion forces of lipids in a phospholipid membrane studied by molecular dynamics simulations. *Biophysical Journal*, 74(2 Pt 1), págs.931-943.
- Montessuit, S. et al., 1999. Expression and purification of full-length human Bax alpha. *Protein Expression and Purification*, 15(2), págs.202-206.
- Moroy, G. et al., 2009. Molecular basis for Bcl-2 homology 3 domain recognition in the Bcl-2 protein family: identification of conserved hot spot interactions. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(26), págs.17499-17511.
- Nagle, J.F. & Tristram-Nagle, S., 2000. Structure of lipid bilayers. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1469(3), págs.159-195.
- Pandit, S.A., Bostick, D. & Berkowitz, M.L., 2003. Molecular dynamics simulation of a dipalmitoylphosphatidylcholine bilayer with NaCl. *Biophysical Journal*, 84(6), págs.3743-3750.
- Putcha, G.V. et al., 2002. Intrinsic and extrinsic pathway signaling during neuronal apoptosis: lessons from the analysis of mutant mice. *The Journal of Cell Biology*, 157(3), págs.441-453.
- Ranjbar, B. & Gill, P., 2009. Circular Dichroism Techniques: Biomolecular and Nanostructural Analyses- A Review. *Chemical Biology & Drug Design*, 74(2), págs.101-120.
- Royer, C.A., 2006. Probing protein folding and conformational transitions with fluorescence. *Chemical Reviews*, 106(5), págs.1769-1784.
- Sas, K. et al., 2007. Mitochondria, metabolic disturbances, oxidative stress and the kynurenine system, with focus on neurodegenerative disorders. *Journal of the Neurological Sciences*, 257(1-2), págs.221-239.
- Suzuki, M., Youle, R.J. & Tjandra, N., 2000. Structure of Bax: coregulation of dimer formation and intracellular localization. *Cell*, 103(4), págs.645-654.
- Teles, A.V.F.F. et al., 2008. Increase in bax expression and apoptosis are associated in Huntington's disease progression. *Neuroscience Letters*, 438(1), págs.59-63.
- Tieleman, D.P., 2006. Computer simulations of transport through membranes: passive diffusion, pores, channels and transporters. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology*, 33(10), págs.893-903.
- Vermeer, L.S. et al., 2007. Acyl chain order parameter profiles in phospholipid bilayers: computation from molecular dynamics simulations and comparison with ²H NMR experiments. *European Biophysics Journal: EBJ*, 36(8), págs.919-931.

Yethon, J.A. et al., 2003. Interaction with a membrane surface triggers a reversible conformational change in Bax normally associated with induction of apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(49), págs.48935-48941.

Zhu, F., Tajkhorshid, E. & Schulten, K., 2001. Molecular dynamics study of aquaporin-1 water channel in a lipid bilayer. *FEBS Letters*, 504(3), págs.212-218.

Anexo 1

Tabla 1.



Oligonucleótidos: 25 pmol oligonucleótido sentido; 25 pmol oligonucleótido antisentido
ADN* (pOTB7-Bax) ~50 ng; TAQ PCR Master Mix QIAGEN: 2.5 unidades de *Taq DNA polimerasa*, 1x de buffer de PCR de QIAGEN (contiene 1.5 mM de $MgCl_2$), 200 μM de cada dNTP; H_2O inyectable.

* Control negativo; ADN plasmídico pET28a

Condiciones de amplificación en la reacción de PCR

Desnaturalización preliminar del ADN 94 °C 5 min
Desnaturalización del ADN 94 °C 1 min
Alineamiento de los oligonucleótidos 60 °C 1 min
Extensión de los productos 72 °C 1 min
Extensión final 72 °C 5 min

Anexo 2

g_grompp: verifica el archivo de entrada y genera un archivo de topología con extensión .tpr.

g_trjconv: cambia la representación de la periodicidad.

g_editconf: orienta los péptidos en base su centro de masas y el centro de la caja con agua.

g_genrest: genera restricciones de posiciones o distancias para grupos indexados.

g_genbox: genera una caja con solvente.

g_genion: reemplaza moléculas de solvente por iones en las posiciones de potencial electrostático más favorables o en posiciones aleatorias.

g_mdrun: permite desarrollar las simulaciones de dinámica molecular, dinámicas estocásticas y minimizaciones de energía entre otras aplicaciones.

g_make_ndx: agrupa los átomos, residuos, cadenas o números que se especifiquen dentro de un solo conjunto.

g_energy: calcula los promedios de energía del sistema y genera un archivo con extensión .xvg.

g_order: computa los parámetros de orden para cada átomo de de carbono de las cadenas acilo.

g_density: calcula las densidades parciales del sistema a lo largo de la caja que lo delimita.

Anexo 3

```
title      = KALP15-DPPC Production MD
; Run parameters
integrator  = md          ; leap-frog integrator
nsteps     = 500000      ; 2 * 500000 = 5000 ps (5 ns)
dt         = 0.002      ; 2 fs
; Output control
nstxout    = 1000       ; save coordinates every 2 ps
nstvout    = 1000       ; save velocities every 2 ps
nstxtcout  = 1000       ; xtc compressed trajectory output every 2 ps
nstenergy  = 1000       ; save energies every 2 ps
nstlog     = 1000       ; update log file every 2 ps
; Bond parameters
continuation = yes      ; Restarting after NPT
constraint_algorithm = lincs ; holonomic constraints
constraints = all-bonds ; all bonds (even heavy atom-H bonds) constrained
lincs_iter  = 1         ; accuracy of LINCS
lincs_order = 4         ; also related to accuracy
; Neighborsearching
ns_type     = grid      ; search neighboring grid cels
nstlist     = 5         ; 10 fs
rlist       = 1.2       ; short-range neighborlist cutoff (in nm)
rcoulomb    = 1.2       ; short-range electrostatic cutoff (in nm)
rvdw        = 1.2       ; short-range van der Waals cutoff (in nm)
; Electrostatics
coulombtype = PME       ; Particle Mesh Ewald for long-range electrostatics
pme_order   = 4         ; cubic interpolation
fourierspacing = 0.16 ; grid spacing for FFT
; Temperature coupling is on
tcoupl      = Nose-Hoover ; More accurate thermostat
tc-grps     = Protein DPPC SOL_Na+ ; three coupling groups - more accurate
tau_t       = 0.1 0.1 0.1 ; time constant, in ps
ref_t       = 323 323 323 ; reference temperature, one for each group, in K
; Pressure coupling is on
pcoupl      = Parrinello-Rahman ; Pressure coupling on in NPT
pcoupltype  = semiisotropic ; uniform scaling of x-y box vectors, independent z
tau_p       = 2.0       ; time constant, in ps
ref_p       = 1.0 1.0 ; reference pressure, x-y, z (in bar)
compressibility = 4.5e-5 4.5e-5 ; isothermal compressibility, bar^-1
; Periodic boundary conditions
pbc         = xyz       ; 3-D PBC
; Dispersion correction
DispCorr    = EnerPres ; account for cut-off vdW scheme
; Velocity generation
[isaac@node05 isaacGromacs2]$ less minim.mdp
; minim.mdp - used as input into grompp to generate em.tpr
; Parameters describing what to do, when to stop and what to save
integrator  = steep      ; Algorithm (steep = steepest descent minimization)
emtol      = 1000.0      ; Stop minimization when the maximum force < 1000.0 kJ/mol/nm
emstep     = 0.01        ; Energy step size
nsteps     = 50000       ; Maximum number of (minimization) steps to perform

; Parameters describing how to find the neighbors of each atom and how to calculate the
interactions
nstlist    = 1          ; Frequency to update the neighbor list and long range forces
ns_type    = grid       ; Method to determine neighbor list (simple, grid)
rlist      = 1.2        ; Cut-off for making neighbor list (short range forces)
coulombtype = PME       ; Treatment of long range electrostatic interactions
rcoulomb   = 1.2        ; Short-range electrostatic cut-off
```

```
rvdw      = 1.2      ; Short-range Van der Waals cut-off
pbc       = xyz      ; Periodic Boundary Conditions (yes/no)
minim.mdp (END)
```

Anexo4

```
title      = KALP15-DPPC Production MD
; Run parameters
integrator  = md          ; leap-frog integrator
nsteps     = 5000000     ; 2 * 5000000 = 10000 ps (10 ns)
dt         = 0.002       ; 2 fs
; Output control
nstxout    = 1000        ; save coordinates every 2 ps
nstvout    = 1000        ; save velocities every 2 ps
nstxtcout  = 1000        ; xtc compressed trajectory output every 2 ps
nstenergy  = 1000        ; save energies every 2 ps
nstlog     = 1000        ; update log file every 2 ps
; Bond parameters
continuation = yes       ; Restarting after NPT
constraint_algorithm = lincs ; holonomic constraints
constraints = all-bonds  ; all bonds (even heavy atom-H bonds) constrained
lincs_iter  = 1          ; accuracy of LINCS
lincs_order = 4          ; also related to accuracy
; Neighborsearching
ns_type     = grid       ; search neighboring grid cels
nstlist     = 5          ; 10 fs
rlist       = 1.2        ; short-range neighborlist cutoff (in nm)
rcoulomb    = 1.2        ; short-range electrostatic cutoff (in nm)
rvdw        = 1.2        ; short-range van der Waals cutoff (in nm)
; Electrostatics
coulombtype = PME        ; Particle Mesh Ewald for long-range electrostatics
pme_order   = 4          ; cubic interpolation
fourierspacing = 0.16    ; grid spacing for FFT
; Temperature coupling is on
tcoupl      = Nose-Hoover ; More accurate thermostat
tc-grps     = Protein DPPC SOL_Na+ ; three coupling groups - more accurate
tau_t       = 0.1 0.1 0.1 ; time constant, in ps
ref_t       = 323 323 323 ; reference temperature, one for each group, in K
; Pressure coupling is on
pcoupl      = Parrinello-Rahman ; Pressure coupling on in NPT
pcoupltype  = semiisotropic ; uniform scaling of x-y box vectors, independent z
tau_p       = 2.0        ; time constant, in ps
ref_p       = 1.0 1.0    ; reference pressure, x-y, z (in bar)
compressibility = 4.5e-5 4.5e-5 ; isothermal compressibility, bar^-1
; Periodic boundary conditions
pbc         = xyz        ; 3-D PBC
; Dispersion correction
md1a10ns.mdp
```