

Evaluación del impacto funcional de la sustitución "A" por "T" en la proteína TGFB2: análisis in silico

Evaluation of the functional impact of replacing "A" to "T" on TGFB2 proteín: in silico analysis

Eliana Liseth Prado¹, Erick Rafael Jimenez¹, Julio César Osorio²

RESUMEN

El Factor de Crecimiento Transformante Beta (TGF-β) pertenece a la familia de las citoquinas y funciona como un péptido señal que regula la proliferación, diferenciación, adhesión, migración de diferentes tipos de células. Por medio de una estrategia bioinformática (In-Silico) se pretende evaluar el efecto que tiene la sustitución del aminoácido Lisina por la Treolina en el cristal de la proteína 2TGI del TGFB2. Con el programa Protein Data Bank (PDB) se seleccionó la estructura en cristal. Posteriormente, con el programa PolyPhen2 se evaluó el posible impacto de la sustitución, y por último con el programa software DeepView-Swiss-PubViewer se visualizó la conformación tridimensional y la energía libre de Gibbs. Se pudo concluir que una sustitución de Alanina por Treonina en la posición 74 desestabiliza e impacta funcionalmente la proteína TGBF2.

Palabras Clave: TGF-β, In-silico, bioinformática, SNP, sustitución aminoácidos

ABSTRACT

The transforming growth factor beta (TGF-β) belongs to the family of cytokines and functions as a signal peptide that regulate the proliferation, differentiation, adhesion, migration of different cell types. Through a bioinformatics strategy (In-silico) were evaluated the effect of the replacement of a Alanine by a Treolina in the protein crystal 2TGI (TGFB2). With the Protein Data Bank (PDB) program was chosen the glass structure. In addition, the PolyPhen2 program was assessed the possible impact of substitution. Finally the Swiss-PubViewer. DeepView-dimensional program was visualized the conformation and Gibbs free energy. It was concluded that a substitution of Alanina by Threonine at position 74 destabilizes and impacts functionally the TGBF2 protein.

Keywords: TGF-β, In-silico, bioinformatics, SNP, amino acid substitution

Grupo de Investigación - Ciencias Odontológicas UNICOC

1. Residentes 2 año de Especialización en Ortodoncia y Ortopedia Maxilar - UNICOC, Santiago de Cali.
2. Biólogo, Maestría en Ciencias con énfasis en Genética
Autor responsable de correspondencia: Julio César Osorio
Correo electrónico: jcosorio@unicoc.edu.co

Citar como: Prado EL, Jiménez ER, Osorio JC. Evaluación del impacto funcional de la sustitución K por T en la proteína TGFB2: análisis in silico. Journal Odont Col. 2015;8(16):45-56

Recibido: Septiembre 2015, aceptado: Noviembre 2015

INTRODUCCIÓN

El gen TGF- β ubicado en el cromosoma 1q41, codifica uno de los miembros de la familia de las citoquinas (péptidos multifuncionales que regulan la proliferación, diferenciación, adhesión, migración, y otras funciones en muchos tipos de células) denominado Factor de Crecimiento Transformante Beta (TGF- β), la regulación de este proceso lo hace mediante la transducción de su señal a través de receptores transmembrana tipo I y II (TGFBR1 y TGFBR2) y sus efectores (proteínas Smad).¹

Las proteínas Smad constituyen una familia de proteínas que funcionan a nivel celular como segundo mensajero; propagan señales intracelulares que se transducen en acciones extracelulares con la participación de ligandos del Factor de Crecimiento Transformante Beta, hasta el núcleo celular donde activan la transcripción de genes.² Por otra parte, se ha determinado que el TGF- β 2 puede participar como regulador de la diferenciación del epitelio durante el desarrollo dental (entre 13 y 20 semanas de gestación), además de participar en la tumorigénesis de las neoplasias odontogénicas³ cuando ocurre una desregulación ocasionando crecimiento incontrolado y la formación de tumores.

Un genoma individual contiene aproximadamente 3.7 millones de variantes de nucleótidos los cuales pueden ser identificados por secuenciación del genoma. Los geneticistas, hoy día analizan los que sucede cuando hay variantes causales para el fenotipo o en la presentación de una enfermedad, es por eso que se

utilizan algoritmos como el SIFT (Sorting Intolerant from Tolerant) que permite predecir el posible impacto de la sustitución de un aminoácido en la función de la proteína, en este caso la proteína a analizar es el factor de crecimiento beta 2, la cual tiene especial papel en los procesos de reparación tisular que incluye la regeneración y la cicatrización de heridas, formación de tejido óseo y modulación de funciones inmunes.

MÉTODOS:

En la página web del Programa Protein Data Bank (PDB) <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do> se realizó la búsqueda de un cristal de la proteína TGFB2. Se escogió la estructura en cristal del Factor de Crecimiento Transformante Beta2 con código 2TGI. A ese cristal se le analizó su secuencia de aminoácidos y los polimorfismos de un solo nucleótido o SNPs (Single Nucleotide Polymorphism), que son una variación en la secuencia de ADN que afecta a una sola base adenina-A, timina-T, citosina-C o guanina-G) de una secuencia del genoma. (Figura 1). Solo se evaluó la posición 74 que evalúa la sustitución del aminoácido Alanina (A) por el aminoácido Treonina (T). Se generó un archivo PDB y otro FASTA con la secuencia de la proteína.

Posteriormente se utilizó la página Web del programa PolyPhen2 <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/> con el fin de tratar de predecir el posible impacto de una sustitución de aminoácido en la estructura y función de una proteína humana usando consideraciones físicas y comparativas directas. Luego, gracias al sof-

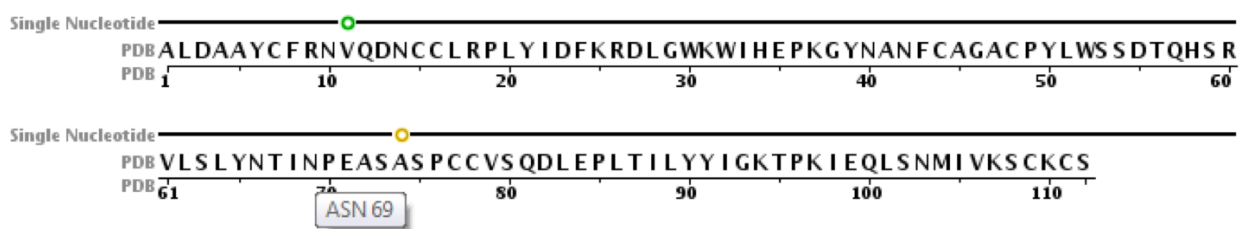


Figura 1

Secuencia de aminoácidos del cristal 2TGI de la proteína TGFB2. La línea seguida representa la proteína cristalizada. Los diferentes puntos en la secuencia representan SNPs.

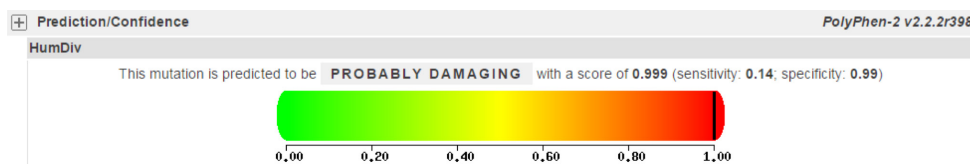


Figura 2

Probabilidad del daño del cambio del aminoácido Alanina (A) por el aminoácido Treonina (T) en el cristal de la proteína 2TGI del gen TGFB2.

tware DeepView-Swiss-PubViewer descargado de la página Web <http://spdbv.vital-it.ch/>, se logró establecer cambios en la estructura terciaria de la proteína TGFB2 pertenecientes al cristal 2TGI.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al someter la secuencia FASTA de la proteína cristalizada 2TGI al programa SIFT (Sorting Intolerant from Tolerant) se evaluó la sustitución en la secuencia del aminoácido Alanina (A) en la posición 74 por el aminoácido Treonina (T), se puede apreciar en la figura 2 que ésta sustitución afecta negativamente la proteína y se genera una probabilidad de daño de 1,0.

La modelación tridimensional de la proteína se realizó con el software DeepView-Swiss-PubViewer (también conocido como DeepView) que es una aplicación que proporciona una interfaz fácil de usar que permite analizar varias proteínas al mismo tiempo, las cuales se pueden superponer con el fin de deducir las alineaciones estructurales y comparar sus sitios activos o cualesquiera otras partes pertinentes. Mutaciones de aminoácidos, enlaces de H, ángulos y distancias entre los átomos son fáciles de obtener, gracias a la interfaz gráfica y un menú intuitivo. (Figura 3 y 4)

Este software también permite calcular la energía libre de Gibbs que provee información relacionada con la espontaneidad de las reacciones biológicas. Permite la visualización de como los tres aminoácidos interactúan y el efecto que causa el cambio del aminoácido Alanina (A) por el aminoácido Treonina (T).

En este caso, el objeto de estudio puede verificar que el aminoácido nativo u original Alanina (A) presenta una energía libre de Gibbs de 0.26 KJ/mol, pero al realizar la sustitución por Treonina (T) la energía libre de Gibbs cambia hasta -19.18 KJ/mol. Es interesante que el aminoácido Alanina confiera una conformación de la proteína menos espontánea y que Treonina, aunque es mucho más negativo, sea catalogado como una sustitución probablemente dañina por PolyPhen2.

CONCLUSIÓN

De acuerdo a los análisis realizados se puede concluir que una sustitución de Alanina por Treonina en la posición 74 desestabiliza e impacta funcionalmente la proteína TGFB2 lo que aumenta la probabilidad de que esta no sea funcional.

Estos problemas en la proteína podrían afectar la función reguladora que tiene TGFB2 en procesos como la proliferación, diferenciación, adhesión, migración,

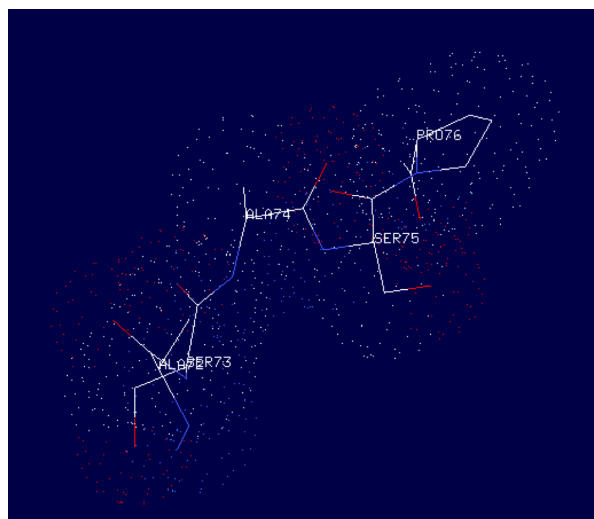


Figura 3

Análisis de la estabilidad de las proteínas en el software DeepView-Swiss-PubViewer. Se muestra de la estructura de la proteína con el aminoácido Alanina en la posición 74.

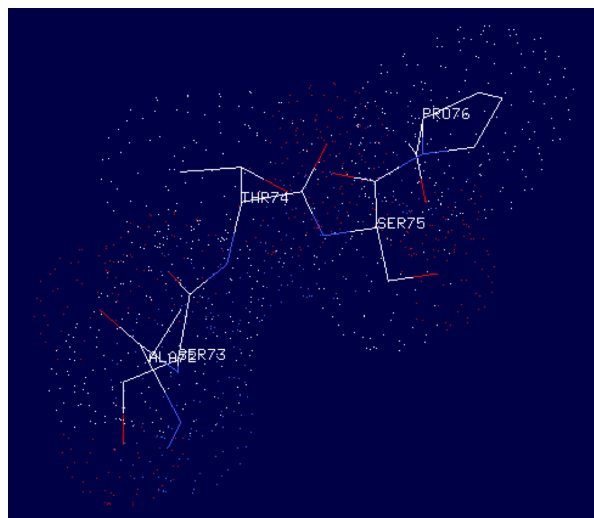


Figura 4

Análisis de la estabilidad de las proteínas en el software DeepView-Swiss-PubViewer. Se muestra de la estructura de la proteína con la sustitución del aminoácido Alanina por Treonina en la posición 74.

entre otras funciones. Además, TGFB2 es un regulador de la diferenciación del epitelio durante el desarrollo dental (entre 13 y 20 semanas de gestación) y la tumorigénesis de las neoplasias odontogénicas.

Esta investigación contribuye al conocimiento de la relación de los diferentes SNP con procesos como los tumores odontogénicos de origen epitelial (ameloblastomas) y origen epitelial-ectomesenquimal (fibromas ameloblásticos), que presentan mRNA de TGF beta 2.

REFERENCIAS

1. Clark DA, Coker R (1998). "Factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta)". *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 30 (3): 293 a 8. Doi: 10.1016 / S1357-2725 (97) 00128-3. PMID 961177
2. Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P (December 1997). «TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins». *Nature* 390 (6659): 465-71.
3. Heikinheimo, K., Happonen, R. P., Miettinen, P. J., & Rittvos, O. (1993). Transforming growth factor beta 2 in epithelial differentiation of developing teeth and odontogenic tumors. *Journal of Clinical Investigation*, 91(3), 1019