

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

PhD in Biotechnology



**UNDERSTANDING AND DRUGGING
THE BCL-2 TRANSMEMBRANE
INTERACTOME FOR
TUMOR TREATMENT**

PhD. THESIS

Submitted by

Estefanía Lucendo Gutiérrez

Valencia, 2020

PhD. Supervisor:

Dra. Mar Orzáez Calatayud



PRINCIPE FELIPE
CENTRO DE INVESTIGACION

Resumen

La familia de proteínas Bcl-2 regula la apoptosis a través de una compleja red de interacciones. Las células tumorales suelen presentar mutaciones que afectan a la expresión o las interacciones de las proteínas Bcl-2 para mejorar la progresión tumoral. Además, alteraciones en su regulación también promueven la migración de células cancerígenas, la invasión y la metástasis. Para llevar a cabo sus funciones, las proteínas Bcl-2 interactúan entre sí tanto en el citoplasma como en las membranas intracelulares. Los equilibrios de interacción de los dominios Bcl externos a la membrana han sido ampliamente investigados y recientemente, se han propuesto como dianas terapéuticas. Sin embargo, el interactoma de los dominios transmembrana (TMD, *del inglés transmembrane domains*) sigue siendo poco conocido. En esta situación, es necesario un conocimiento profundo de la biología de las proteínas Bcl-2 para explotar eficientemente sus superficies de unión en el tratamiento del cáncer. Para llevar a cabo este objetivo, nuestra investigación se centra en tres áreas:

1. La comprensión detallada de la contribución del TMD al interactoma en membrana de Mcl-1 y a la funcionalidad de la proteína.
2. El descubrimiento de nuevos inhibidores de Mcl-1 que actúen sobre el segmento transmembrana que permitan el desarrollo de una clase de drogas anticancerígenas aún por explorar.

3. La caracterización molecular de mutaciones relacionadas con el cáncer descritas en los TMD de Bcl-2 y Bcl-xL y sus implicaciones en la supervivencia de las células tumorales.

La proteína antiapoptótica Mcl-1 inhibe a los miembros proapoptóticos Bak, Bax, Bok y Noxa, entre otros. Aunque se ha estudiado en detalle su actividad promoviendo la supervivencia celular, el mecanismo molecular por el cual previene la apoptosis mediada por Bok aún no está claro. Además, el conocimiento de las actividades de Mcl-1, descritas hasta ahora, se basa exclusivamente en las estructuras resueltas de las regiones solubles en agua y en estudios centrados en los dominios externos a la membrana. Por primera vez, hemos demostrado la relevancia del TMD de Mcl-1 en su equilibrio de interacción. En este trabajo describimos su capacidad específica para homo- y hetero-oligomerizar con el TMD de Bok. También ponemos de manifiesto la influencia de estas interacciones en la modulación de apoptosis y resaltamos la relevancia clínica de los mutantes del TMD de Mcl-1 identificados en pacientes con cáncer.

Muchos tumores hematológicos y sólidos sobre-expresan Mcl-1 como un mecanismo para adquirir quimiorresistencia. Se han desarrollado miméticos de BH3 específicos para modular su actividad antiapoptótica en células cancerosas. Sin embargo, aún no disponemos de datos científicos que informen sobre su toxicidad en humanos y su eficacia. En este trabajo, proponemos la novedosa interacción de los TMDs de Mcl-1 y Bok como un nuevo sitio de actuación de fármacos en el desarrollo de quimioterapias. Hemos identificado tres inhibidores de esta interacción con prometedoras características que los hacen buenos candidatos para el desarrollo

farmacéutico, así como herramientas de investigación para el estudio molecular de la interacción de los TMDs de Mcl-1 y Bok.

Para beneficiarse de la modulación de la apoptosis, las células tumorales también presentan versiones mutadas de las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 y Bcl-xL. En nuestro conocimiento, este es el primer estudio que analiza mutaciones derivadas de pacientes que afectan a los TMDs de Bcl-2 y Bcl-xL. Nuestro trabajo demuestra cómo estas mutaciones alteran el equilibrio en membrana de las proteínas. Además, nuestros resultados explican la influencia que algunos mutantes somáticos ejercen en la regulación de la apoptosis.

En general, los resultados científicos que aparecen en esta tesis resaltan el papel de los Bcl TMDs en el interactoma de las proteínas Bcl-2. Estos hallazgos corroboran que las interacciones laterales entre los TMDs son específicas de la secuencia y contribuyen activamente a la funcionalidad de la proteína. Por lo tanto, comprender los segmentos transmembrana Bcl puede proporcionar nuevos conocimientos sobre la biología de las proteínas Bcl-2 para su modulación farmacéutica en la terapia antitumoral.