

Trabajo Fin de Grado
Grado en Bioquímica y Biología Molecular

Expresión, purificación y caracterización funcional de BCL-B (Bcl-2-like protein 10)

Autor:
Diego Grande Izquierdo

Directores:
Héctor Flores Romero
Oihana Terrones Urio

ÍNDICE

1. Introducción y objetivos	1
2. Materiales y métodos	3
2.1. Generación del mutante BCL-B R86D	3
2.1.1. Mutagénesis de BCL-B	3
2.1.2. Transformación de bacterias competentes	4
2.1.3. Extracción del DNA plasmídico	4
2.2. Expresión y purificación de BCL-B silvestre y R86D	4
2.2.1. Ensayos de expresión de BCL-B WT	4
2.2.2. Purificación de GST-BCL-B Δ C-6His WT y R86D	5
2.3. Ensayos en sistemas reconstituidos	6
2.3.1. Preparación de vesículas unilamelares grandes con ANTS/DPX	6
2.3.2. Ensayo de liberación de ANTS/DPX	6
2.4. Ensayo de permeabilización de mitocondrias	7
3. Resultados	7
3.1. Obtención del mutante BCL-B R86D	7
3.2. Expresión heteróloga de BCL-B	8
3.3. Purificación de BCL-B	10
3.4. Ensayos funcionales con BCL-B	11
3.4.1. Ensayos de liberación de ANTS-DPX en LUVs	11
3.4.2. Ensayos de permeabilización de mitocondrias	12
4. Discusión	13
5. Conclusiones	14
6. Bibliografía	14

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

La apoptosis es un tipo de muerte celular programada y regulada que se caracteriza por no causar ningún tipo de respuesta inflamatoria [1]. Es esencial durante el desarrollo de organismos multicelulares y también en el mantenimiento de la homeostasis en los tejidos adultos. Por eso, un aumento o disminución de la frecuencia de apoptosis puede desencadenar enfermedades tales como el cáncer o patologías neurodegenerativas [2].

Existen dos vías que activan la apoptosis, según el agente inductor: la vía extrínseca y la vía intrínseca, también llamada vía mitocondrial [3]. La vía extrínseca comienza con la unión de factores extracelulares (p. ej. FasL y TNF- α) a sus receptores de membrana y provoca la activación de diversas caspasas en cascada (caspasas 3, 7 y 8, entre otras), que son necesarias para ejecutar la muerte celular por apoptosis.

La vía mitocondrial, en cambio, es causada por estímulos intracelulares como el daño irreversible al DNA o el exceso de estrés oxidativo, que causan la permeabilización de la membrana mitocondrial externa (PMME). Consecuentemente, se liberan factores apoptogénicos al citosol, como el citocromo c, AIF y Smac/DIABLO que desencadenan la formación de un complejo proteico llamado apoptosoma. Este está compuesto por algunos de los factores mencionados y otras proteínas como APAF1, y es capaz de reclutar y activar una caspasa iniciadora: la caspasa 9. A continuación, ésta activa en cascada a otras caspasas ejecutoras, tales como las caspasas 3 y 7, que llevarán a cabo la apoptosis [4].

La PMME se considera el punto de no retorno en la cascada apoptótica [3,4] y está mayoritariamente regulada por la familia de proteínas BCL-2 (B-cell lymphoma-2). Estas se localizan sobre todo en la membrana mitocondrial externa y se clasifican en tres grupos según su función y su contenido en dominios de homología con BCL-2 (dominios BH) [5], proteína que dio nombre al grupo: i) las proapoptóticas multidominio (BAX, BAK y BOK), ii) las proapoptóticas “BH3-only” (BIM, BID, BAD, etc.) y iii) las antiapoptóticas multidominio (BCL-2, BCL-X1, BCL-B, BFL-1, etc.). Todos los miembros multidominio, tanto los proapoptóticos como los antiapoptóticos, adoptan una conformación globular similar [2], con una hélice hidrofóbica central ($\alpha 5$) rodeada por siete hélices anfipáticas ($\alpha 1-4$ y $\alpha 6-8$). Se denominan así porque poseen entre tres y cuatro dominios BH (BH1-BH4) y un dominio transmembrana (TM) mediante el cual se pueden anclar a la membrana mitocondrial externa (MME). En cambio, las proteínas “BH3-only” sólo contienen el dominio BH3 aparte del dominio TM [6].

Las proteínas BCL-2 forman una red de interacciones que regula la PMME [7]. Los miembros “BH3-only” son activados por los estímulos apoptóticos mencionados anteriormente [8]. Entonces, los miembros “BH3-only” activadores (p. ej. BID y BIM) se pueden unir directamente a los proapoptóticos multidominio (BAX y BAK). Esto permite a los segundos anclarse a la MME, oligomerizar y formar poros que efectúan la PMME. Los miembros antiapoptóticos bloquean este proceso secuestrando tanto a los “BH3-only” activadores como a las propias proteínas proapoptóticas multidominio. Asimismo, hay otros miembros “BH3-only” denominados sensibilizadores que posibilitan la PMME de forma indirecta, uniéndose a los miembros antiapoptóticos y evitando que secuestren a los “BH3-only” activadores o a los proapoptóticos multidominio.

Se ha observado que la mayoría de las interacciones de esta red ocurren mediante el mecanismo “BH3-in-groove” [9,10], es decir, una proteína inserta su dominio BH3 en un bolsillo hidrofóbico presente en la otra. Hay 5 residuos hidrofóbicos esenciales en esta unión (h0 a h4) y también se forma un puente salino entre un residuo de Asp conservado en el dominio BH3 y un residuo de Arg en el bolsillo de la otra proteína [2].

La proteína antiapoptótica BCL-B

BCL-B fue el último miembro antiapoptótico identificado de la familia BCL-2 [11]. Esta proteína destaca porque su secuencia comparte un nivel bajo de identidad (25%) con la del resto de miembros de su grupo y apenas ha sido caracterizada. Se ha observado que su expresión es ubicua en los tejidos humanos [12] y está sobreexpresada en varios tipos de cáncer, tales como el de colon, páncreas y algunos tipos de leucemia. Además, un aumento en el número de copias del gen de BCL-B ha sido relacionado a una mayor resistencia a los fármacos antineoplásicos [11].

En estudios previos se ha comprobado que esta proteína es capaz de bloquear la apoptosis inducida por BAX, pero no BAK [11, 13]. Sin embargo, el mecanismo que subyace a esta inhibición queda todavía por dilucidar.

Por esta razón, en este trabajo se ha diseñado un mutante de BCL-B (R86D) que provoca la disrupción del puente salino Arg-Asp, esencial para la interacción “BH3-in-groove” con miembros proapoptóticos. De esta manera, se desea analizar si BCL-B ejerce su acción antiapoptótica por el mecanismo mencionado. Al mismo tiempo, dado que todavía ningún grupo ha conseguido expresar y purificar de forma eficiente este miembro de la familia BCL-2, otro objetivo de este trabajo es la optimización de ambas etapas.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. GENERACIÓN DEL MUTANTE BCL-B R86D

2.1.1. Mutagénesis de BCL-B

Se partió del plásmido pGEX-6p con el constructo de 48 kDa que contiene el gen de la proteína BCL-B con una etiqueta de GST N-terminal y otra etiqueta de 6 histidinas en el extremo C-terminal (**Figura 1**). La secuencia posee sitios de corte para la proteasa del rinovirus humano (HRV) y la proteasa del virus del grabado del tabaco (TEV) para cortar la etiqueta de GST y la cola de polihistidinas, respectivamente. El gen de BCL-B carece de la secuencia codificante para los 20 aminoácidos C-terminales, ya que en anteriores trabajos se había descrito que estos disminuyen mucho la solubilidad de la proteína y la eficiencia de purificación [11].



Figura 1. Esquema del constructo utilizado para la mutagénesis y expresión de BCL-B. Las flechas señalan lugares de corte para las proteasas indicadas.

El plásmido pGEX-6p-BCL-B fue sometido a mutagénesis dirigida por PCR usando QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies). El mutante R86D se consiguió utilizando los siguientes cebadores: forward 5'-GTCCGACCTGG GGTGATGTGGTGACCCTG-3' y reverse 5'-CAGGGTCACCACATCACCCCAGGT CGGAC-3'. Ambos fueron sintetizados por Sigma Aldrich y tenían una temperatura de fusión (T_m) de 82,7°C y un contenido en GC de 65,5%. Las muestras para PCR se prepararon siguiendo el manual del propio kit (1 ng/ μ L del plásmido molde, 2,5 ng/ μ L de cada cebador, 5 μ L 10x tampón de reacción, 10 mM mezcla de dNTPs, 2,5 U de DNA polimerasa Pfu Turbo y ddH₂O hasta 50 μ L). Las condiciones en que se realizó la PCR se muestran en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Condiciones de cada etapa de la PCR.

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Nº de ciclos
<i>Desnaturalización inicial</i>	95	2	1
<i>Desnaturalización</i>	95	1	30
<i>Hibridación</i>	55	1	
<i>Extensión</i>	72	10	
<i>Extensión final</i>	72	12	1

El producto de la PCR fue incubado durante 90 min a 37°C con la endonucleasa DpnI, que degrada el DNA molde metilado por *Escherichia coli*. De esta forma, se aisló la forma mutada del plásmido que después se usó para transformar *E. coli* DH5 α .

2.1.2. Transformación de bacterias competentes

Se incubaron 50 μ L de bacterias *E. coli* DH5 α con 100 ng de DNA plasmídico durante 30 min en hielo. Entonces se realizó un choque térmico a 42°C durante 60 s y se volvieron a incubar en hielo durante 10 min. Después se añadió 1 mL de medio Luria Broth (LB) a las células y se mantuvieron en agitación suave a 37°C durante 1 h. A continuación, se centrifugaron a 8000x g durante 1 min y las células sedimentadas fueron resuspendidas en 100 μ L de LB. Por último, se sembraron en placas de agar con antibiótico y se cultivaron a 37°C durante toda la noche para permitir únicamente el crecimiento de las colonias con el plásmido de interés.

2.1.3. Extracción del DNA plasmídico

Se seleccionaron aleatoriamente varias colonias de la placa y se cultivaron por separado en 10 mL de medio LB con antibiótico (ampicilina, 100 μ g/mL). A partir de ahí, la purificación del DNA plasmídico se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del kit comercial QIAprep Spin Miniprep (Qiagen). La concentración final de DNA y su pureza se determinaron midiendo la absorbancia a 260 nm y el ratio A_{260}/A_{280} , respectivamente. Finalmente, se secuenció (Secugen) cada colonia para verificar la presencia de la mutación.

2.2. EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE BCL-B SILVESTRE (WT) Y R86D

2.2.1. Ensayos de expresión de BCL-B WT

Para testar la expresión de BCL-B WT, se transformaron células *E. coli* como se describe en la sección anterior, se seleccionaron varias colonias de la placa y se inocularon en 10 mL de medio líquido con antibiótico. Los cultivos se incubaron en agitación a 37°C durante toda la noche y al día siguiente se escalaron inoculando 500 μ L en 15 mL de medio fresco con el antibiótico correspondiente. Estos cultivos se incubaron de la misma forma que los anteriores hasta que llegaron a una densidad óptica a 600 nm (OD_{600}) específica. Entonces se indujo la expresión de proteína mediante la adición de isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG). El cultivo se mantuvo en agitación durante 18 h a 18°C. Finalmente, las bacterias se recogieron por centrifugación a 8000x g durante 1 min y se analizaron mediante SDS-PAGE al 15%.

También se realizó un Western Blot para verificar la presencia de BCL-B usando anticuerpos monoclonales anti-GST y anti-histidinas (Santa Cruz Biotechnology).

Este ensayo se realizó en diez cepas distintas de la bacteria y también se probó en dos medios de cultivo diferentes (Luria Broth y Terrific Broth), varias OD₆₀₀ de inducción (0,4 a 1,6) y dos concentraciones de IPTG (0,1 mM y 0,5 mM).

Las cepas de *E. coli* testadas fueron las siguientes: BL21, habitualmente usada para la expresión de todo tipo de proteínas recombinantes; BL21CodonPlus (BL21C+) y Rosetta, que contienen copias adicionales de genes de tRNAs poco comunes en *E. coli* para mejorar la expresión de proteínas heterólogas; Rosetta-gami, que permite una mejor formación de puentes disulfuro en las proteínas que expresa; C41, C43 y sus variantes con pLys, especializadas en la síntesis de proteínas tóxicas para *E. coli*; y por último, M15 y SG, que contienen múltiples copias del plásmido pREP4 con el gen lacI, el cual permite un control más restrictivo de la expresión basal de la proteína de interés.

2.2.2. Purificación de GST-BCL-BAC-6His WT y R86D

La expresión se realizó en *E. coli* BL21C+, inoculando varias colonias en 250 mL de LB con antibiótico e incubando el cultivo en agitación a 37°C durante la noche. A continuación se hizo el escalado a 1 L de medio de cultivo para realizar la inducción tal y como se ha descrito anteriormente. Finalmente, las células se recogieron por centrifugación a 5000x g durante 15 min a 4°C usando una centrífuga Beckman Coulter con el rotor JLA-9.100. El sedimento de bacterias se almacenó a -80°C hasta el momento de la purificación.

Los sedimentos de bacterias se resuspendieron en tampón A (150 mM NaCl, 50 mM Na₂HPO₄, 1 mM EDTA, 1 mM TCEP, 10% glicerol a pH 7,4) suplementado con 1 mg/mL de lisozima, inhibidores de proteasas bacterianas (cOmpleteTM EDTA-free, Sigma-Aldrich) y 2,5 µg/mL de DNasa. Las células fueron lisadas con un homogeneizador Emulsiflex-C5 a 17000 psi y el lisado fue centrifugado a 30000x g durante 30 min a 4°C. Se desechó el sedimento y el sobrenadante se hizo pasar por filtros Millex-GP de tamaño de poro 0,45 µm.

Para el primer paso de purificación se utilizó una columna de Glutación Sepharosa 4B. Por cada 2 L de cultivo se usó 1 mL de microesferas de la columna preequilibradas con tampón A, que conformaron el lecho de la columna de afinidad. Los sobrenadantes fueron incubados durante 2 h a 4°C con las microesferas para permitir una unión eficiente de GST a las mismas. A continuación se empacó la columna con la proteína unida a las microesferas, se lavó con 20 volúmenes de columna (CV) de tampón A y se

eluyó en 5 mL de tampón B (150 mM NaCl, 50 mM Na₂HPO₄, 1 mM TCEP, 10 mM imidazol, 10% glicerol a pH 7,4) suplementado con 20 mM glutatión.

En el siguiente paso, el volumen eluido fue incubado con 2 mL de microesferas de agarosa con Ni-NTA lavadas y preequilibradas con tampón B durante 2 h a 4°C. A continuación las microesferas con la proteína unida se empacaron y se lavaron dos veces con 20 CV de tampón B y se eluyeron con 1 mL de tampón B con 400 mM imidazol.

Finalmente, la proteína se cargó en una columna Superdex 75 (GE Healthcare) de tamizado molecular para retirar el imidazol y testar la naturaleza monomérica de BCL-B. En todos los pasos de la purificación se tomaron muestras para analizarlas por SDS-PAGE al 15% y tinción azul de Coomassie.

2.3. ENSAYOS EN SISTEMAS RECONSTITUIDOS

2.3.1. Preparación de vesículas unilamelares grandes (Large Unilamellar Vesicles, LUVs) con ANTS-DPX

Los LUVs fueron preparados con una mezcla de cuatro lípidos en proporciones molares 45:30:10:15 (PC:PE:PI:CL), mimetizando la composición de la membrana mitocondrial externa [14,15]. Los lípidos disueltos en cloroformo se mezclaron en las proporciones mencionadas y el disolvente orgánico fue retirado por evaporación con nitrógeno gaseoso y una posterior incubación en vacío durante 1h 30 min. Los lípidos secos se resuspendieron en tampón KHE (100 mM KCl, 10 mM HEPES, 0,1 mM EDTA a pH 7) con 12,5 mM ácido 8-aminonaftaleno-1,3,6-trisulfónico (ANTS) y 45 mM bromuro de p-xileno-bis(piridinio) (DPX). A continuación se realizaron 10 ciclos de congelación/descongelación y después se sometieron 10 pasos de extrusión a través de dos membranas de policarbonato con tamaño de poro de 0,2 μm [15,16]. Así se obtuvieron LUVs que finalmente se hicieron pasar por una columna PD-10 para separarlos del ANTS-DPX libre.

2.3.2. Ensayo de liberación de ANTS-DPX

Los LUVs de 200 nm encapsulados con ANTS y DPX se incubaron con BAX, cBID y BCL-B en diferentes proporciones proteína:lípido. La concentración total de lípido fue de 100 μM en todos los experimentos. La liberación de ANTS-DPX se siguió a 25°C mediante un espectrofluorímetro AMINCO-Bowman Series 2 usando $\lambda_{\text{ex}} = 350 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{em}} = 530 \text{ nm}$, con 8 nm de paso de banda en ambos. Las intensidades de emisión se registraron durante 10 min. Se tomó como valor mínimo la intensidad de emisión de la

suspensión de LUVs antes de añadir las proteínas y el valor máximo fue la intensidad de fluorescencia tras la ruptura total de los LUVs por la adición de 0,5% Tritón X-100.

2.4. ENSAYO DE PERMEABILIZACIÓN DE MITOCONDRIAS

Se cultivaron fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) doble “knock-out” de delección para BAX y BAK [15] hasta llegar a la confluencia, momento en que se recogieron y resuspendieron en tampón de aislamiento mitocondrial (MIB) (210 mM manitol, 70 mM sacarosa, 1 mM EDTA, 10 mM HEPES a pH 7,5) con inhibidores de proteasas. Luego se homogeneizaron sometiéndolos a 2 ciclos de 30 pulsos en un homogeneizador de células eucariotas (Potter-Elvehjem). El homogeneizado se centrifugó primero a 600x g durante 10 min a 4°C, tras lo cual se descartó el sedimento y el sobrenadante se volvió a centrifugar a 7000x g para obtener un sedimento enriquecido en mitocondrias. Estas fueron resuspendidas en tampón MIB, isosmótico para las mitocondrias.

Para cada condición experimental se usaron 30 µg de proteína total de la fracción enriquecida en mitocondrias, que se midió por el método de Bradford (BioRad). Las mitocondrias se incubaron con concentraciones variables de BAX, cBID y/o BCL-B WT/R86D en tampón de reacción (125 mM KCl, 5 mM KH₂PO₄, 2 mM MgCl₂, 1 mM DTT y 10 mM HEPES a pH 7,2). Todos los experimentos se llevaron a cabo a 30°C durante 30 min, tras los cuales las mezclas de reacción se centrifugaron a 14000x g durante 10 min. Los sobrenadantes y sedimentos se analizaron por separado a SDS-PAGE al 15% y posteriormente se realizaron Western Blots utilizando anticuerpos anti-citocromo c y anti-TOM20 (BD Biosciences).

3. RESULTADOS

3.1. OBTENCIÓN DEL MUTANTE BCL-B R86D

El plásmido pGEX-6p-BCL-B se mutó por PCR para obtener la forma de BCL-B que contiene la mutación R86D del bolsillo hidrofóbico. Posteriormente, el producto de PCR se migró en un gel de agarosa al 1% (**Figura 2**) y se observó una banda intensa de 5 kb, cercana a la longitud del plásmido (5,5 kb). Finalmente, se secuenció para constatar que la mutación había tenido lugar.

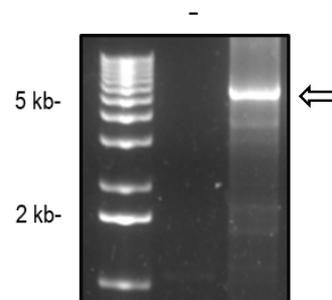


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa (1%) del producto de la PCR mutagénica. La primera calle contiene los marcadores de peso molecular y en el centro se muestra el control negativo (-), que corresponde a la PCR realizada sin la DNA polimerasa Pfu. A la derecha está el plásmido amplificado (5,5 kb) que porta la mutación de interés, señalado por la flecha.

3.2. EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE BCL-B

Para optimizar la expresión heteróloga de BCL-B WT en *E. coli*, se testó su expresión en varias cepas y se modificaron las condiciones de expresión: la OD₆₀₀ a la que se indujo con IPTG, la concentración de IPTG y los medios de cultivo (LB y TB).

En primer lugar se hizo el test de expresión en diferentes cepas. Tras inducir la sobreexpresión de BCL-B WT, se realizó una SDS-PAGE (15%) y tinción azul de Coomassie para analizar los niveles de expresión de la proteína (**Figura 3**). La sobreexpresión dio como resultado la aparición de varias bandas nuevas respecto al control. Una de ellas correspondía a un peso molecular de aproximadamente 45 kDa, cercano al del constructo GST-BCL-BΔC-6His. Finalmente, se confirmó por Western Blot (WB) que esta banda correspondía al constructo de interés (**Figura 4**). Las bandas de menor peso molecular que también eran detectadas en el WB se atribuyeron a productos de degradación de la proteína.

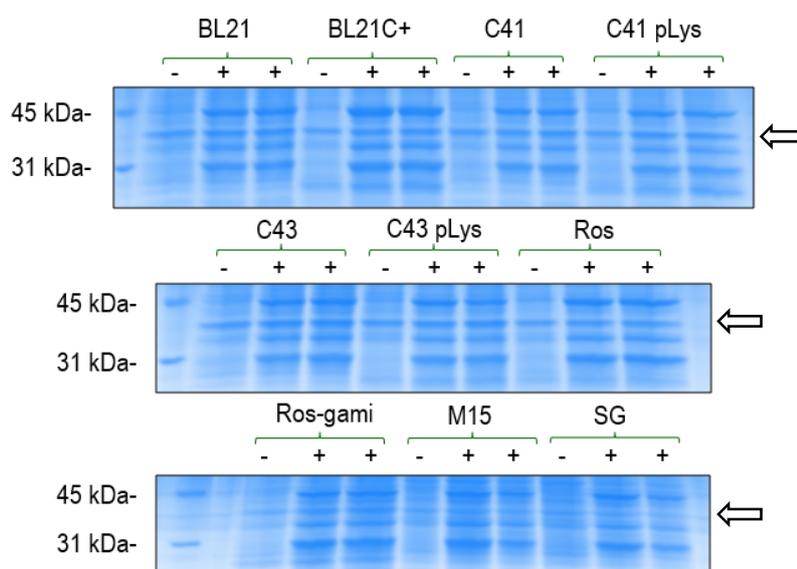


Figura 3. Análisis de la expresión de BCL-B WT en diferentes cepas de *E. coli*. Se muestra el control sin inducir (-) y los dos cultivos de cada cepa inducidos con IPTG (+). La flecha señala la banda control utilizada para calcular el nivel de sobreexpresión de BCL-B.

A continuación, para analizar en cuál de las cepas se consigue un mejor rendimiento de expresión de BCL-B, se midió la intensidad de la banda correspondiente a BCL-B y se comparó con un control- una banda cuya intensidad era constante tanto en los cultivos inducidos como en los no inducidos (flechas de la **Figura 3**). De esta forma se observó que la cepa BL21C+ expresa mayores niveles de BCL-B que el resto.

En el siguiente experimento se compararon los niveles de expresión de BCL-B WT en BL21C+ modificando la OD₆₀₀ a la que se indujo con IPTG. Como se muestra en la

Figura 5, la cantidad de proteína expresada disminuye conforme la OD_{600} de inducción aumenta. Por tanto, los resultados sugieren que la mejor opción es inducir con IPTG a una OD_{600} de 0,4.

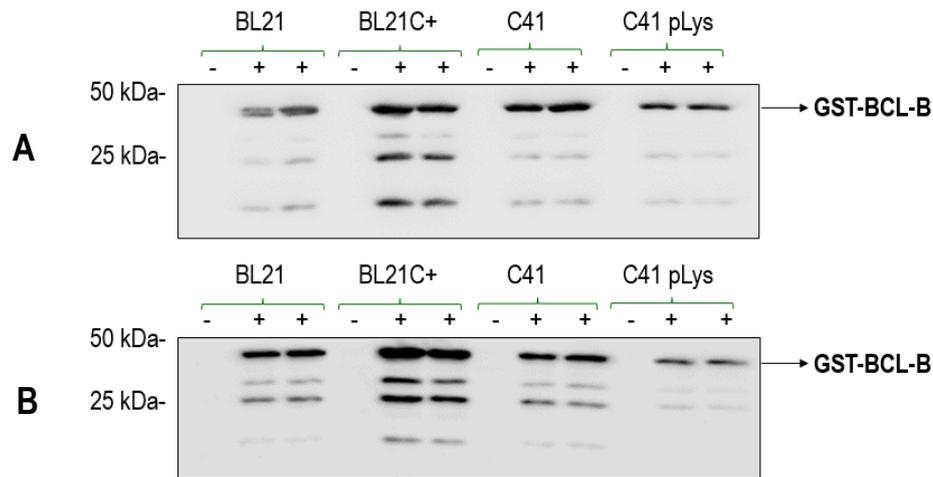


Figura 4. Detección de la sobreexpresión de BCL-B WT en diferentes cepas bacterianas mediante WB. Se utilizaron anticuerpos monoclonales anti-GST (A) y anti-histidinas (B). A diferencia de los controles sin inducir (-), BCL-B se detecta en los cultivos inducidos (+) de todas las cepas, si bien los mayores niveles de expresión se consiguen mediante la cepa BL21CodonPlus.

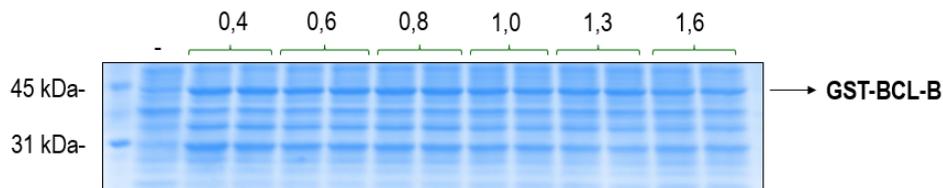


Figura 5. Estudio de la expresión de BCL-B WT en la cepa BL21C+ inducida con IPTG a diferentes OD_{600} . Se observa cómo la intensidad de la banda correspondiente a la proteína completa decrece gradualmente cuanto mayor es la OD_{600} de inducción.

Finalmente, se realizó el ensayo de expresión de BCL-B WT en BL21C+ usando dos medios de cultivo distintos (LB y TB) e induciendo con concentraciones de IPTG diferentes (0,1 mM y 0,5 mM). Los resultados sugieren que los niveles de expresión son similares en los dos medios de cultivo testados, y además, el uso de 0,5 mM de IPTG tampoco supone una gran mejora de la expresión de la proteína.

Tras obtener estos resultados, se procedió a expresar la versión mutante de BCL-B (R86D) en BL21C+ y se observó que los niveles de expresión se asemejaban mucho a los conseguidos con la versión silvestre.

3.3. PURIFICACIÓN DE BCL-B

La purificación de se llevó a cabo en tres pasos que consisten en cromatografías de afinidad a i) glutatión, ii) a metales inmovilizados (Ni^{2+} en este caso) y iii) un paso de tamizado molecular final. El seguimiento de cada una de las etapas se realizó por SDS-PAGE al 15% (**Figura 6A**).

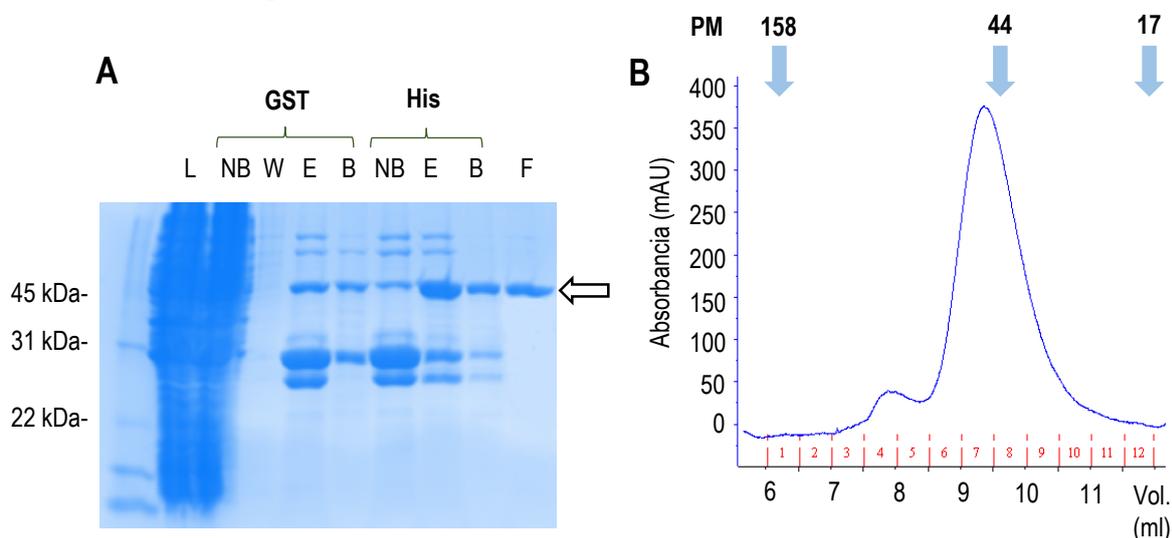


Figura 6. A) Análisis de cada etapa de purificación de BCL-B. GST es la columna de Glutatión Sepharosa 4B y His indica la columna de agarosa Ni-NTA. Las calles de cada una corresponden a las siguientes fracciones: *L* corresponde al lisado celular, *NB* a la fracción no unida a la columna, *W* al paso de lavado, *E* al volumen eluido y *B* a la fracción que permanece unida. La última alícuota (*F*) proviene de la fracción 8 del cromatograma de la columna de tamizado molecular. La flecha señala la banda correspondiente a GST-BCL-B. **B) Cromatograma de la columna Superdex 75 de tamizado molecular.** Los marcadores de peso molecular (flechas azules) sugieren que el pico principal corresponde a GST-BCL-B monomérica.

Se puede observar que mediante la columna de Glutatión Sepharosa 4B se elimina la mayoría de contaminantes. En la fracción eluida de esta columna hay tres bandas principales que corresponden a la proteína completa (indicada con una flecha en la figura) y a posibles productos de degradación. En el siguiente paso de purificación, la columna de Ni-NTA consigue aumentar notablemente la proporción de BCL-B respecto a los otros dos fragmentos contaminantes, aunque no consigue deshacerse completamente de ellos.

Finalmente, la columna de tamizado molecular Superdex 75 se usó para separar la forma monomérica de BCL-B de los agregados proteicos y de los productos de degradación detectados en el gel de poliacrilamida. Tal y como se muestra en el cromatograma de la **Figura 6B**, la mayoría de la proteína se encontraba en estado monomérico, aunque también se observa una pequeña fracción que probablemente sea

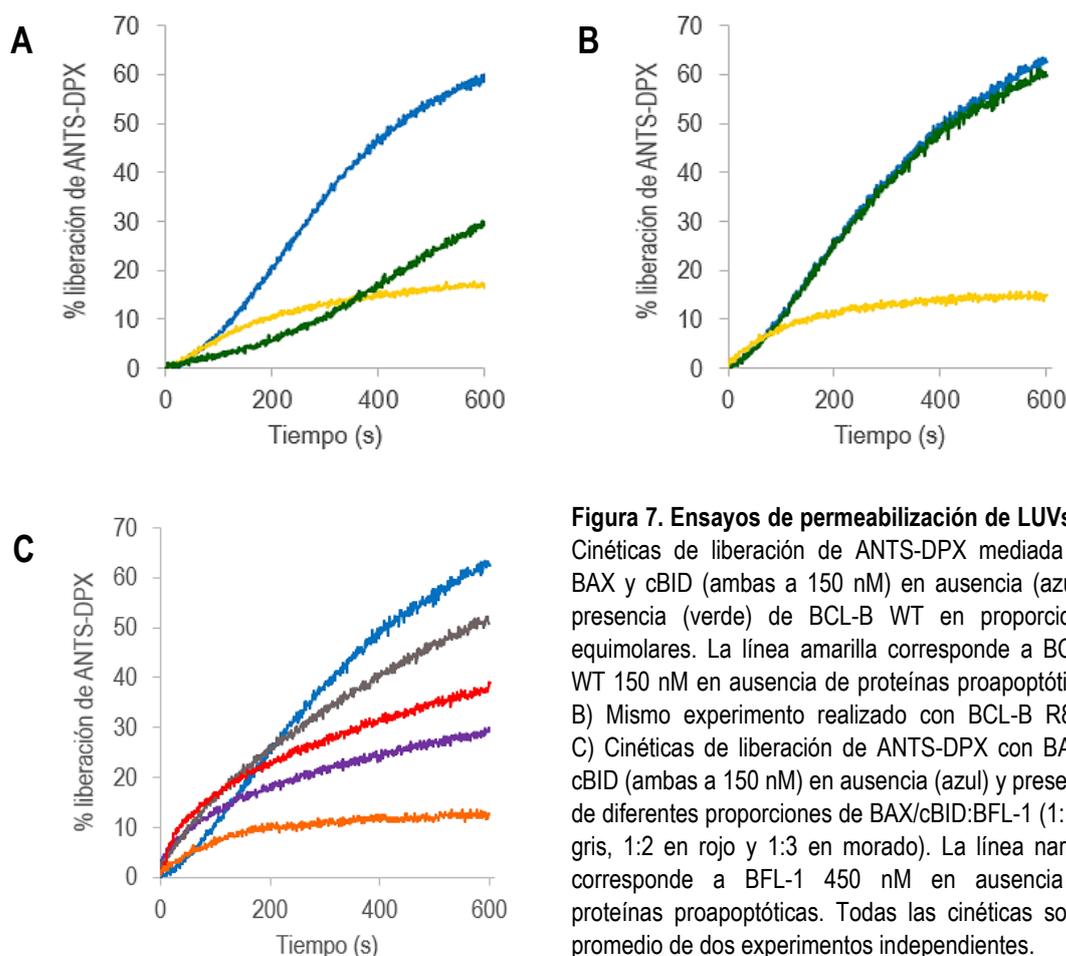
la proteína en estado oligomérico o agregado. Las fracciones que contenían la proteína pura (nº 6 a 9) fueron recogidas para realizar los siguientes experimentos.

3.4. ENSAYOS FUNCIONALES CON BCL-B

3.4.1. Ensayos de liberación de ANTS-DPX en LUVs

En el siguiente experimento se analizó la capacidad de las proteínas proapoptóticas BAX y cBID para generar poros en la membrana de LUVs con una composición lipídica que imita la MEM, tanto en presencia como en ausencia de BCL-B silvestre y R86D.

Para ello, los LUVs fueron encapsulados con el fluoróforo ANTS y el atenuador DPX, que es capaz de apagar la fluorescencia del primero cuando se encuentra a una distancia suficientemente cercana. Sólo al provocar disrupciones en la membrana de las vesículas lipídicas por acción de BAX y cBID se liberarían ambos al exterior, alejándose y permitiendo la emisión de fluorescencia por parte del ANTS [14-16].



Tras incubar los LUVs con BAX, cBID y/o con BCL-B WT y R86D en las mismas proporciones proteína:lipido, se obtuvieron las cinéticas de liberación de las **Figuras 7A**

y **7B**. Se observa que la liberación de ANTS-DPX por parte de BAX y cBID es sustancialmente inhibida por BCL-B WT en proporciones equimolares. Sin embargo, el mutante de BCL-B no tuvo apenas efecto sobre BAX y cBID. También se constató que BCL-B WT y R86D, al ser incubadas en ausencia de las proteínas proapoptóticas, apenas provocaban la permeabilización de los LUVs.

Por otra parte, el efecto de BCL-B se comparó con el de BFL-1, otro miembro antiapoptótico mejor caracterizado de la familia BCL-2 (**Figura 7C**). En este caso, la gráfica muestra que BFL-1 inhibe con menor potencia la liberación de ANTS-DPX, ya que para conseguir el mismo porcentaje de permeabilización que BCL-B a 150 nM, BFL-1 debe encontrarse a una concentración aproximadamente 3 veces mayor. Asimismo, se puede observar que la cinética de liberación tiene una forma totalmente distinta a la de BCL-B.

3.4.2. Ensayos de permeabilización de mitocondrias

Finalmente, se testó la capacidad de ambas formas de BCL-B para inhibir la permeabilización de mitocondrias aisladas por la acción conjunta de BAX y cBID. Para ello, las mitocondrias se trataron con estas dos proteínas proapoptóticas en presencia y ausencia de BCL-B (tanto WT como R86D) a diferentes concentraciones (**Figura 8**).

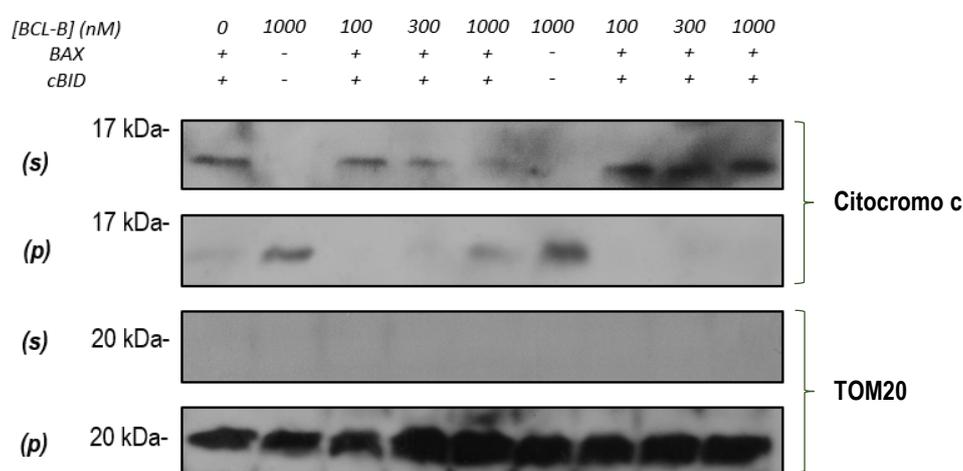


Figura 8. Ensayo de permeabilización de mitocondrias aisladas. La liberación de citocromo c se detectó realizando un WB con anticuerpos anti-citocromo c del sobrenadante (s) y el sedimento (p) por separado. También se usaron anticuerpos anti-TOM20 como control de la cantidad de mitocondrias analizada. La concentración de BAX y cBID fue de 50 nM y 20 nM respectivamente en todas las condiciones testadas.

Se puede observar cómo BAX y cBID producen una permeabilización completa en ausencia de BCL-B, ya que todo el citocromo c está presente en el sobrenadante. Asimismo, ni BCL-B WT ni la forma mutada producen la permeabilización de las mitocondrias en ausencia de proteínas proapoptóticas.

Sin embargo, cuando están presentes, BCL-B WT es capaz de inhibir parcialmente la liberación de citocromo c cuando su concentración es alta (1000 nM), mientras que el mutante R86D no lo hace en ninguna de las condiciones ensayadas.

4. DISCUSIÓN

En primer lugar, se han conseguido expresar eficientemente tanto la forma silvestre de BCL-B como la mutante en el bolsillo hidrofóbico (R86D), haciendo uso de la cepa BL21CodonPlus de *E. coli*. Los ensayos de expresión han mostrado que se consiguen mejores niveles de producción cuando la inducción se realiza a una OD₆₀₀ de 0,4. Esto puede deberse a que ninguna de las formas de BCL-B resulta tóxica para la bacteria, observación que está apoyada por el hecho de que el uso de cepas especializadas en la expresión de proteínas tóxicas para *E. coli* (C41 y C43) no supone una ventaja (**Figura 3**). También se ha concluido que no hay apenas diferencias entre el uso de LB y TB, además de que la adición de una concentración de IPTG mayor de 0,1 mM no supone una gran mejora en el rendimiento de expresión de esta proteína.

En cuanto a la purificación, cabe destacar que usando el constructo GST-BCL-BΔC-6His, los dos pasos de cromatografía de afinidad y el paso final de tamizado molecular han conseguido aislar la forma monomérica de la proteína con un alto grado de pureza. Aun así, todavía hay lugar para la mejora, ya que la cantidad de proteína pura que se obtiene al final es relativamente baja.

Los ensayos de liberación de ANTS-DPX han mostrado que, tal y como se ha descrito en estudios anteriores [15,16], los experimentos con LUVs que mimetizan la composición natural de la MME pueden ser útiles a la hora de caracterizar y cuantificar el efecto de las proteínas de la familia BCL-2. Las pruebas realizadas en este trabajo sugieren que BCL-B silvestre inhibe la acción de BAX y cBID en sistemas reconstituidos, confirmando su función antiapoptótica. Al mismo tiempo, el mutante R86D no presenta actividad inhibitoria alguna sobre la permeabilización de los LUVs, lo cual apoya la hipótesis inicial de este trabajo.

Por otra parte, el hecho de que la cinética de liberación de BFL-1 tenga una forma diferente a la de BCL-B y además su efecto inhibitorio sea menor puede deberse a que BCL-B es capaz de unirse tanto a BAX como a cBID para efectuar su acción inhibitoria, mientras que BFL-1 se une preferentemente a cBID (es un antagonista selectivo de BAK, no de BAX) [17].

Finalmente, los ensayos con mitocondrias parecen sugerir de nuevo que la acción antiapoptótica de BCL-B tiene lugar mediante la interacción “BH3-in-groove” con miembros proapoptóticos, tal y como efectúan su acción otras proteínas antiapoptóticas multidominio [2,7]. Además, estos experimentos muestran que la proporción BCL-B:BAX/cBID necesaria para inhibir la permeabilización de la membrana mitocondrial externa es más alta que la de los experimentos en LUVs. Esta diferencia puede deberse a que las mitocondrias contienen otras proteínas antiapoptóticas de la familia BCL-2, a diferencia de los LUVs. Además, la composición de la membrana mitocondrial externa es mucho más compleja y la distribución de los lípidos no es uniforme. De hecho, algunos trabajos sugieren la existencia de microdominios con alto contenido de cardiolipina en la membrana mitocondrial externa [18,19] –ausentes en los LUVs–, los cuales podrían promover la oligomerización de BAX y la posterior permeabilización de la MME.

5. CONCLUSIONES

En resumen, mediante este trabajo se ha conseguido mejorar el rendimiento de la expresión heteróloga y purificación de BCL-B, si bien la cantidad de proteína que se obtiene es todavía baja. Por otra parte, los resultados experimentales obtenidos tanto en sistemas reconstituidos como en mitocondrias aisladas apoyan la idea inicial de que BCL-B se une directamente a proteínas proapoptóticas mediante una interacción “BH3-in-groove” para ejercer su acción antiapoptótica.

De cara al futuro, la interacción “BH3-in-groove” de BCL-B con las proteínas proapoptóticas podría caracterizarse mejor realizando experimentos con mutantes de la proteína en otros residuos del bolsillo hidrofóbico (p. ej. los residuos h0 a h4). Además, también sería interesante realizar más experimentos en sistemas reconstituidos y mitocondrias aisladas con otras proteínas proapoptóticas “BH3-only”, con el fin de analizar la selectividad que tiene BCL-B hacia cada miembro, de forma que se pueda tener una idea mejor de su función en el organismo.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Basañez G, Hardwick JM. Unravelling the BCL-2 apoptosis code with a simple model system. *PLoS Biol.* 2008;6(6):e154.
2. Czabotar PE, Lessene G, Strasser A, Adams JM. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014;15(1):49-63.
3. Youle RJ, Strasser A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008;9(1):47-59.

4. Tait SW, Green DR. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010;11(9):621-632.
5. Basañez G, Soane L, Hardwick JM. A new view of the lethal apoptotic pore. *PLoS Biol.* 2012;10(9):e1001399.
6. Dewson G, Kluck RM. Mechanisms by which Bak and Bax permeabilise mitochondria during apoptosis. *J Cell Sci.* 2009;122(Pt 16):2801-2808.
7. Shamas-Din A, Kale J, Leber B, Andrews DW. Mechanisms of action of Bcl-2 family proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013;5(4):a008714.
8. Shamas-Din A, Brahmabhatt H, Leber B, Andrews DW. BH3-only proteins: Orchestrators of apoptosis. *Biochim Biophys Acta.* 2011;1813(4):508-520.
9. Zhang Z, Subramaniam S, Kale J, et al. BH3-in-groove dimerization initiates and helix 9 dimerization expands Bax pore assembly in membranes. *EMBO J.* 2016;35(2):208-236.
10. Lee EF, Dewson G, Evangelista M, et al. The functional differences between pro-survival and pro-apoptotic B cell lymphoma 2 (Bcl-2) proteins depend on structural differences in their Bcl-2 homology 3 (BH3) domains. *J Biol Chem.* 2014;289(52):36001-36017.
11. Rautureau GJ, Yabal M, Yang H, Huang DC, Kvensakul M, Hinds MG. The restricted binding repertoire of Bcl-B leaves Bim as the universal BH3-only prosurvival Bcl-2 protein antagonist. *Cell Death Dis.* 2012;3:e443.
12. Zhai D, Ke N, Zhang H, et al. Characterization of the anti-apoptotic mechanism of Bcl-B. *Biochem J.* 2003;376(Pt 1):229-236.
13. Ke N, Godzik A, Reed JC. Bcl-B, a novel Bcl-2 family member that differentially binds and regulates Bax and Bak. *J Biol Chem.* 2001;276(16):12481-12484.
14. Terrones O, Antonsson B, Yamaguchi H, et al. Lipidic pore formation by the concerted action of proapoptotic BAX and tBID. *J Biol Chem.* 2004;279(29):30081-30091.
15. Landeta O, Garcia Valero J, Flores-Romero H, et al. Lipid-dependent bimodal MCL1 membrane activity. *ACS Chem Biol.* 2014;9(12):2852-2863.
16. Landeta O, Landajuela A, Gil D, et al. Reconstitution of proapoptotic BAK function in liposomes reveals a dual role for mitochondrial lipids in the BAK-driven membrane permeabilization process. *J Biol Chem.* 2011;286(10):8213-8230.
17. Simmons MJ, Fan G, Zong WX, Degenhardt K, White E, Gélinas C. Bfl-1/A1 functions, similar to Mcl-1, as a selective tBid and Bak antagonist. *Oncogene.* 2008;27(10):1421-1428.
18. Garofalo T, Manganelli V, Grasso M, et al. Role of mitochondrial raft-like microdomains in the regulation of cell apoptosis. *Apoptosis.* 2015;20(5):621-634.
19. Garofalo T, Giammarioli AM, et al. Lipid microdomains contribute to apoptosis-associated modifications of mitochondria in T cells. *Cell Death Differ.* 2005;12(11):1378-1389.