

Modelo de interacción entre quercetina (3,5,7,3p,4p-pentahidroxi flavona) y factor de choque térmico (HFS) humano

Diana C. Clavijo B.^{1,2}, Juvenal Yosa R.³, Orlando E. Acevedo S.⁴, Claudia Cifuentes⁵, Carlos M. Estévez-Bretón R.⁶

¹ Fundación Universitaria Juan N. Corpas.

² Grupo de Investigación en Farmacología Vegetal “GIFVTA” Fundación Universitaria Juan N. Corpas.

³ Departamento de Química, Universidad de Basilea, Suiza.

⁴ Departamento de Física, Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana.

⁵ Grupo de Inmunobiología y Biología Celular, Departamento de Nutrición y Bioquímica, Facultad de Ciencias Pontificia Universidad Javeriana.

⁶ Laboratorio de Investigación en Sistemas Inteligentes, Línea de Investigación en Bioinformática – BioLISI. Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de Colombia.

Correspondencia: Dra. Diana C. Clavijo B.
diana.clavijo@juanncorpas.edu.co

Como citar: Modelo de interacción entre quercetina (3,5,7,3p,4p-pentahidroxi flavona) y factor de choque térmico (HFS) humano. Clavijo DC, Yosa J, Acevedo OE, Cifuentes C, Estévez-Bretón R. CM. Cuarzo 2016; 22 (2): 73-79.

Recibido: 25 de agosto de 2016.

Aceptado: 15 de noviembre de 2016.

Publicado: 30 de diciembre de 2016.

Licencia creative commons



Resumen

INTRODUCCIÓN. La expresión de las proteínas de choque térmico (HSP) inducibles por estrés esta regulada por el factor de choque térmico (HSF), el cual existe en forma inactiva monomérica y que al trimerizarse es capaz de unirse al DNA activando la transcripción de las HSP.

OBJETIVO. Diseñar un un modelo computacional que contribuya a elucidar las posibles interacciones entre el flavonoide quercetina y proteínas como el HSF-1.

METODOLOGÍA. Para observar cómo la quercetina afecta posiblemente la trimerización de la HSF se realizó el modelo por homología de humano del factor de shock térmico (HSF-1), obteniendo un modelo con alta homología estructural con la misma proteína de *Kluyveromyces lactis*, este modelo fue usado para realizar docking con el flavonoide quercetina (3,5,7,3p,4p-pentahidroxi flavona).

RESULTADO Y CONCLUSIÓN. El resultado del docking mostró que la quercetina se une a un loop (“ala”), que es de importancia para la interacción entre proteína-proteína, probablemente afectando la trimerización de esta..

PALABRAS CLAVE: Flanoides, Quercetina, Proteinas de choque térmico, Simulación del Acoplamiento Molecular.

Interaction model between quercetin (3,5,7,3p,4p-pentahydroxiflavone) and human shock thermic factor (HFS)

INTRODUCTION. The expression of the HSP stress inducted are regulated by the Shock Thermic Factor (HSF), that exists in an inactive form as a monomer and when it becomes a trimer can make a bind to DNA activating the HSP transcription.

OBJECTIVE. Design a computational model that helps elucidate possible interactions between quercetin flavonoid and proteins such as HSF-1.

METHODOLOGY. To observe how the quercetin possibly affects the timerization of HFS, we make an homology model of the human shock factor (HFS-1), obtaining a high structural homology model with the same protein in *Kluyveromyces lactis*, this model was used to make docking with the flavonoid quercetin (3,5,7,3p,4p-pentahydroxiflavone).

RESULTS AND CONCLUSION. The doking result shows that the quercetin docks to a loop (wing), that is important in the protein-protein interaction, possibly affecting they're trimerization.

KEYWORDS: Flanoids, Quercetin, Heat-shock proteins, Molecular Dynamic Simulaton.

Introduccion

Las proteínas de choque térmico son un grupo de proteínas evolutivamente conservadas presentes desde bacterias hasta células animales altamente especializadas. Son componentes integrales de la maquinaria celular especializada en responder a cambios ambientales, interviniendo en el correcto plegamiento y protección de las proteínas celulares. Algunas se expresan constitutivamente, mientras otras son inducidas por estrés, y permiten la supervivencia celular en condiciones altamente desfavorables. Además, ha sido reportado que estas proteínas son expresadas en altas concentraciones en células cancerosas por ejemplo indicando su posible participación en procesos oncogénicos (1), y por otro lado limitando en algunos casos la eficacia de los tratamientos anticancerígenos.

Ha sido demostrado que la sobreexpresión de algunas de éstas proteínas como las HSP70 (proteínas de choque térmico con peso molecular de 70 Kda) incrementan el potencial tumorigénico en células de roedores (2,3), mientras que su disminución favorece la regresión del tumor [4,5].

La quercetina es un flavonoide presente en diversidad de frutas y verduras. Se ha reportado infinidad de efectos farmacológicos dentro de los cuales podemos citar como agente antitumoral, inhibidor de la expresión de HSP (proteínas de shock térmico) [6] entre otros.

La expresión de las HSP inducibles por estrés esta regulada por el HSF (factor de choque térmico), el cual existe en forma inactiva monomérica y que al trimerizarse es capaz de unirse al DNA activando la transcripción de las HSP. La sola unión del trímero al DNA, no es por si sola suficiente para la transcripción de las proteínas durante el estrés [7]. Existen gran variedad de posibilidades

en las que la quercetina puede estar interviniendo en la competencia del proceso transcripcional. Por lo tanto es importante utilizar modelos computacionales que contribuyan a elucidar las posibles interacciones entre el flavonoide y proteínas como el HSF-1.

Materiales y métodos

Software: MOE, Pymol, Molegro, Gamess, NAMD, VMD, ClustalX, Gimp, Mandriva spring 2007.

Recursos web: PDB, Entrez, Hic-C

Hardware: BeoWolverine (Beowulf Facultad de Ciencias, PUJ), estaciones de trabajo HP.

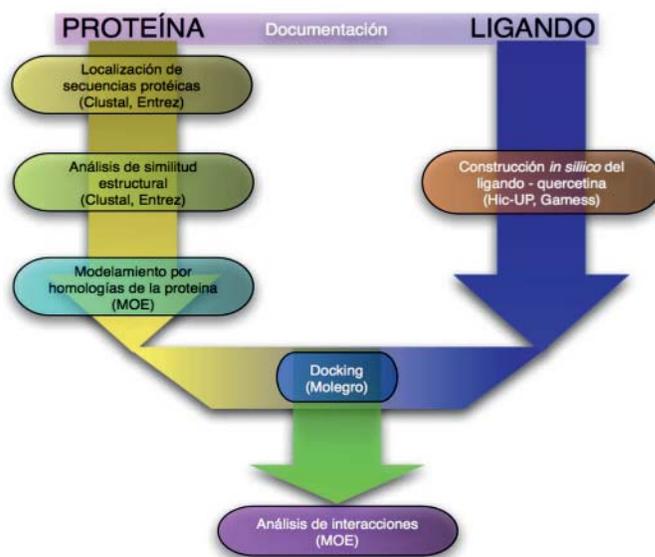


FIGURA 1. Esquema Metodológico. Fuente: Autores.

Metodología

En los procesos investigativos la recopilación bibliográfica es necesaria para dar inicio a la investigación, pero en el campo de la biología estructural se debe considerar como un paso indispensable. La información sobre la estructura de las moléculas a estudiar o moléculas similares es la base para la construcción de los modelos de interacción. La búsqueda está enfocada a localizar información sobre la estructura en cuestión o estructuras similares, especialmente las descritas por metodologías como la cristalografía de rayos X o resonancia magnética. Además es importante obtener información molecular sobre ligandos basándose en los reportes de interacciones con diferentes receptores.

Ligando

El tratamiento del ligando, en el caso particular de la quercetina (figura 2) consistió en la búsqueda del compuesto en el servicio web Hic-UP (8-10), sistema de información de hetero compuestos reportados en el Protein data Bank (PDB). En ella se encuentra información topológica de la molécula obteniéndose mayor información sobre los tipos de átomos y localización en el espacio (11,12).

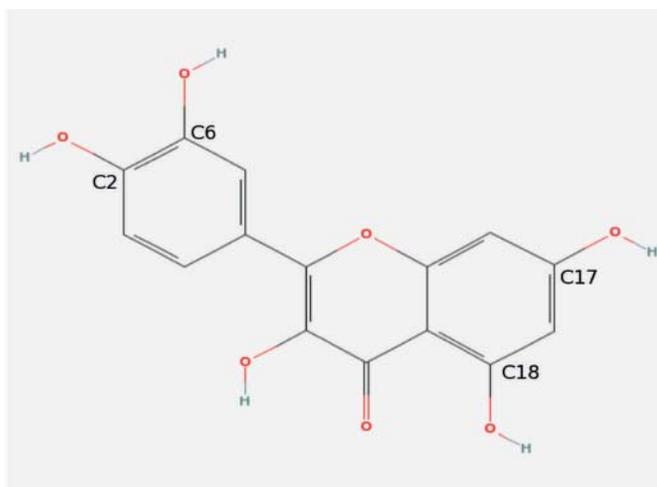


FIGURA 2. Estructura de la Quercetina, 3,5,7,3p,4p-pentahydroxyflavone. Fuente: Autores.

La estructura del ligando se optimizó utilizando métodos cuánticos con el nivel de teoría RHF/6-311G(2df,2p) sobre Gamess US (13-15). El proceso se realizó en un Beowulf con 12 procesadores Opteron® de 64bits en paralelo ubicado en la Facultad de Ciencias, Universidad Javeriana.

Proteína

El factor de shock térmico en humanos (GI:462333) consta de 529 aminoácidos, con por lo menos tres regiones funcionalmente relevantes para este trabajo; la primera es el sitio de unión con DNA (16), localizado entre los aminoácidos 1 y 90, una región altamente fosforilada (por lo tanto de baja estructuración) y una región en la cuál ocurre la interacción proteína-proteína, indispensable para el proceso de trimerización (6,7).

El HSF-1 humano no tiene estructura resuelta por cristalografía o resonancia, razón por la cual se realizó un modelo teórico basado en homologías estructurales. Dicho procedimiento utiliza el protocolo sugerido por MOE (Molecular Operating Environment) (17). Las aplicaciones para predicción de estructura fueron validadas por CASP, utilizando identificación por homologías, métodos de alineamientos y refinamiento que permiten una alta calidad en el proceso de predicciones de secuencia a estructura. El modelo se solató con una esfera de radio 25 Amstrongs, y posteriormente se minimizó con el campo de fuerza MMFF94X (21).

Docking

El docking se realizó utilizando el software privativo Molegro (18) con los siguientes parámetros: la estructura de la proteína obtenida por homología y del ligando con amortización por mecánica cuántica fueron usados para realizar el "Docking". Se utilizó el algoritmo MolDock Optimizer y el número de corridas fue de 10, dejando flexibles los enlaces del ligando para que rotaran durante el docking. El número de interacciones por corrida fue de 2000, obteniendo así, 5 poses. Se escogió la pose con menor energía de interacción y con un valor alto.

Al complejo ligando-proteína obtenido se le realizó un diagrama de interacción de ligando en MOE para observar las interacciones que resultaron de la ubicación del

ligando en la proteína por el docking. Finalmente se optimizó la estructura con el ligado con el campo de fuerza MMFF94X (19).

Resultados y Discusión

A la secuencia del HSF humano se le realizó alineamiento con HSF reportados en PDB. El segmento cristalizado reportado comprende la región de interacción con el DNA y algunos residuos adicionales. En la figura 3 se ve claramente una homología importante en el sitio de unión con DNA, lo cual permite pensar en la generación de un modelo basado en estas estructuras. En la gráfica 4 se observa la interacción del HSF de *Kluyveromyces lactis* con DNA (de color verde), donde se nota que esta región (color lila), con respecto al sitio de interacción proteína-proteína (en blanco) son dos regiones separadas, demostrando cómo el sitio de unión con DNA no interfiere de manera alguna con el posible sitio de interacción proteína-proteína.

El modelo realizado presenta alta homología estructural ,como se ve en la figura 5, (en azul) con los obtenidos

por métodos cristalográficos (en rojo) con un RMSD del esqueleto carbonado de valor 2,9 Las regiones altamente estructuradas, es decir hélices alfa y pliegues beta, se conservan en el modelo así como las regiones de interacción con DNA y la región de posible interacción entre proteínas, siendo coherente con la alta homología en estructura primaria y permitiendo utilizar el modelo para simular la posible interacción con el ligando quercetina. De este modelo se puede notar que es similar al obtenido cristalográficamente con *Kluyveromyces Lactis*, esto es los “wing” y “turn”, (figura 5) se conservan promoviendo la interface clásica proteína-proteína.

En relación al Docking el sitio de unión con la quercetina no está localizado en el sitio de unión con DNA. Littlefield y Nelson (20), proponen a Arg 250 y Ser 247 como residuos esenciales en la interacción con DNA, pero también incluyen a los residuos Arg 228, y Val 255, residuos con posiciones relativas altamente conservadas y presentes en el modelo de HFS humano (figura 6).

La quercetina presentó interacción con los residuos Asn 53, Glu 74, Gln 75, His 72, (figuras 6 y 8), formado

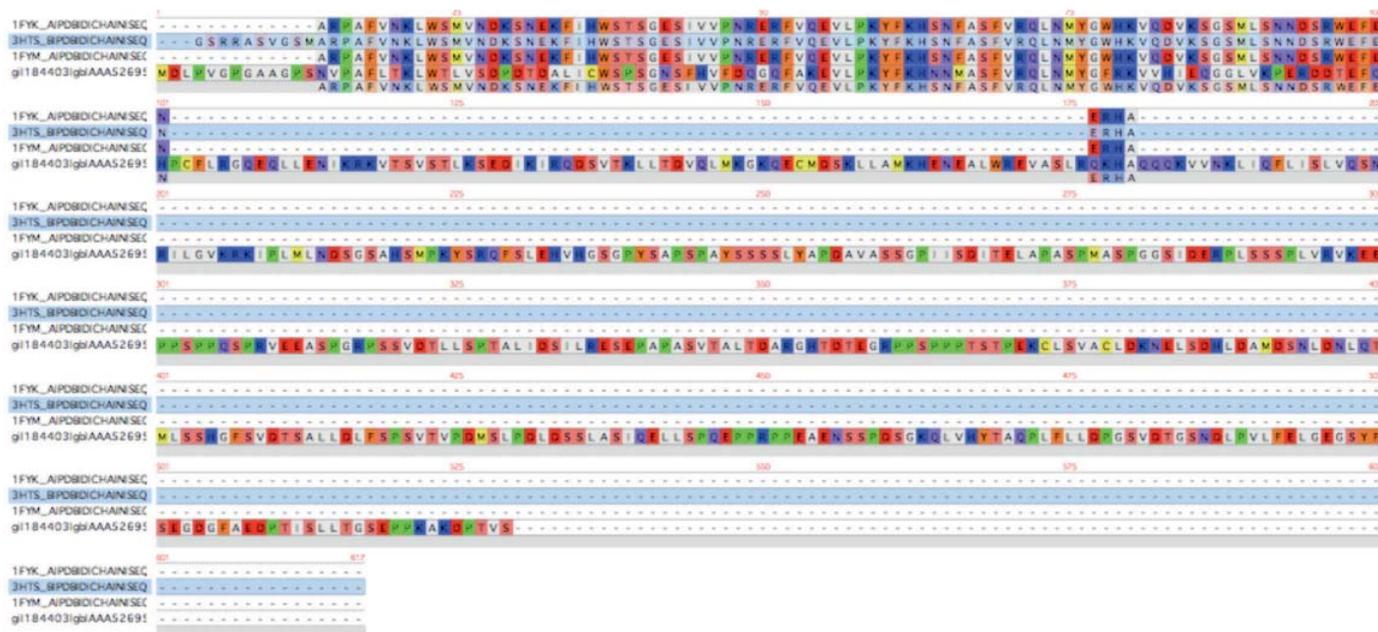


FIGURA 3. Alineamiento de la secuencia reportada de Factor de Shock Térmico humano (FSH) con las secuencias de los segmentos de FSH resueltos por cristalografía. Fuente: Autores

interacciones de tipo electrostático y de puentes de hidrógeno, entre los grupos hidroxilos de los carbonos C17, C18, C6 y C2, (figuras 2 y 8). Estas interacciones se ubican en los dos planos que se forman en la quercetina, con los hidroxilos ubicados en los extremos de la molécula, haciendo que la interacción con la proteína sea estable, por lo que se sugiere que el loop no tendrá igual movilidad con quercetina que sin quercetina, afectando entonces cualquier posible interacción que ésta pueda formar. La interacción se encuentra localizada próxima a la llamada “ala” (20), generando impedimentos alostéricos al fijar lo que podría denominarse el “axila del ala”, esta interacción debe impedir la formación de los trímeros de HFS, según Otis (20) los contactos entre los loops con alta flexibilidad, que también son llamados “wing” de un monómero y las “turn” del otro monómero, forman una interface clásica proteína-proteína, en donde según este autor se promueven las interacciones entre los monómeros para formar trímeros. Como se observa en la gráfica (Figura 7) la Quercetina se ubica espacialmente en una de estas vueltas, “turn”, creemos que la interacción entre el ligando y la vuelta hace que se pierda la interface proteína-proteína, de tal manera que la trimerización se vería afectada por el ligando, impidiendo su acción promotora de proteína de shock térmico, es de notar que el sitio de interacción tiene las dimensiones para alojar una molécula con la configuración de este flavonoide y que sustituciones del grupo

hidroxilo por grupos de volúmenes un poco más grandes impedirán posiblemente dicha interacción (figura 7), produciendo como efecto la traducción de proteína de shock térmico en la condiciones normales.

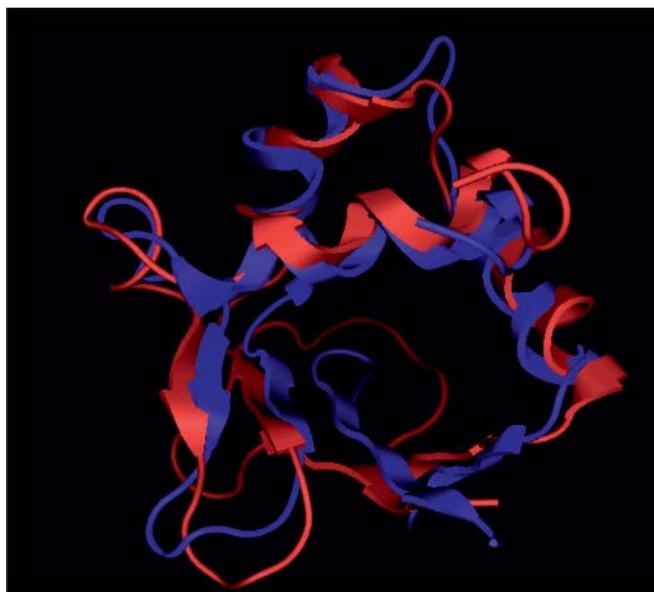


FIGURA 5. RMSD entre el modelo por homología obtenido, en rojo y el Factor de Shock térmico código pdb 3HTS, en azul. Fuente: Autores

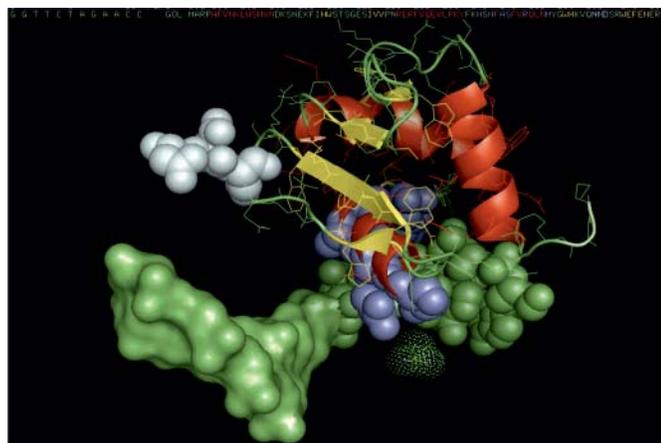


FIGURA 4. HFS de Kluyveromyces lactis (3HTS en PDB), se ve la representación del ácido nucleico en verde y de los residuos que interactúan con él en lila, en blanco los residuos que probablemente estén implicados en la relación proteína-proteína. (imagen construida con Pymol). Fuente: Autores

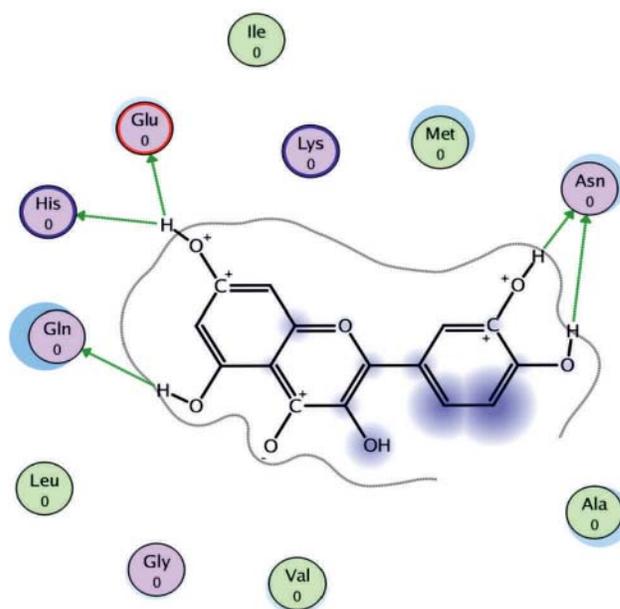


FIGURA 6. Diagrama de interacción de la quercetina con la HFS1 humano. Fuente: Autores

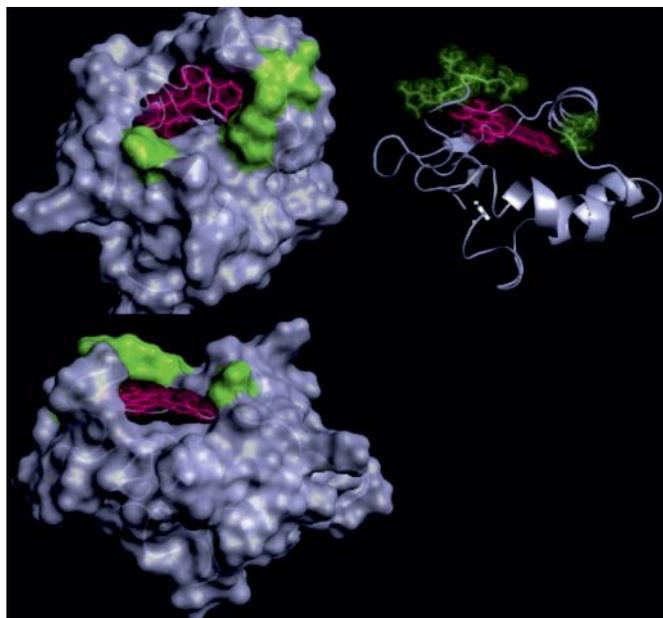


FIGURA 7. Docking de la Quercetina con el modelo de HFS humano. En Rojo la quercetina en verde los residuos con los cuales tiene interacción. Fuente: Autores

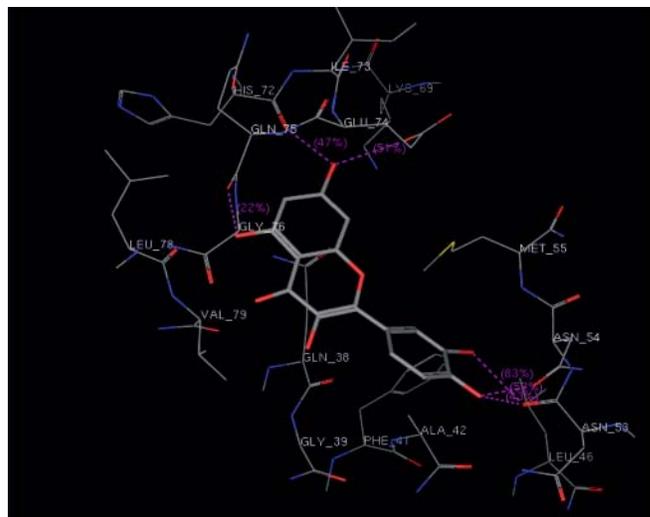


FIGURA 8. Detalle del docking de la quercetina con los residuos con los que interactúa. La nomenclatura corresponde a la del segmento de interacción con HFS humana. Fuente: Autores

Bibliografía

1. Jaattela M.. Escaping cell death: survival proteins in cancer. *Exp. Cell Res.* 1999;248(1):30-43.
2. Jaattela M.. Over-expression of hsp70 confers tumorigenicity to mouse fibrosarcoma cells. *Int. J. Cancer.* 1995;60(5):689-693.
3. Garrido C., Fromentin A., Bonnotte B., Favre N., Moutet M., Arrigo A.P., et al. Heat shock protein 27 enhances the tumorigenicity of immunogenic rat colon carcinoma cell clones. *Cancer Res.* 1998;58(23):5495-5499.
4. Jaattela M., Wissing D., Kokholm K., Kallunki T., Egeblad M. Hsp70 exerts its anti-apoptotic function downstream of caspase-3-like proteases. *EMBO J.* 1998;17(21): 6124-6134.
5. Gurbuxani S., Bruey J.M., Fromentin A., Larmonier N., Parcellier A., Jaattela M., et al. Selective depletion of inducible HSP70 enhances immunogenicity of rat colon cancer cells. *Oncogene.* 2001;20(51):7478-7485.
6. Hosokava N., Hirayoshi K., Nakai A., Hosokava Y., Marui I., Yoshida M., et al. Flavonoids inhibit the expression of heat shock proteins. *Cell Struct. Funct.* 1990;15(6):393-401.
7. Hansen R. K., Oesterreich S., Lemieux P., Sarge K. D., S. Fuqua A. W. Quercetin Inhibits Heat Shock Protein Induction but Not Heat Shock Factor DNA-Binding in Human Breast Carcinoma Cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997;239(3):851-856 .
8. Kleywegt, G.J. Crystallographic refinement of ligand complexes. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 2007;63(Pt 1):94-100.
9. Kleywegt, G.J., Henrick, K., Dodson, E.J., Van Aalten, D.M.F. Pound-wise but penny-foolish - How well do micromolecules fare in macromolecular refinement ?. *Structure.* 2003;11(9):1051-1059.
10. Kleywegt, G.J. and Jones, T.A. Databases in protein crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 1998;54(Pt 6 Pt 1):1119-1131.
11. Humphrey, W., Dalke, A. and Schulten, K. "VMD - Visual Molecular Dynamics". *J Mol Graph.* 1996;14(1):33-38, 27-28.
12. Visual Molecular Dynamics [internet]. Illinois: University of Illinois at Urban Champaign; c2006. [Consultado 2010 oct 15]. Disponible en: <http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/>
13. Schmidt M.W., Baldrige K.K., Boatz J.A., Elbert S.T., Gordon M.S., Jensen J.H., et al. "General Atomic and Molecular Electronic Structure System. *J. Comput.Chem.* 1993;14(11):1347-1363.
14. Gordon M.S., Schmidt M.W. Advances in electronic structure theory: GAMESS a decade later. En: Dykstra C.E., Frenking G., Kim K.S., Scuseria G.E. *Theory and Applications of Computational Chemistry, the first forty years.* Amsterdam: Elsevier; 2005. p. 1167-1189.
15. General Atomic and Molecular Electronic Structure System (GAMESS) [internet]. Iowa: Iowa State University; c2007. [Consultado 2008 oct 12]. Disponible en: <http://www.msg.ameslab.gov/GAMESS/GAMESS.html>
16. Marchler-Bauer A, Anderson JB, Derbyshire MK, DeWeese-Scott C, Gonzales NR, Gwadz M, et al. CDD: a conserved domain database for interactive domain family analysis. *Nucleic Acids Res.* 2007;35(Database issue):D237-240.

17. Chemical Computing Group [internet]. Montreal, Quebec, Canada: Chemical Computing Group; c1994. [Consultado 2007 oct 10]. Disponible en: <http://www.chemcomp.com/>
18. Thomsen R., Christensen M.H. MolDock: A New Technique for High-Accuracy Molecular Docking. *J Med Chem.* 2006;49(11):3315-3321.
19. Halgren T. A. Merck Molecular Force Field. I. Basis, Form, Scope, Parameterization and Performance of MMFF94. *J. Comp.Chem.* 1996;17(5&6):490-519.
20. Littelfield, O; Nelson, H.C.M.. A new use for the “wing” of the “winged” helix-turn-helix motif in the HSF-DNA cocrystal. *Nature Structural Biology.* 1999;6(5):464-470.