

Reporte del proyecto: Estudios de cambios conformacionales en Proteínas.

Resumen:

El presente proyecto tiene como objetivo investigar, usando como base simulaciones de dinámica molecular, el proceso de apertura del poro central del Proteasoma 20S. Este complejo macromolecular de 720 KDa es responsable de la realizar la actividad proteolítica dentro del Sistema Ubiquitina-Proteasoma [1]. El Proteasoma 20S adquiere una forma cilíndrica en cuyo interior se encuentran los sitios de actividad catalítica [2]. Para llegar a dichos sitios, los substratos tienen que internarse la cavidad central del cilindro a través de las tapas superior e inferior, lo cual requiere un cambio conformacional en los dominios proteicos que constituyen la entrada al poro. Aunque existen varias estructuras cristalográficas correspondientes a ambos estados; abierto y cerrado, se tiene aún muy poco entendimiento del proceso. Una mayor comprensión del mecanismo de apertura es crucial para el estudio de los procesos donde el Proteasoma 20S participa (por ejemplo desarrollo de cáncer), así como extender las posibilidades de desarrollo de inhibidores de su actividad [3].

El presente documento se presentan los avances realizados en este ambicioso proyecto. El problema ha sido abordado desde de una perspectiva evolutiva y funcional. Para ellos se han incluido en el estudio una gama de Proteasomas de diferentes especies y en diferentes formas funcionales (expresadas a nivel celular bajo diferentes condiciones externas). En particular, se detallan los avances del sistema de arquea. Este sistema ha sido seleccionado dado que es el único que ofrece la posibilidad de una correlación experimental. Este sistema es entonces nuestro sistema de validación metodológica. Datos actuales son promisorios en términos técnicos y relevantes en términos científicos. Sin embargo, es necesario continuar con el estudio poder llevarlo a buen término.

Referencias:

- [1] Hershko A., A. Ciechanover (1998). "THE UBIQUITIN SYSTEM." *Annual Review of Biochemistry*, 67: 425-479.
- [2] Stadtmueller B. M., Hill, C. P. (2011). Proteasome Activators. *Molecular Cell*, 41: 8-19.
- [3] Chen D., Frezza M., Schmitt S., Kanwar J., Dou Q.P. (2011) Bortezomib as the First Proteasome Inhibitor Anticancer Drug: Current Status and Future Perspectives. *Curr Cancer Drug Targets*, 11: 239-253.

Breve descripción de avances

En la primera etapa del proyecto consistió en el desarrollo de modelos de conformaciones iniciales para las proteasomas de las diferentes especies. Actualmente se cuentan con modelos estructurales de proteasomas de humano, humano-inmuno, ratón, ratón-inmuno, levadura y un proteasoma de arquea. Para este conjunto de estructuras se han desarrollado modelos en 2 estados iniciales de relevancia fisiológica, estado abiertos y cerrados de las cavidades de sus poros centrales. La generación de los modelos involucró el uso de modelado de homología para completar las estructuras experimentales y así contar con modelos que sean completos y equivalentes entre sí. El refinamiento de dichas estructuras fue realizado mediante cálculos de muestreo Monte Carlo.

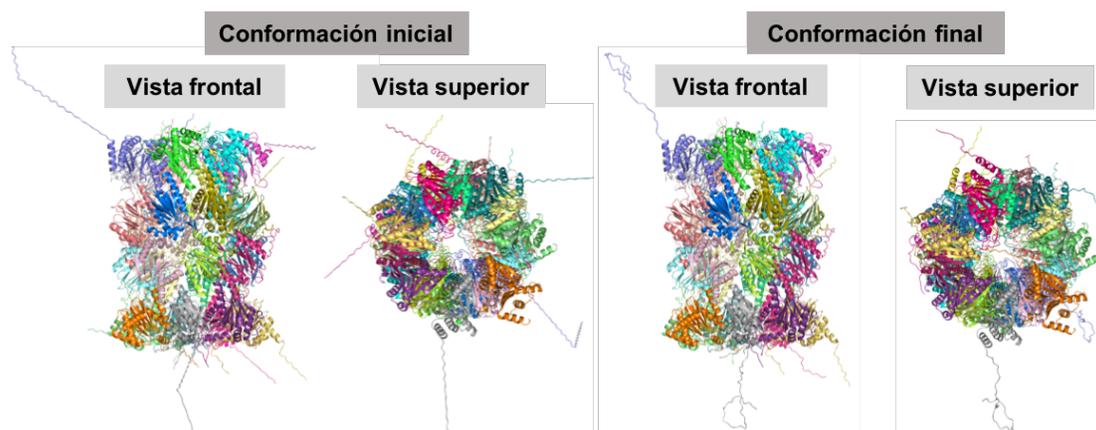


Figura 1. Modelos del Proteasoma 20S de levadura en estados inicial y final de proceso de refinamiento estructural. Los modelos incluyen segmentos del Proteasoma 20S de los cuales no se tiene información cristalográfica pero cuyo rol funcional pudiera ser crucial (ver texto).

La generación de modelos del Proteasoma 20S con secuencia completa es gran relevancia para el estudio de las interacciones alostéricas que han sido sugeridas por los sistemas experimentales. En particular, la generación del modelo de levadura (Figura 1) mostro segmentos C-terminales de las subunidades alfa que no han sido resueltos por la cristalografía y que podrían, dada su localización y longitud, estar participando en procesos de alostéricos y de transducción de señales. Estos modelos han propiciado el comienzo de la colaboración con el laboratorio experimental del Dr. Francisco Torres Quiroz del Instituto de Fisiología Celular (UNAM) para la evaluación del posible rol funcional de estos segmentos. Datos preliminares en cultivos celulares han comenzado a proveernos información cualitativa respecto al posible role de estos segmentos. Dicha información es de gran utilidad para guiar el modelado computacional de este proyecto.

Los modelos refinados del Proteasoma 20S en ambos estados, poros abiertos y cerrados, han sido utilizados como puntos extremos del proceso de apertura. Para ellos se han realizado simulaciones de dinámica molecular nos permiten estudiar a detalle el mecanismo estructural de apertura. En la siguiente sección presentamos información del Proteasoma de arquea. Este sistema es particularmente atractivo dada su relativa simplicidad (en comparación con el resto de Proteasomas eucariotes de nuestro estudio) y la existencia de estudios experimentales que permite comparar los resultados de nuestras dinámicas moleculares. Es decir, el Proteasoma de arquea es nuestro punto de referencia y validación metodológica.

Cálculos realizados

El proceso de apertura del poro central del Proteasoma 20S de arquea comenzó con la generación de modelos de secuencia completa de baja energía. Establecidos dichos modelos, se procedió a generación de estados intermedios, mediante el uso de muestro Monte Carlo, de 2 posibles sentidos transición: 1) cerrado a abierto y 2) abierto a cerrado (Figura 2A). Dado que dichos caminos mostraron perfiles energéticos diferentes se decidió estudiar ambos utilizando simulaciones de dinámica molecular sobre un subconjunto de las estructuras de transición. Dichas simulaciones muestran un proceso mucho más complejo que el originalmente planteado por el muestreo Monte Carlo (Figura 2B).

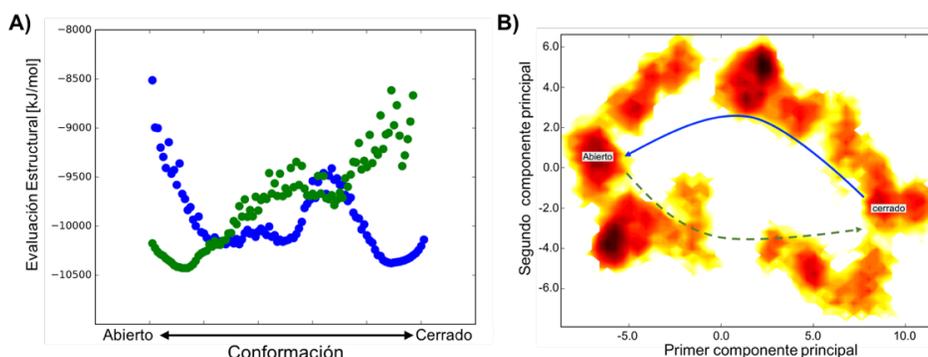


Figura 2. A) Camino de transición entre los estados abierto y cerrado. Cada punto representa una conformación, por tanto, las secuencias de puntos representan posibles caminos de transición; del estado abierto al cerrado (puntos verdes) y del estado cerrado al abierto (puntos azules). B) Proyección, sobre los dos primeros componentes principales, de dinámicas moleculares desarrolladas a partir de conformaciones propuestas por el muestro Montecarlo. Transición del estado abierto al cerrado (línea punteada verde) y transición del estado cerrado al abierto (línea continua azul). Regiones oscuras corresponden a conformaciones más visitadas y regiones claras menos visitadas.

El muestro conformacional de la transición vía dinámica molecular es interesante en dos aspectos. Primero, la existencia de estados intermedios en el proceso de transición, y segundo la existencia de discontinuidades en la trayectoria en ambos sentidos. Sin embargo, pareciera que la transición cerrado a abierto se da de manera mucho más natural (menor discontinuidad en la trayectoria). En consecuencia, es necesario más simulaciones para completar la transición y estar entonces en condiciones de establecer metodologías como Modelos de estados de Markov.

Con el fin de ganar tiempo y adquirir experiencia en el establecimiento de Modelos de estados de Markov a partir de simulaciones de dinámica molecular se han establecidos un par de sistemas más pequeños, pero igualmente relevantes, que el Proteasoma 20S. El estudio de estos sistemas nos ha brindado no sólo la oportunidad de ganar maestría en técnica que resultará esencial para el estudio de las transiciones en el Proteasoma 20S, sino que también nos ha abierto la posibilidad de obtener resultados con un alto potencial de publicación.

En resumen, modelado del proceso de apertura del poro central del Proteasoma 20S ha resultado más complicado que lo inicialmente esperado. Sin embargo, los resultados actuales no sólo son promisorios en términos técnicos, sino que también son interesantes en términos biológicos. Se espera con el apoyo necesario para poder llevar a buen término el proyecto.

Software Utilizado:

Gromacs.

Recursos Utilizados:

Al proyecto fueron asignados 1.5 millones de horas de cómputo de las cuales se utilizaron, hasta 30 de enero del 2017, alrededor de 1.2 millones. Si a esto sumamos la perspectiva de producción del mes de febrero se llegaría a cerca de 1.35 millones, es decir, 90% de los recursos asignados.

Se utilizaron únicamente 2 sistemas de colas, q_hpc y q_gpu.

En términos de almacenamiento, se ha procurado realizar respaldos de manera periódica y mantener limpios los directorios baul y tmpu, su tamaño actual es de sólo 64GB y 179GB respectivamente.

En general consideramos que se ha hecho un uso responsable de los recursos brindados.

Lista de colaboradores:

Durante el desarrollo del proyecto han surgido colaboraciones experimentales, mismas que no sólo complementan nuestros análisis, sino que también potencian los resultados (y con ello las publicaciones derivadas.)

1. Dr. Francisco Torres Quiroz (IFC-UNAM).
Evaluación funcional de segmentos C-terminales en Proteasoma 20S de levadura.
2. Dr. Alfredo Torres Larios (IFC-UNAM).
Rol estructural del ion K^+ en la actividad catalítica de la Piruvato Cinasa.
3. Dr. Tadeusz Holak (Universidad Jagellónica, Polonia).
Análisis del mapa conformacional del Ligando de la Proteína de Muerte Celular 1.

Lista de artículos publicados:

Por el momento ninguno. Pero ya se encuentra uno en procesos de escritura, y un par más deberían salir en el transcurso del año utilizando recursos de la renovación.

Lista de alumnos graduados:

Por el momento ninguno. Pero se encuentran 3 estudiantes de licenciatura en proceso de registro de tesis. El año pasado fue el primer año de trabajo en la UNAM, en consecuencia, fue un año el que se comenzó a captar estudiantes.

Lista de congresos nacionales e internacionales y participantes:

LIX Congreso Nacional de Física.

Participante: Marcelino Arciniega Castro.

XXXI Congreso Nacional de Bioquímica.

Participante: Marcelino Arciniega Castro.