

Interacción de Péptidos Bioactivos con Genes Antioxidantes SOD y CAT.

I. Hernández-Hernández¹, D. Mendez-Luna², N. M. Pérez-Vielma^{1,3}, J. Correa-Basurto^{2*}, A. Miliar-García^{1,3*}.

1 Laboratorio de Biología Molecular. Escuela Superior de Medicina, IPN.

2 Laboratorio de Modelado Molecular, Diseño de Fármacos y Bioinformática, IPN.

3 Centro Interdisciplinario de Ciencias de la Salud. Unidad Santo Tomás, IPN.

*Ambos autores contribuyeron de igual forma.

jcorreab@gmail.com, angel.miliar@yahoo.com.mx.

Resumen- Los péptidos bioactivos con secuencia Valina-Prolina-Prolina (VPP) son obtenidos de hidrolizados de caseína, inhiben la actividad de la enzima convertidora de angiotensina, mejoran la relajación vascular y presentan propiedades antiinflamatorias en aterosclerosis. Actualmente se conoce poco de cómo los péptidos provocan dichos efectos, existen trabajos que los involucran con diferentes blancos terapéuticos, entre los que se encuentra el ADN, el cual ha sido poco estudiado. Con la finalidad de caracterizar molecularmente la posible interacción del péptido con el ADN en este trabajo, en una etapa inicial, se utilizó el modelado molecular (Docking) como herramienta básica computacional que permite predecir el comportamiento probable de moléculas y de esta manera comprobar la probabilidad de unión del péptido VPP con el ADN; representado en este trabajo por las regiones mínimas promotoras de los genes SOD y CAT como probables blancos terapéuticos. Los resultados obtenidos por Docking (Fuerzas de unión de -5.05 kcal/mol a -6.0 kcal/mol dadas por enlaces de hidrógeno y distancias menores a 4 \AA o 0.4 nm) indican que existe una interacción importante entre el péptido y el ADN. En la siguiente etapa, se analizará mediante un biosensor gravimétrico (QCM) la interacción de VPP con el ADN.

Palabras clave: Péptido Bioactivo, Modelado Molecular, Genes antioxidantes, Uniones de ADN.

I. INTRODUCCIÓN.

El estudio de la interacción de biomoléculas pequeñas con el ADN se ha convertido en un área de investigación activa en la interfaz entre la química, la biología molecular y la medicina debido a su alta importancia biológica. Además, el interés generado por componentes menores como péptidos, especialmente de bajo peso molecular aumentó, ya que éstos presentan actividades de regulación en el control de la proliferación tejido específico [1]. Por este motivo se ha expandido la búsqueda de péptidos reguladores en nuevas fuentes alimentarias nativas [2]. Los péptidos cortos reguladores son residuos de aminoácidos con grupos laterales cargados en varias posiciones. Estos péptidos son ventajosos en el uso médico por varias razones: no tienen efectos secundarios alérgicos o de otro tipo, y muestran actividad terapéutica en dosis pequeñas; tan bajas como 20 ng ml^{-1} . Los péptidos pequeños penetran fácilmente las membranas celulares y nucleares, se unen al ADN, y pueden participar en la iniciación de la transcripción, y los procesos

de replicación. Se han reportado estudios in vivo e in vitro en cultivos organotípicos, sin embargo los mecanismos moleculares de la unión péptido-ADN no son claros [1].

El péptido bioactivo de secuencia Valina-Prolina-Prolina (VPP) ha sido estudiado por su efecto antihipertensivo. Se origina durante la fermentación de bacterias de ácido láctico o en hidrolizados de caseína, e inhibe la actividad de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) [3]. Impide el desarrollo de la hipertensión en diferentes modelos animales y el desarrollo de la presión arterial en los seres humanos con hipertensión leve [4]. También mejora la relajación vascular dependiente del deterioro endotelial en ratas hipertensas, exhibe efectos antiinflamatorios a nivel vascular y en el desarrollo de aterosclerosis [5]. El papel del péptido VPP en la modulación de la inflamación crónica está relacionado con la obesidad bajo condiciones de dieta alta en grasas. Se ha demostrado que la administración oral de VPP ejerce un efecto antiinflamatorio en el tejido adiposo de ratones alimentados con dieta alta en grasas. [6].

La relación que existe entre el péptido bioactivo VPP y las enzimas antioxidantes radica en el efecto antiinflamatorio que ejercen a nivel endotelial en el desarrollo de aterosclerosis, siendo SOD y CAT las enzimas de primera línea de protección contra las especies reactivas de oxígeno. Ya que podrían migrar por membranas celulares y nucleares para la interacción directa con los genes que transcriben dichas enzimas.

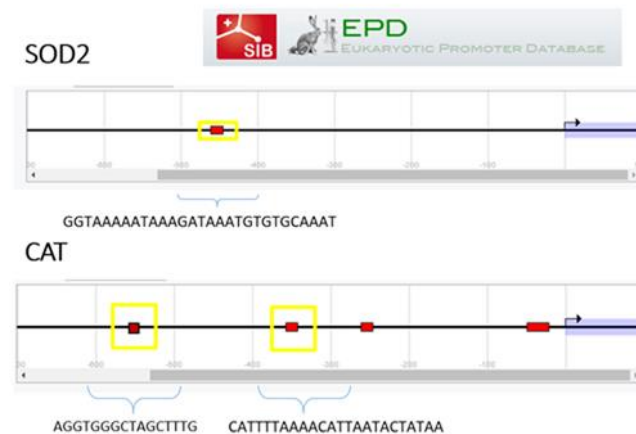


Fig. 1. Regiones consenso de las regiones mínimas promotoras de SOD y CAT por EPD.

El objetivo del presente trabajo es, en una primera etapa, emplear el modelado molecular como herramienta básica computacional para predecir las diferentes interacciones que presenten fuerzas de unión y distancias idóneas para mantener uniones entre el péptido bioactivo VPP con las regiones mínimas promotoras de los genes SOD y CAT.

II. METODOLOGÍA

En una primera fase se obtuvieron las regiones mínimas promotoras de los genes SOD y CAT en la base de datos Eukaryotic Promoter Database (EPD), de las cuales fueron seleccionadas regiones consenso de aproximadamente 30 pares de bases (bp) para su utilización en la caja de simulación (GRID BOX). La región consenso seleccionada para el gen SOD fue la secuencia (GGTAAAATAAAGATAAATGTGTGCAAAT) de 29bp y para el gen CAT se utilizaron dos regiones consenso con secuencia (CATTTTAAAACATTAATACTATAA) de 21bp y (AGGTGGGCTAGCTTTG) de 16bp (Fig. 1).

En una segunda fase se determinó la interacción del péptido bioactivo VPP como ligando y las zonas consenso de la región mínima promotora de los genes SOD y CAT como sitios de unión por medio del programa Autodock.

Se utilizaron métodos bioinformáticos para generar modelos 3D cristalizados de VPP y el ADN. Para trazar VPP se utilizó el programa GAUSS VIEW 5.0 realizando una minimización energética y geométrica a un nivel semiempírico AM1 con la paquetería Químico/Cuántica de GAUSSIAN 9.0.

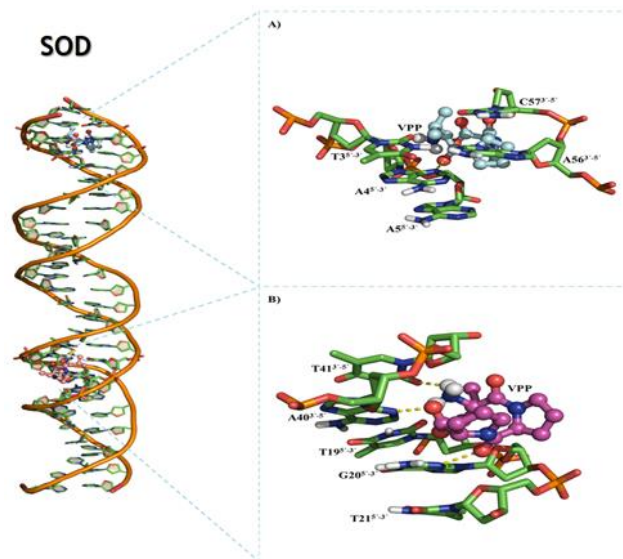


Fig. 2. Interacción de la región consenso del gen SOD en sus dos secciones con el péptido VPP como ligando

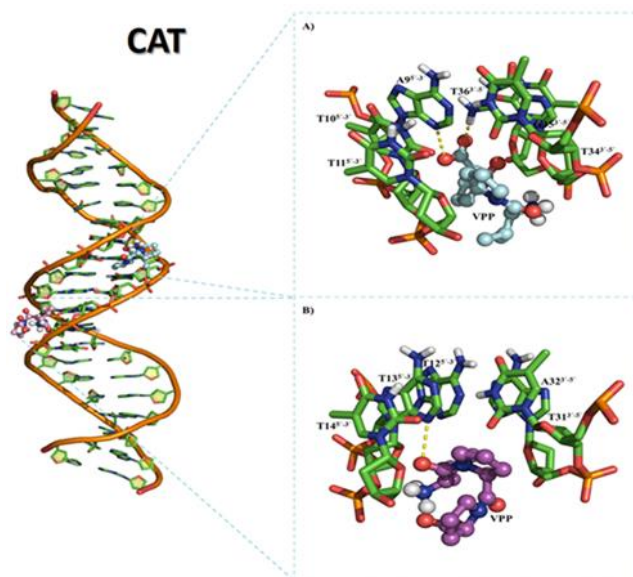


Fig. 3. Interacción de la primera región consenso del gen CAT en sus dos secciones con el péptido VPP como ligando.

Con la herramienta BUILT STRUCTURE del programa UCSF CHIMERA se trazaron las regiones promotoras de SOD y CAT en su forma B-ADN. Se minimizó con Amber (Version) usando el campo de fuerza ffAMBER99SB, en una caja de solvatación 12.0 y con TIP3P de agua a 310K y a 1 atm de presión. Las topologías de salida se utilizaron como archivos de entrada a simulaciones de acoplamiento.

El acoplamiento molecular se realizó con AUTODOCK 4.2, estructurando todos los archivos de entrada en su interfaz gráfico MGL TOOLS 1.5.6. Se calcularon las cargas de Kollman teniendo en cuenta el tamaño de las moléculas y se añadieron átomos de hidrógeno polares que son capaces de establecer interacciones por puentes de hidrógeno. Se empleó un procedimiento para generar las cajas de simulación de $126 \times 126 \times 126 \text{ \AA}^3$, y se utilizaron dos cajas por cada región consenso de las regiones promotoras de SOD y CAT.

El algoritmo energético de Lamarck fue empleado como función de puntuación con una población inicial de 100 individuos y el número máximo de las evaluaciones de energía 1×10^7 ciclos. La visualización del acoplamiento y las representaciones gráficas se realizaron en el programa gráfico molecular Py-Mol.

III. RESULTADOS

Los datos obtenidos del programa Autodock tomando como ligando el péptido bioactivo VPP y como sitio de unión las regiones consenso de ADN de cada gen, son los siguientes. En el acoplamiento molecular de la primera sección del gen SOD con VPP se encontró una interacción

con un puente de hidrógeno con una energía de unión de -5.38 kcal/mol entre la Adenina 4 y el carbono beta de la Valina1 y una distancia de 2.9 Å (0.29 nm). En la segunda sección del gen SOD con VPP se encontraron tres interacciones con tres puentes de hidrógeno con una energía de unión de -5.69 kcal/mol entre la Guanina 20 y el COO-terminal de la Prolina 2. La Adenina 40 y el COO-terminal de a Prolina 3. La Timina 41 y el NH3+ terminal de la Valina 1 con unas distancias de 2.8 Å (0.28 nm), 2.7 Å (0.27 nm) y 2.1 Å (0.21 nm) respectivamente (Fig. 2).

Mientras que en el acoplamiento molecular de la primera región consenso del gen CAT con el péptido VPP se encontraron dos interacciones con dos puentes de hidrógeno con una energía de unión de -6.94 kcal/mol entre la Adenina 9 y el COO-terminal de la Prolina 2 a una distancia de 2.9 Å (0.29 nm), y con la Guanina 35 y el COO-terminal de la Prolina 2 a una distancia de 1.8 Å (0.18 nm). Para la segunda sección del gen CAT se encontró una interacción de un puente de hidrógeno con una energía de unión de -5.05 kcal/mol entre la Adenina 13 y el Carbonilo de la Valina a una distancia de 3.0 Å (0.30 nm) (Fig. 3).

En cuanto al acoplamiento molecular realizado con la segunda región consenso del gen CAT con el péptido VPP como ligando, se encontraron en la primera sección dos interacciones con dos puentes de hidrógeno con una energía de unión de -5.46 kcal/mol entre la Guanina 5 y el COOH-terminal de la 1er Prolina a una distancia de 2.9 Å (0.29 nm), la Guanina 6 y el COOH-terminal de la 1er Prolina a una distancia de 1.7 Å (0.17 nm). Para la segunda sección del gen CAT

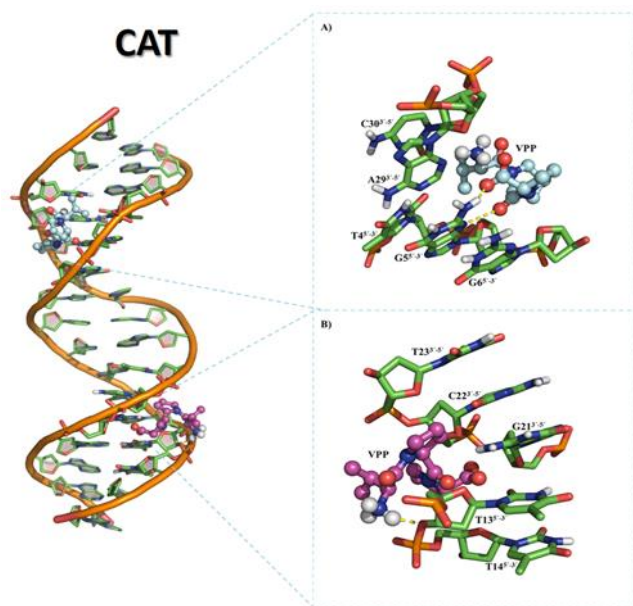


Fig. 4. Interacción de la segunda región consenso del gen CAT en sus dos secciones con el péptido VPP como ligando.

TABLA 1
FUERZAS DE UNIÓN Y DISTANCIAS DEL SITIO DE UNIÓN Y EL LIGANDO

Sitio de unión (B-ADN)	ΔG en kcal/mol	Interacciones por puentes de hidrógeno		Distancias en Å	Ligando (VPP)
		5' a 3'	3' a 5'		
SOD2	1	A4	-	2.9Å	Carbono beta de la Valina
		G20	-	2.8Å	COO- Terminal de la Prolina2
	2	-	A40	2.7Å	COO- Terminal de la Prolina3
		-	T41	2.1Å	el NH3+ Terminal de la Valina1
1ª SECCIÓN					
CAT (1)	1	A9	-	2.9Å	COO- Terminal de la Prolina2
		-	G36	1.8Å	COO- Terminal De la Prolina2
2	-5.05	A13	-	3.0Å	Carbonilo de la Valina
		2ª SECCIÓN			
CAT (2)	1	G5	-	2.9Å	COO- Terminal de la Prolina2
		G6	-	1.7Å	COO- Terminal de la Prolina3
2	-6.11	T13	-	1.8 Å	NH3+ Terminal de Valina1

con VPP se encontró una interacción entre las moléculas con un puente de hidrógeno con una energía de unión de -6.11 kcal/mol entre la Timina 13 y NH3+ terminal de la Valina a una distancia de 1.8 Å (0.18 nm) (Fig. 4).

En la tabla 1 se muestran las distancias en Å que se encuentran entre el sitio de unión y el ligando, teniendo una menor distancia de 1.7 Å (0.17nm) entre la Guanina 6 y el carboxilo terminal de la prolina 3 de la segunda sección de la región promotora del gen CAT, mostrando que tienen una distancia idónea para mantener la fuerza de unión entre las biomoléculas. Por otro lado, la fuerza de unión (ΔG) que se obtuvo con más estrechés es de -6.94 kcal/mol entre la Adenina 9 y el COO-terminal de la Prolina 2 de la primera sección de la primera región consenso del gen CAT.

IV. DISCUSIÓN

Los péptidos bioactivos juegan un papel importante en la regulación fisiológica por ejemplo, a nivel vascular en la interacción con diversas moléculas incluyendo el ADN; aunque aún no está claro como realizan interacción con este último blanco terapéutico. Los estudios realizados mediante modelado molecular han evolucionado hasta convertirse en una herramienta que se puede utilizar con eficacia para entender las relaciones de las estructuras moleculares, especialmente las relaciones biológicamente relevantes [7]. Los resultados obtenidos en el modelado molecular nos brindan información de las fuerzas de unión, distancias y del tipo de unión entre las moléculas de VPP y ADN. Existen numerosos estudios que determinan las distancias y energías de interacción ente moléculas cristalizadas principalmente proteínas, los cuales permiten el estudio de los estados conformacionales de las proteínas y posibles drogas blanco [8]. Por otro lado los ΔG reportados para interacciones moleculares idóneas entre proteínas (homodímeros de las variantes de beta globulina) oscilan entre -6 y -8 kcal/mol dependiendo el pH en cual se haya realizado la medición, así como una distancia que oscila entre 2.6 Å (0.26 nm) y 3.9 Å (0.39 nm) [9], de igual forma en otro estudio de interacción de ADN con ligandos pequeños como la esculetina la ΔG encontrada fue de -3.60 kcal/mol [10]. Al comparar estos resultados con los obtenidos en la interacción realizada en

este estudio, podemos observar que son similares a las ya reportadas en otras moléculas, siendo las ΔG de entre -5 y -6 kcal/mol, así como una distancia de entre 1.7 (0.17 nm) y 3 Å (0.30 nm), dependiendo de la secuencia analizada, lo cual sugiere una alta estabilidad en la interacción entre el péptido VPP y los fragmentos de ADN.

V. CONCLUSIÓN

Los resultados del acoplamiento molecular confirman que el péptido VPP se une al ADN de doble cadena por medio de puentes de hidrógeno a distancias menores de 4 Å (0.40 nm), es importante resaltar que estas distancias son estables y conservan la fuerza de unión entre las moléculas. Las fuerzas de unión y las distancias encontradas indican que existe una alta probabilidad de que estas interacciones se lleven a cabo *in vitro*.

Hasta el momento estos resultados se basan en la trayectoria de acoplamiento computacional y serán validados, en una segunda etapa, en un biosensor gravimétrico o QCM. Ya que este tipo de biosensores son ideales para el estudio de la interacción de moléculas biológicas como el ADN. De comprobarse esta interacción sugeriría que el péptido VPP podría regular la expresión génica.

VI. REFERENCIAS

- [1] Solovyev AY, Tarnovskaya SI, Chernova IA, Shataeva LK, Skorik YA. International Journal of Biological Macromolecules The interaction of amino acids , peptides , and proteins with DNA. Int J Biol Macromol.
- [2] Plata L. FUENTES NATURALES DE PEPTIDOS BIOACTIVOS Componentes mp presentes p m.
- [3] Mizuno S, Matsuura K, Gotou T, Nishimura S, Kajimoto O, Yabune M, et al. Antihypertensive effect of casein hydrolysate in a placebo-controlled study in subjects with high-normal blood pressure and mild hypertension. Br J Nutr. 2005;94(1):84–91.
- [4] Fekete Á, Givens D, Lovegrove J. Casein-Derived Lactotriptides Reduce Systolic and Diastolic Blood Pressure in a Meta-Analysis of Randomised Clinical Trials. Nutrients.
- [5] Aihara K, Osaka M, Yoshida M. Oral administration of the milk casein-derived tripeptide Val-Pro-Pro attenuates high-fat diet-induced adipose tissue inflammation in mice. Br J Nutr [Internet]. 2014;112(4):513–9.
- [6] Yamaguchi N, Kawaguchi K, Yamamoto N. Study of the mechanism of antihypertensive peptides VPP

and IPP in spontaneously hypertensive rats by DNA microarray analysis. Eur J Pharmacol. Elsevier B.V.; 2009;620(1-3):71–7.

- [7] Press D. Molecular dynamics simulations : advances and applications. 2015;37–47.
- [8] Luna DM. Understanding the Molecular Basis of agonist / antagonist mechanism of GPER1 / GPR30 through structural and energetic analyses. 2016;(June).
- [9] Ferna DA, Bello M, Pe G, Arregui R. Energetics of protein homodimerization: Effects of water sequestering on the formation of b -lactoglobulin dimer ´. 2007;1475–87.
- [10] Sarwar T, Husain MA, Rehman SU, Ishqi HM, Tabish M. Molecular BioSystems Multi-spectroscopic and molecular modelling thymus DNA †. Mol Biosyst. Royal Society of Chemistry; 2015;11:522–31.