



## ANÁLISIS IN SILICO DE LA RED DE INTERACCIÓN ENTRE PROTEÍNAS ASOCIADAS A LA PORINA VDAC DE *Rhipicephalus microplus*

Elba Rodríguez-Hernández<sup>a</sup>, Minerva Camacho Nuez<sup>b</sup>, Susana Flores Villalva<sup>a</sup>, Juan Mosqueda Gualito<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Fisiología y Mejoramiento Animal CENIDF y MA-INIFAP, rohe577@hotmail.com, fv.susana@gmail.com. <sup>b</sup>Posgrado en Ciencias Genómicas, UACM, mcamachonuez@yahoo.com.mx., <sup>c</sup>Facultad de Ciencias Naturales, UAQ, joel.mosqueda@uaq.mx.

### Resumen

La babesiosis bovina es una enfermedad causada por parásitos del género *Babesia*, que son transmitidos por garrapatas a animales y humanos. Actualmente las alternativas de control de la enfermedad están enfocadas en el estudio de la interface garrapata-*Babesia*, como un esfuerzo para determinar el mecanismo molecular involucrado en la infección. Nosotros previamente identificamos una porina VDAC de la garrapata que interacciona con fases sexuales de *Babesia*, la cual se sobre-expresa en células intestinales de garrapata en respuesta a la infección con el parásito, tanto a nivel de RNAm y proteína; observándose mayor nivel de expresión en intestinos de garrapatas infectadas con *Babesia bigemina* a las 24 horas post-repleción. En este trabajo, nuestro objetivo fue describir la red de interacción proteína-proteína (IPP) tomando como templatado la secuencia que reportamos en la base de datos (No. acceso. ADT82652.1). El análisis se realizó en la base de datos STRING, generamos un modelo para evidenciar la red de proteínas asociadas con la porina; también se realizó un análisis de ontología génica para enriquecer el estudio; con lo que se determinaron los procesos celulares involucrados. El análisis global de grupos reveló que existe asociación de 46 proteínas involucradas en diferentes procesos biológicos como, transporte transmembranal y plegamiento de proteínas. En este trabajo determinamos la red de IPP, relacionada con la porina VDAC, lo que representa una aportación a los esfuerzos por entender la relación funcional de esta proteína, en los procesos celulares naturales y descifrar a futuro cual es el mecanismo de infección, e identificar nuevas moléculas candidatas para bloquear la transmisión de la enfermedad.

### 1. Introducción

Las garrapatas son vectores hematófagos, que transmiten una gran variedad de microorganismos patógenos como protozoarios, bacterias y virus. Estas están incluidas en el grupo de vectores de enfermedades más importantes del ganado bovino (Barker et al. 2002). Entre los protozoarios que son transmitidos por las garrapatas se encuentran los parásitos del género *Babesia*, agente causal de la babesiosis bovina. Las fases sexuales de *Babesia* infectan las células del intestino de la garrapata donde se multiplican y maduran para eventualmente salir de la célula e infectar otros órganos, y transmitirse a un nuevo hospedero bovino cuando una garrapata infectada se alimenta (Bock et al 2004). El canal VDAC facilita el intercambio de sustancias a través de la membrana externa mitocondrial; tiene su propio mecanismo de inserción denominado inserción



autodirigida. En general, la permeabilidad de las membranas mitocondriales está regulada principalmente por la formación de un complejo multiproteico, conocido como poro de permeabilidad transitoria mitocondrial (PTPm). Por su importante localización, la porina VDAC se asocia a otras proteínas que se encuentran cercanas o sobre las membranas tanto mitocondrial como celular. Las asociaciones con la proteína VDAC permiten la integración de complejos capaces de formar poros no selectivos en las membranas; estos complejos están formados por la porina VDAC, el translocador de nucleótidos de adenina (ANT) y la ciclofilina (Kroemer et al., 2007, Bayrhuber et al., 2008); también por proteínas con actividad quinasa como la hexoquinasa que juegan un papel importante en la fisiología mitocondrial. La porina VDAC es permeable a solutos de 1.5 kDa, lo que permite el intercambio de NADH/FADH (poder reductor) y el ATP/ADP entre el espacio intermembranal y el citosol que como se sabe son fundamentales para la cadena respiratoria (Mitchell and Moyle 1965); la permeabilidad de la membrana mitocondrial tanto externa como interna puede ser interrumpida de tal forma que al abrirse el canal en la membrana interna, se gasta el gradiente de protones (H<sup>+</sup>) a través de la membrana, lo que resulta en el desacoplamiento de la cadena respiratoria y la expansión de la matriz, provocando la ruptura de la membrana externa permitiendo la salida de las moléculas pro-apoptóticas y por lo tanto la muerte celular (Douce and Neuburger 1999). Utilizando herramientas genómicas y proteómicas identificamos una porina del intestino de la garrapata que se sobreexpresa en respuesta a la infección con *Babesia* a diferentes tiempos pos-repleción. Esta porina fue identificada como un canal de aniones dependiente de voltaje o VDAC (Rodríguez et al., 2012). En este trabajo determinamos la red de asociación de proteínas relacionadas a la porina VDAC. La descripción de la red de proteínas asociadas con la porina permitirá entender mejor la posible función que tiene dentro de los procesos biológicos que se ven modificados en la infección con protozoarios del género *Babesia*, lo que a futuro ayudará a proponer moléculas candidatas de control o bloqueo de la transmisión del parásito.

## 2. Material y métodos

**Construcción de la red de interacción proteína-proteína (IPP):** El diseño y deducción de la red de interacciones de la proteína VDAC de *R. microplus* con otras proteínas, fue realizada con la base de datos de STRING v9.1 (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes), disponible en: <http://string.db.org/>. Las interacciones predichas en la base de datos se realizan bajo un marco de puntuación y tienen un valor de confianza por predicción. En nuestro estudio, consultamos la base de datos STRING usando la secuencia de la proteína VDAC de *R. microplus* (No. acceso ADT82652.1) como plantilla, y ampliamos la red para obtener no más de 50 interacciones de proteínas. La calidad de la red se fortaleció con el análisis de las interacciones de proteínas que mostraron un puntaje medio (0.7), lo que indica que la red de predicción es confiable. El análisis integral de la red de proteínas predicha fue realizado mediante la agrupación de las moléculas, las cuales comparten algún grado de similitud en términos de asociación funcional. El análisis por grupos (número de grupos) en la base de datos STRING se realiza mediante dos algoritmos: MCL (Markov clustering) y k-Means Clustering. En este estudio aplicamos el algoritmo k-Means Clustering (MacQueen., 1967) el cual es más rápido computacionalmente.



**Análisis gen ontology (GO):** La red de interacciones entre proteínas fue enriquecido mediante la base de datos GO (WebGestalt, WEB-based Gene SeT AnaLysis Toolkit, disponible en: <http://bioinfo.vanderbilt.edu/webgestalt/>)( Zhang et al., 2005). El método de Benjamin Hochberg fue usado como modelo para corrección del múltiple ensayo, para verificar que no hubiera falsos positivos. El punto de corte fue el valor de p de 0.05.

### 3. Resultados experimentales

**Red de PPI y análisis GO:** La red biológica derivada de la base de datos de STRING usando la secuencia de la proteína VDAC de *R. microplus* como templado, demostró ser una densa red compuesta de 46 interacciones de proteínas. Las interacciones más estrechamente conectadas con VDAC parecen estar situadas en el centro de la red a pesar de que la porina y algunas de sus interacciones se localizaron en la periferia. También analizamos la red de interacción con más alto valor de confianza (interacciones de proteínas con valor a partir de 0.7), en la que se observa que existen proteínas como la hexoquinasa, TOM20, prohibitina y translocasas. Los resultados del análisis GO se presentan en forma de tabla con las condiciones más significantes de la red de señalización. En la tabla 1 se muestran los procesos biológicos estadísticamente más significativos ( $p=0.5$ ) en los que participan las proteínas analizadas en la red, entre las que se encuentran, procesos biológicos en general, transporte y plegamiento de proteínas. El análisis de la ruta KEGG revela que las proteínas están involucradas en rutas importantes como la fosforilación oxidativa y el ciclo del ácido tricarbóxico; estos son procesos metabólicos implicados en la formación de energía, que se llevan a cabo en la mitocondria.

Tabla 1. Análisis GO y KEGG de la red IPP predicha relacionada a la proteína VDAC.

Análisis GO		Análisis KEGG	
Función	nº	Función	nº
Proceso biológico	39	Rutas metabólicas	10
Transportador transmembrana	13	Fosforilación oxidativa	5
Transporte	15	Metabolismo glicoxilato	2
Plegamiento de proteínas	4	Ciclo TCA	2

**Análisis de los grupos obtenidos de la red de IPP:** La red de IPP fue analizada por grupos para entender mejor las asociaciones y señalar la importancia biológica de su relación; fue dividida en 5 grupos (Figura 1); los cuales están compuestos de conexiones densas de proteínas que comparten similitud en función o incidencia de la misma ruta. El grupo 1 contiene proteínas como aconitasa, citrato sintasa y malato deshidrogenasa; estas proteínas participan en diferentes etapas de las reacciones en el ciclo del ácido tricarbóxico. El grupo 2 contiene proteínas como FOF 1 y ATP sintasa  $\alpha$  y  $\beta$ , estas proteínas pueden formar un complejo enzimático ampliamente distribuido en la naturaleza, localizado en la membrana interna mitocondrial, este complejo está encargado de proveer a la célula de energía (síntesis de ATP) necesaria para realizar sus procesos vitales y por otro lado también puede hidrolizar el ATP. El grupo 3 contiene proteínas como complejo IV (Via/cox13), citocromo C y coenzima Q; que están asociadas a procesos metabólicos como la fosforilación oxidativa mediante la cual se sintetiza ATP acoplado al flujo de electrones, y por lo tanto a la cadena respiratoria.



El grupo 4 contiene proteínas como TIM22, TIM23 y chaperoninas, estas moléculas están relacionadas al transporte de proteínas al interior de la mitocondria, y están asociadas en forma de complejos que se intercalan en la membrana. El grupo 5 contiene proteínas como ADP-ATP translocasa (AAT), hexocinasa (HK), ciclofilina B (CYP B), ferredoxina reductasa (FNR) y TOM20. Estas moléculas están implicadas en transporte de proteínas; enzimas transferasas que pueden transferir grupos fosfato pertenecientes a procesos de fosforilación y transporte de electrones.

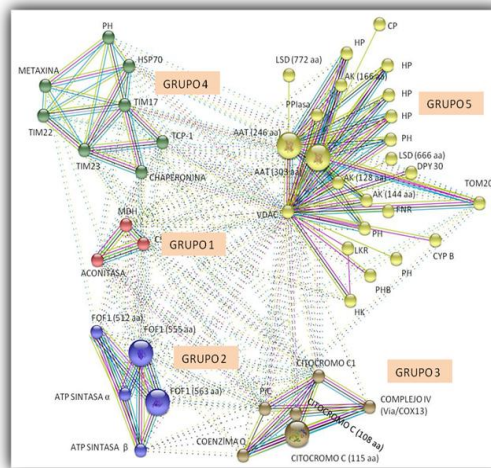


Figura 1. Red de IPP relacionada a la porina VDAC diferenciado en 5 grupos, analizado mediante el algoritmo k-means clustering. Las proteínas marcadas con la letras PH o HP corresponde a la leyenda: proteína hipotética (Hypotetical protein).

#### 4. Discusión y conclusión

La porina VDAC es una proteína importante en la permeabilidad de la membrana mitocondrial; se ha localizado en diferentes compartimentos celulares aunque no se ha estudiado a detalle si tiene la misma función; un reporte sugiere que concentraciones fisiológicas de NADH afectan la permeabilidad, indicando un posible mecanismo donde la glucólisis podría inhibir la fosforilación oxidativa. La proteína VDAC ha sido identificada como un componente del complejo receptor de Benzodiazepinas el cual está ligado a la biosíntesis de esteroides y también ha sido co-purificado junto con el complejo receptor de ácido  $\gamma$ -aminobutírico subunidad A (McEnery., 1992; Tsujimoto and Shimizu 2007). El mecanismo de señalización reportado en este trabajo muestra asociaciones fuertes de las proteínas, prohibitina, TOM20, hexoquinasa y dos translocasas con la porina VDAC de *R. microplus*, y se integró un grupo formado por la prohibitina y un segundo grupo formado por las cuatro proteínas restantes, las cuales mostraron un alto puntaje de confianza. También, describimos la red de IPP relacionada a la porina VDAC de manera global, involucrando un total de 46 proteínas, que al ser reunidas en 5 grupos de acuerdo a su función, se observó que están implicadas en diversos procesos metabólicos como el transporte, la fosforilación oxidativa, el ciclo TCA, y plegamiento de proteínas.



El conocimiento de las asociaciones funcionales de la proteína VDAC permite contemplar el panorama que podría verse afectado de forma directa, debido a la desregulación de los mecanismos de expresión de la porina. En este estudio observamos que las proteínas asociadas con VDAC interactúan cercanamente con otros grupos de proteínas que podrían verse modificadas o desreguladas en el proceso de infección de *Babesia* hacia las células del intestino de la garrapata, como es el caso de la misma porina VDAC la cual se sobreexpresa en respuesta a la infección con el parásito (Rodríguez et al., 2012). La ruta de señalización intracelular de VDAC es conservada evolutivamente y regula interacciones entre proteínas mitocondriales y el citoplasma. Los estudios de interacción de proteínas a través de biología de redes aportan conocimientos sobre los posibles mecanismos involucrados en las infecciones por patógenos. Las proteínas asociadas a los mecanismos de infección conocidos son importantes para entender la biología de la infección. En este trabajo, observamos que la proteína VDAC tiene estrecha relación con proteínas que guían a procesos metabólicos importantes, por lo que este estudio podría servir a futuro como una aproximación a descubrir y seleccionar candidatos de estudio para proponer un método de bloqueo de la infección y/o transmisión de *Babesia* a su hospedero bovino.

## Bibliografía

1. Bock R., Jackson L., De Vos A., Jorgensen W. (2004). Babesiosis of cattle. *Parasitol* 129:s247-s269.
2. Barker, S. C. & Murrell, A. (2002). Phylogeny, evolution and historical zoogeography of ticks: a review of recent progress. *Experimental and Applied Acarology* 28, 55–68.
3. Bayrhuber M., Meins T., Habeck M., Becker S., Giller Karin., Villinger S., Vonrhein C., Griesinger C., Zweckstetter M., and Zeth K. (2008). Structure of the human voltage-dependent anion channel. *PNAS* 105(40):15370–15375.
4. Douce R, Neuburger M. (1999). Biochemical dissection of photorespiration. *Curr Opin Plant Biol* 2:214–222.
5. Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C. (2007). Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev* 87:99–163.
6. McEnery MW, Snowman AM, Trifiletti RR, and Snyder SH. (1992). Isolation of the mitochondrial benzodiazepine receptor: association with the voltage-dependent anion channel and the adenine nucleotide carrier. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:3170-3174.
7. MacQueen JB. (1967). Some Methods for classification and Analysis of Multivariate Observations, Proceeding of 5-th Berkeley Symposium on Mathematical Statistics and Probability. Berkeley: University of California Press 1:281-297.
8. Mitchell P, Moyle J. (1965). Evidence discriminating between the chemical and the chemiosmotic mechanisms of electron transport phosphorylation. *Nature* 208:1205–1206.
9. Rodríguez-Hernández Elba, Mosqueda Juan, Álvarez-Sánchez María Elizabeth, Falcón Neri Alfonso, Mendoza-Hernández Guillermo, Camacho-Nuez Minerva. (2012). The identification of a VDAC-like protein involved in the interaction of *Babesia bigemina* sexual stages with *Rhipicephalus microplus* midgut cells. *Vet Parasitol* 187(3-4):538-41.
10. Szklarczyk D, Franceschini A, Kuhn M, Simonovic M, Roth A, et al. (2011). The STRING database in 2011: funcional interaction networks of proteins, globally integrated and scored. *Nucleic Acids Res* 39(Database issue):D561-568.
11. Zhang B, Kirov SA, Snoddy JR. (2005). WebGestalt: an integrated system for exploring gene sets in various biological contexts. *Nucleic Acid Res* 33(Web Server issue) W741-748.