Red BIO-BIO-MOL
Curso de Posgrado: Vistas panorámicas desde el gen hasta la cristalización de una enzima para conocer su función

TUTORIAL

MODELADO COMPARATIVO DE PROTEINAS

Dra. Paola Beassoni
UNRC
pbeassoni@exa.unrc.edu.ar

PARA HACER UN MODELADO POR HOMOLOGÍA SE NECESITA:

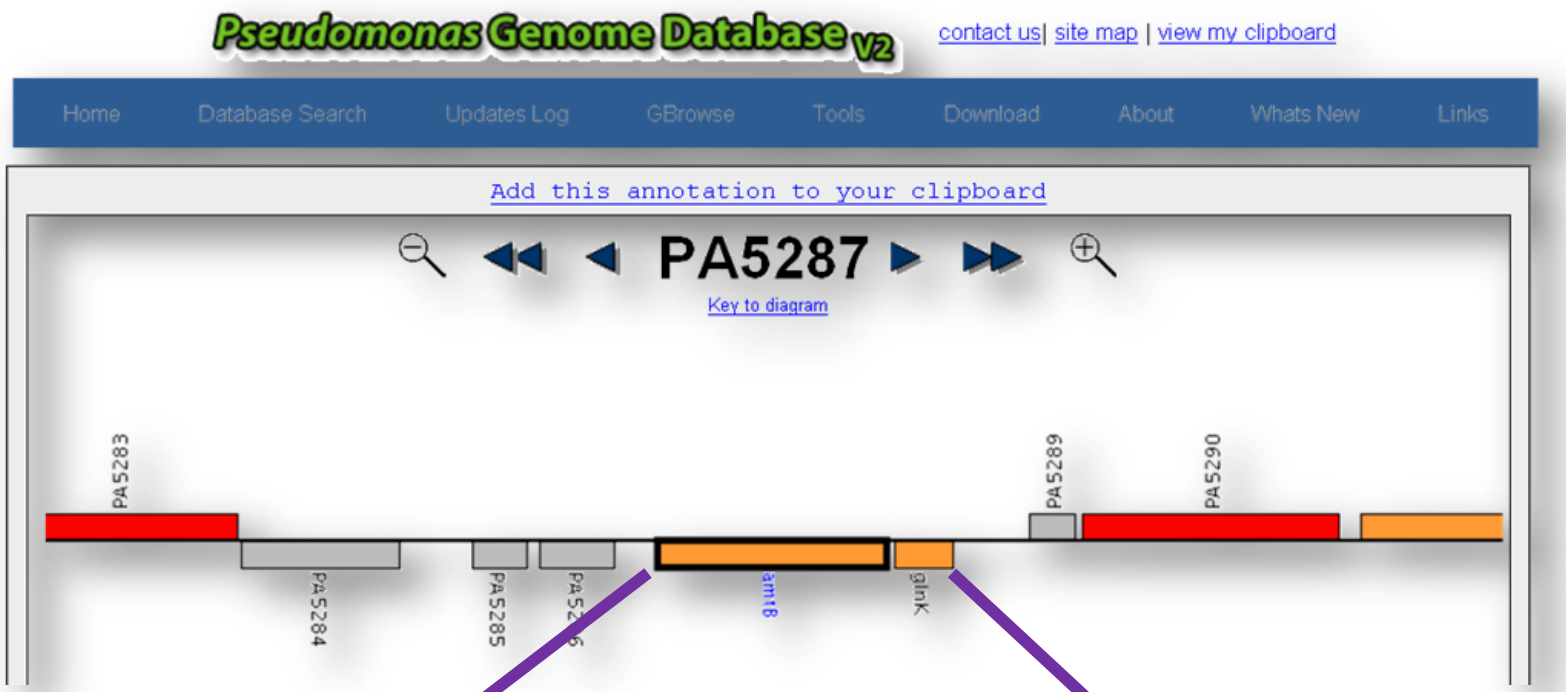
- Una secuencia aminoacídica a modelar. En este tutorial se trabajará con el transportador de amonio de *Pseudomonas aeruginosa* (PA5287)

- Una estructura resuelta experimentalmente con secuencia aminoacídica homóloga a la secuencia a modelar. Este modelo debe estar descrito en un archivo PDB, que se obtiene del Protein Data Bank (www.pdb.org)

Nota: Algunos de los archivos obtenidos en este tutorial estarán disponibles para no esperar los resultados. En los archivos que iras generando se sugerirán nombres para que coincidan con los disponibles, pero puedes elegir los nombres que desees.

BUSCAMOS LA SECUENCIA A MODELAR

http://www.pseudomonas.com/getAnnotation.do?locusID=PA5287



ammonium transporter AmtB

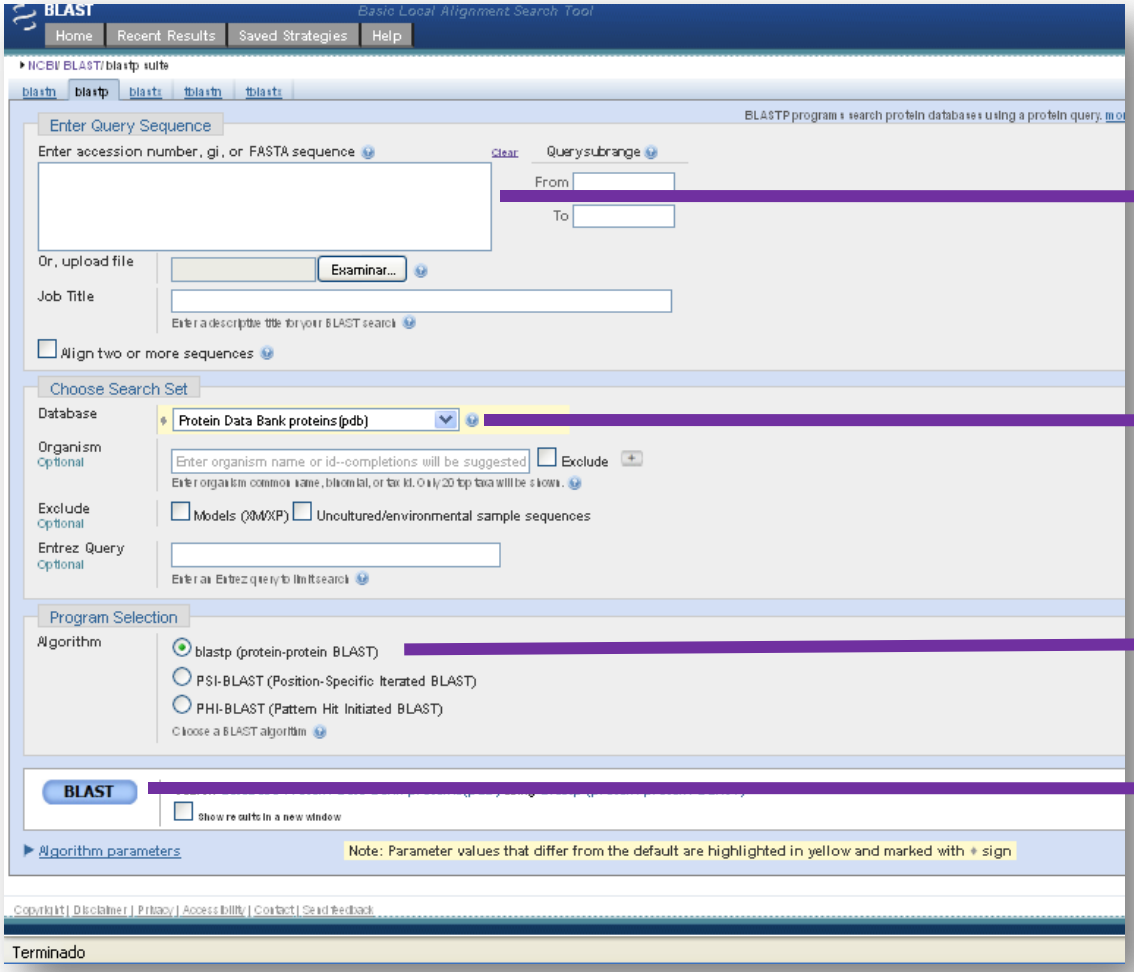
nitrogen regulatory protein P-II 2

Ambos genes son Clase 2:
Averiguar que significa esto.

BUSCAMOS HOMOLOGOS DE ESTRUCTURA CONOCIDA

- En la solapa "Sequence data" obtener la secuencia de la proteína
- Ingresar a la pagina del BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)
- Seleccionar el algoritmo "Protein Blast" y realizar a búsqueda en la base de datos del PDB

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool



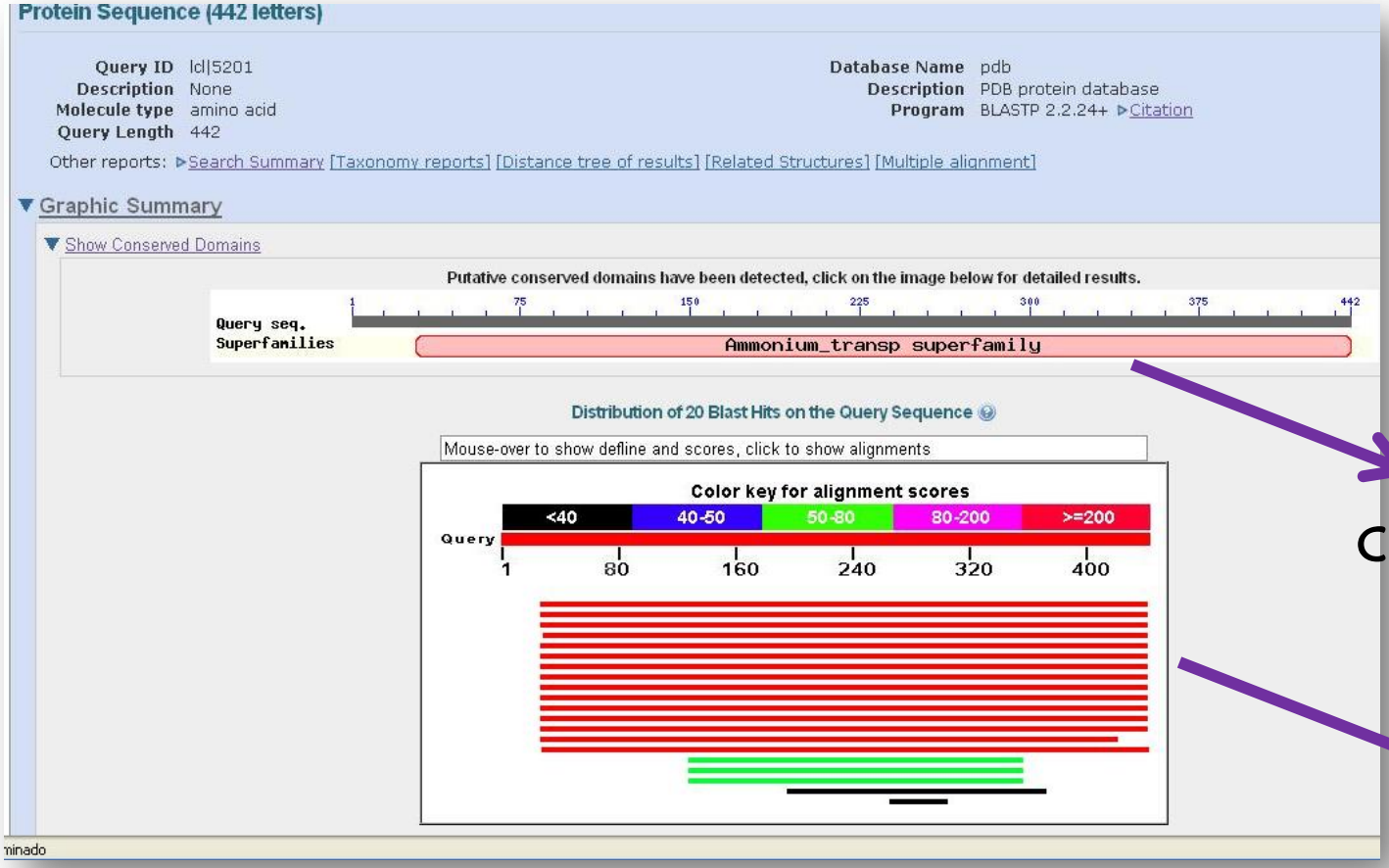
Ingresar secuencia

Elegir base de datos pdb

Seleccionar algoritmo blastp (protein-protein BLAST)

Enviar la búsqueda

Ejemplo de resultado:



Conserved Domain Database (CDD)

Hits

¿Que significan los diferentes colores?

Analizar:

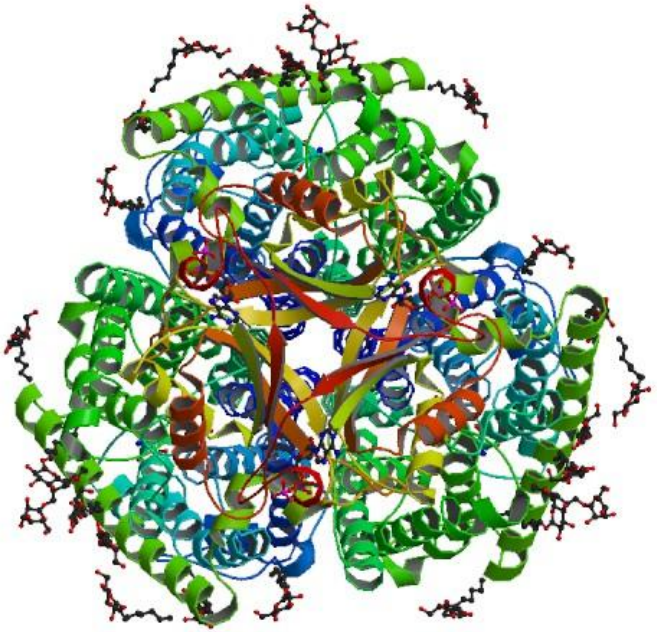
- Posee dominios conocidos?
- Posee homólogos de estructura conocida?
- Que porcentaje de identidad presenta con los posibles moldes? Permite realizar modelado comparativo?
- ¿Existe mas de un posible molde? Si es así, ¿Que criterios tendrías en cuenta para seleccionar la proteína molde?

Una vez elegido el molde, acceder al banco de datos del Protein Data Bank y buscar la anotacion de dicho molde:
http://www.pdb.org/pdb/home/home.do

Molde: 2NS1
Inhibitory complex of the transmembrane ammonia channel, AmtB, and the cytosolic regulatory protein, GlnK, at 1.96 A.

Chain A: Ammonia channel

Chain B: Nitrogen regulatory protein P-II 2

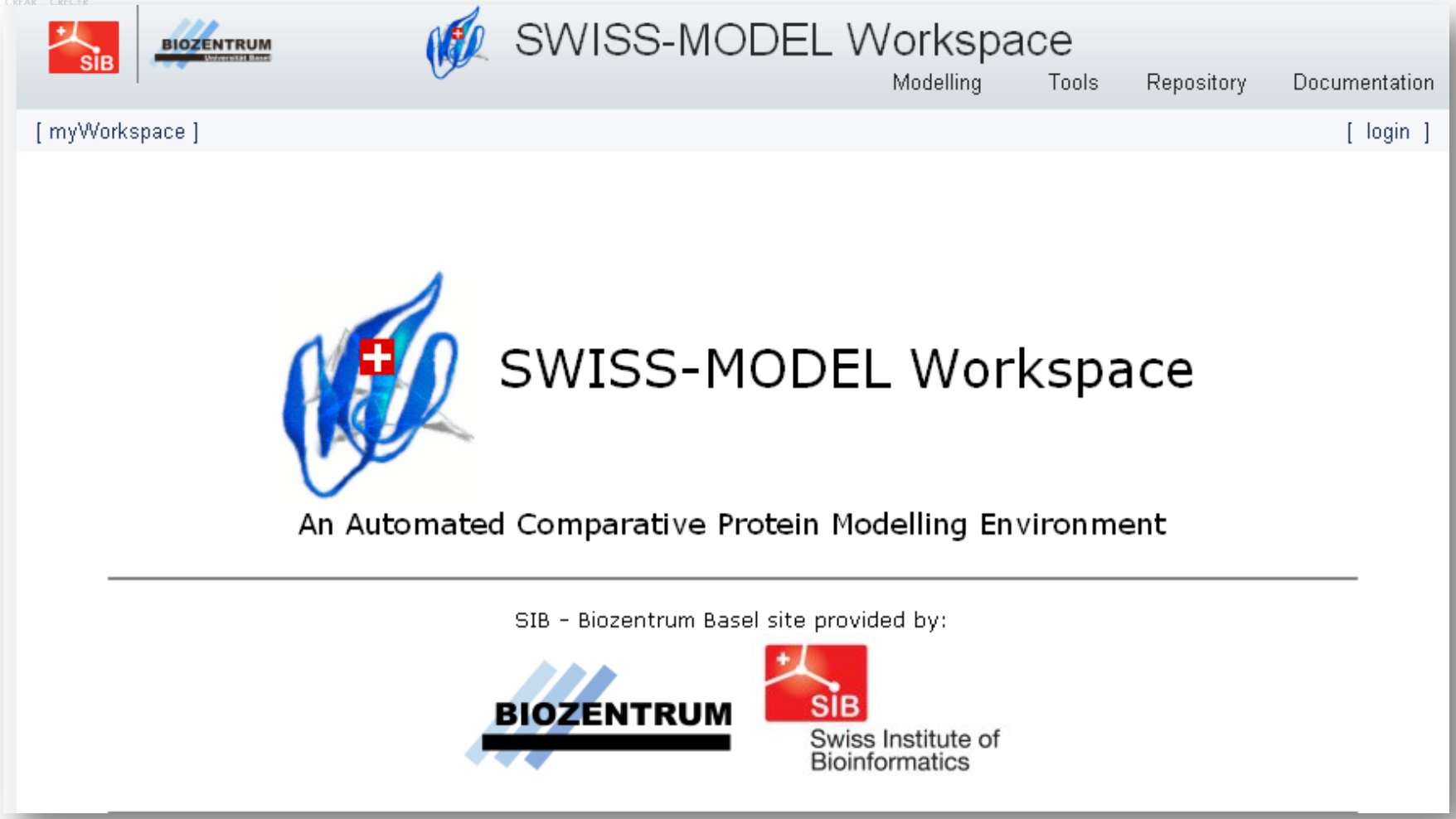


Analizar la estructura:

A que organismo pertenece?

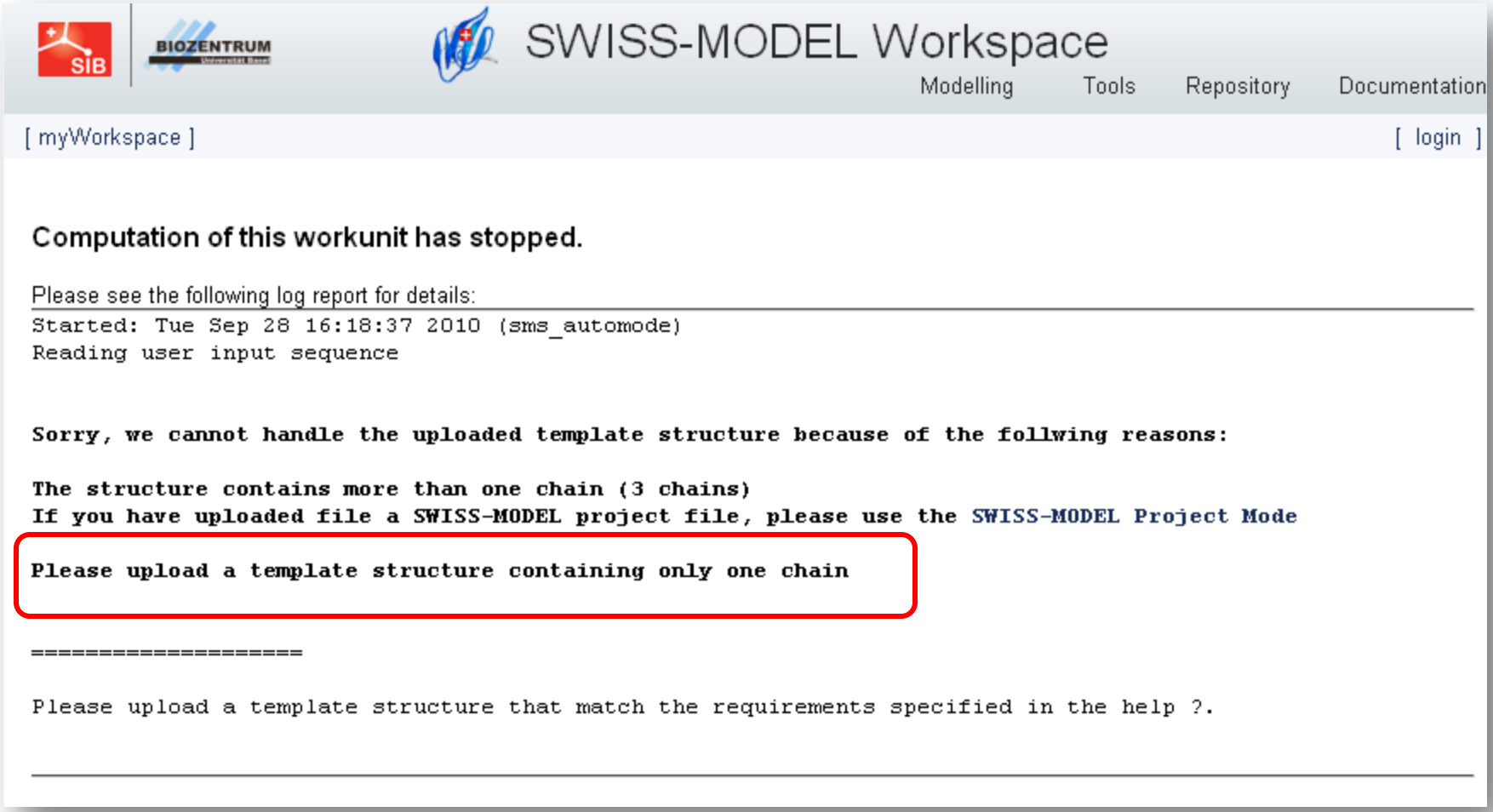
Como esta compuesto este complejo?

Acceder al SWISS-MODEL Workspace
http://swissmodel.expasy.org/workspace/index.php?

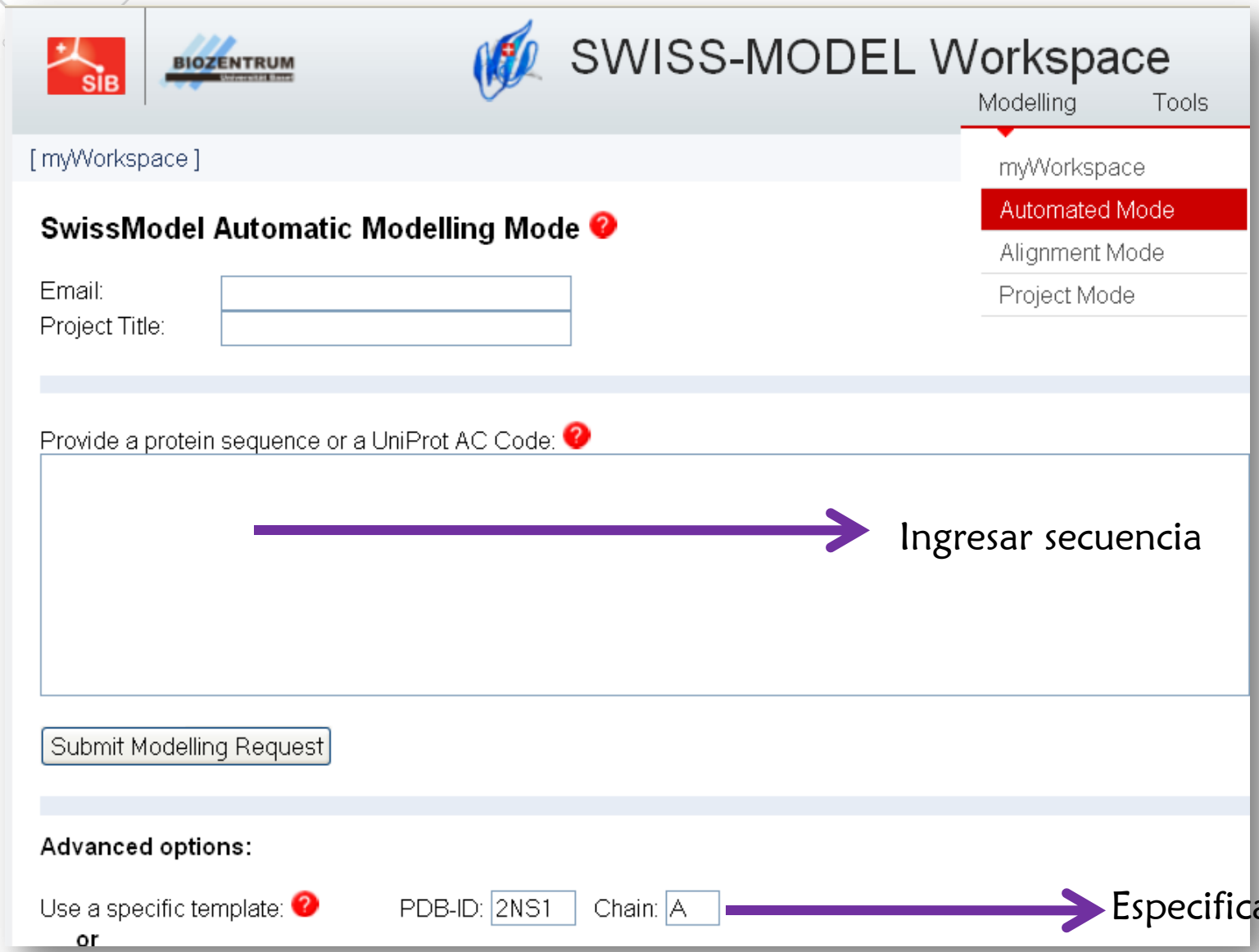


Pueden crear su propia cuenta, sino se les suministrara una cuenta en el desarrollo del TP

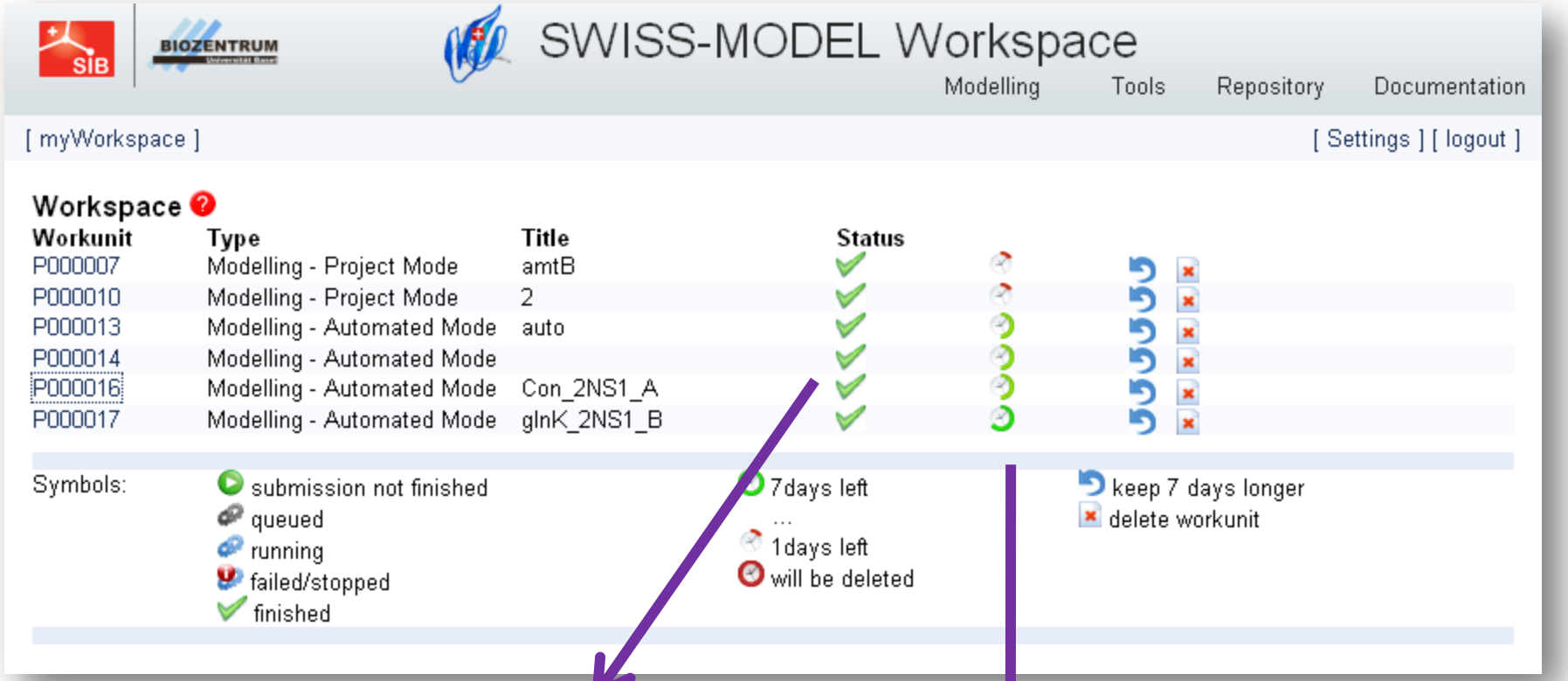
No es posible modelar polímeros. Deberemos modelar el monómero y luego ensamblar el trímero



En la solapa Automate mode, enviar el proyecto



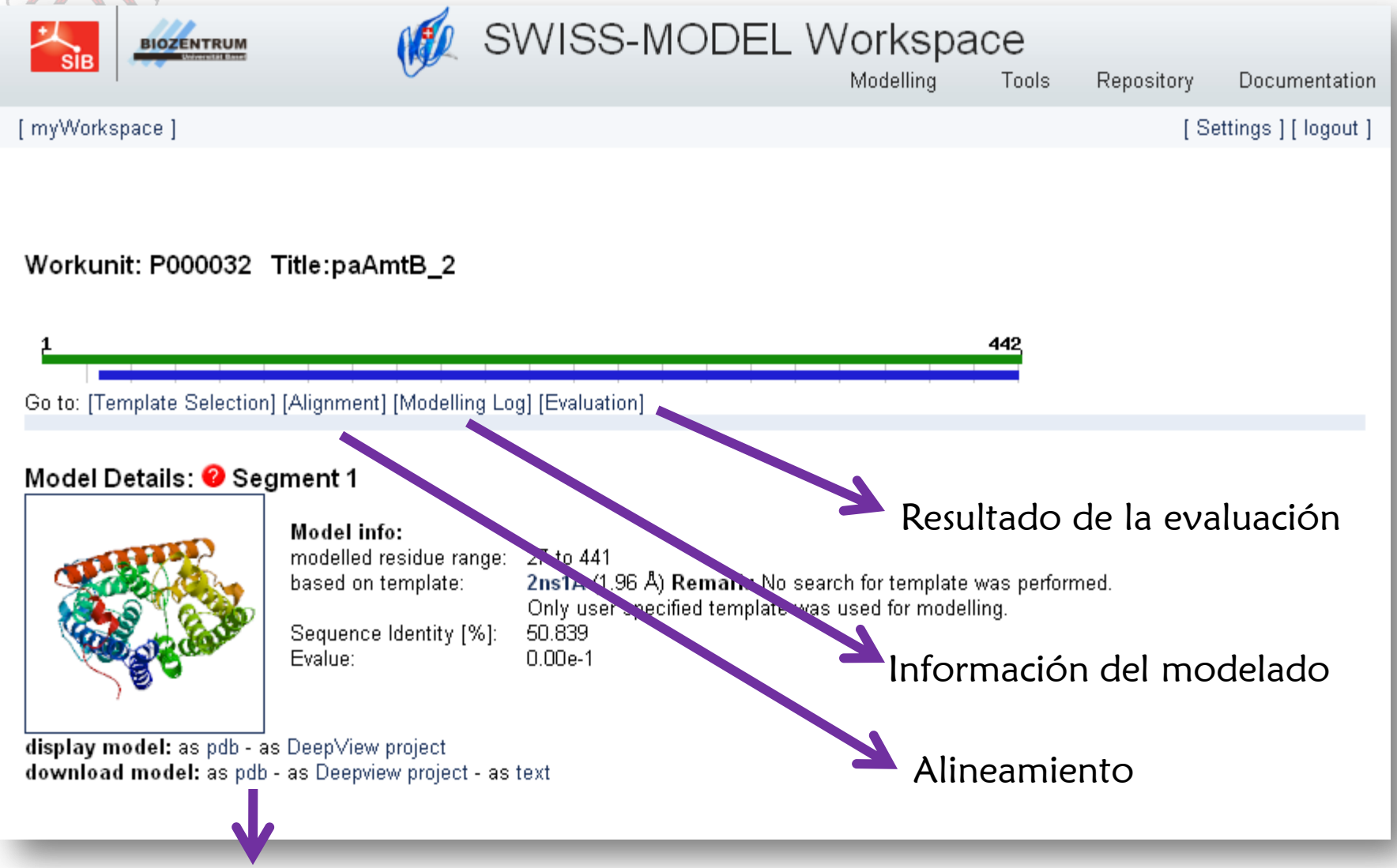
Así se verá la pantalla del workspace



Estado del proyecto

Tiempo de permanencia que le restan al proyecto en el workspace.

(Por defecto se mantienen 7 días, pero este plazo puede extenderse)



Descargar el modelo en formato “pdb”

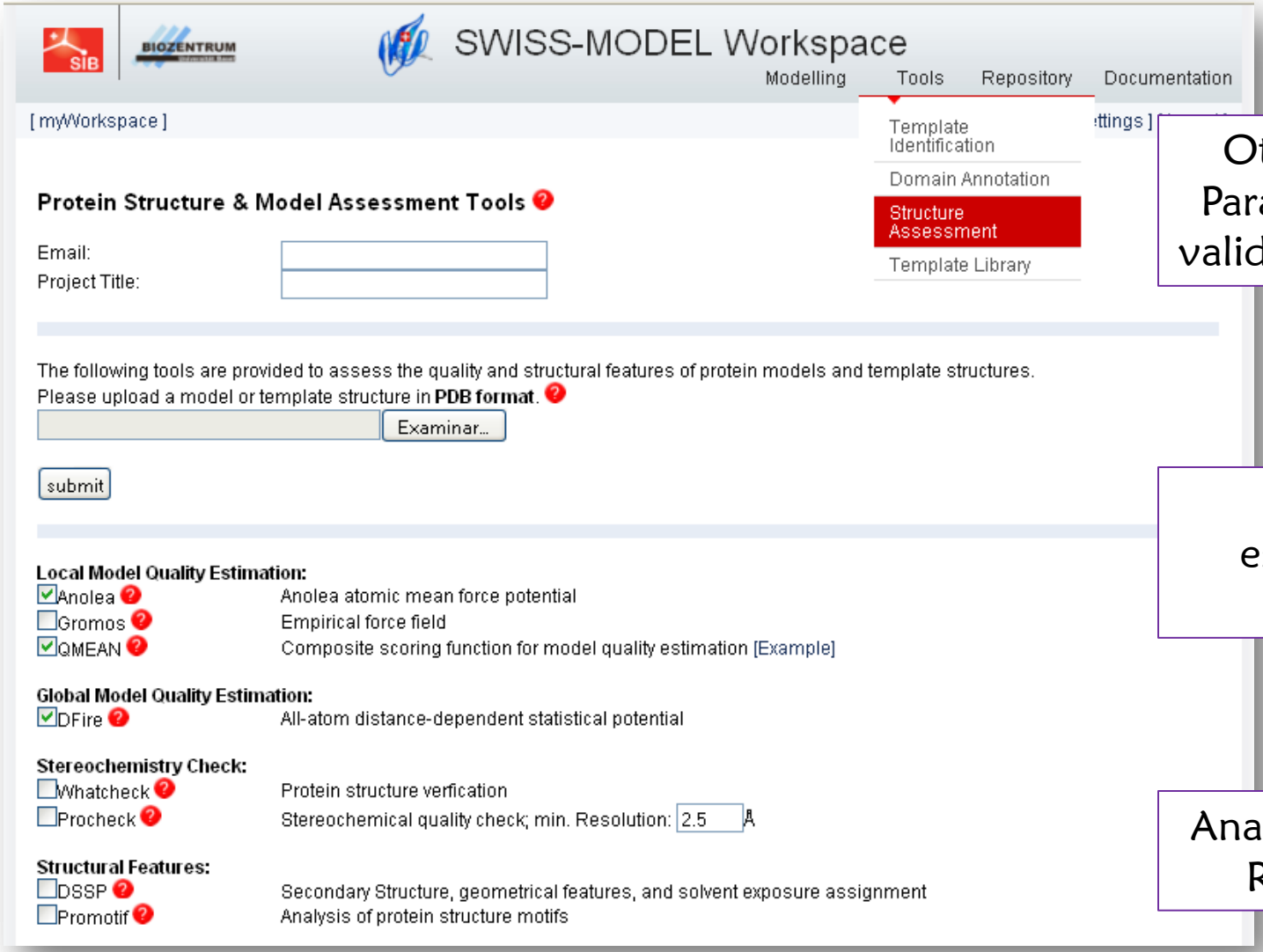
(para ganar tiempo, estos archivos serán suministrados: Model_AmtB.pdb)

Analizar:

- Alineamiento: hay zonas problemáticas?
- Es buena la energía del modelo?
- Analizar la calidad del modelo con las funciones ANOLEA y GROMOS: hay zonas problemáticas?

Ya tenemos el modelo, ahora hay que validarlo

Tools → structure assessment



Otros parámetros Para la evaluación y validación del modelo

↓

Validación estereoquímica: PROCHECK

↓

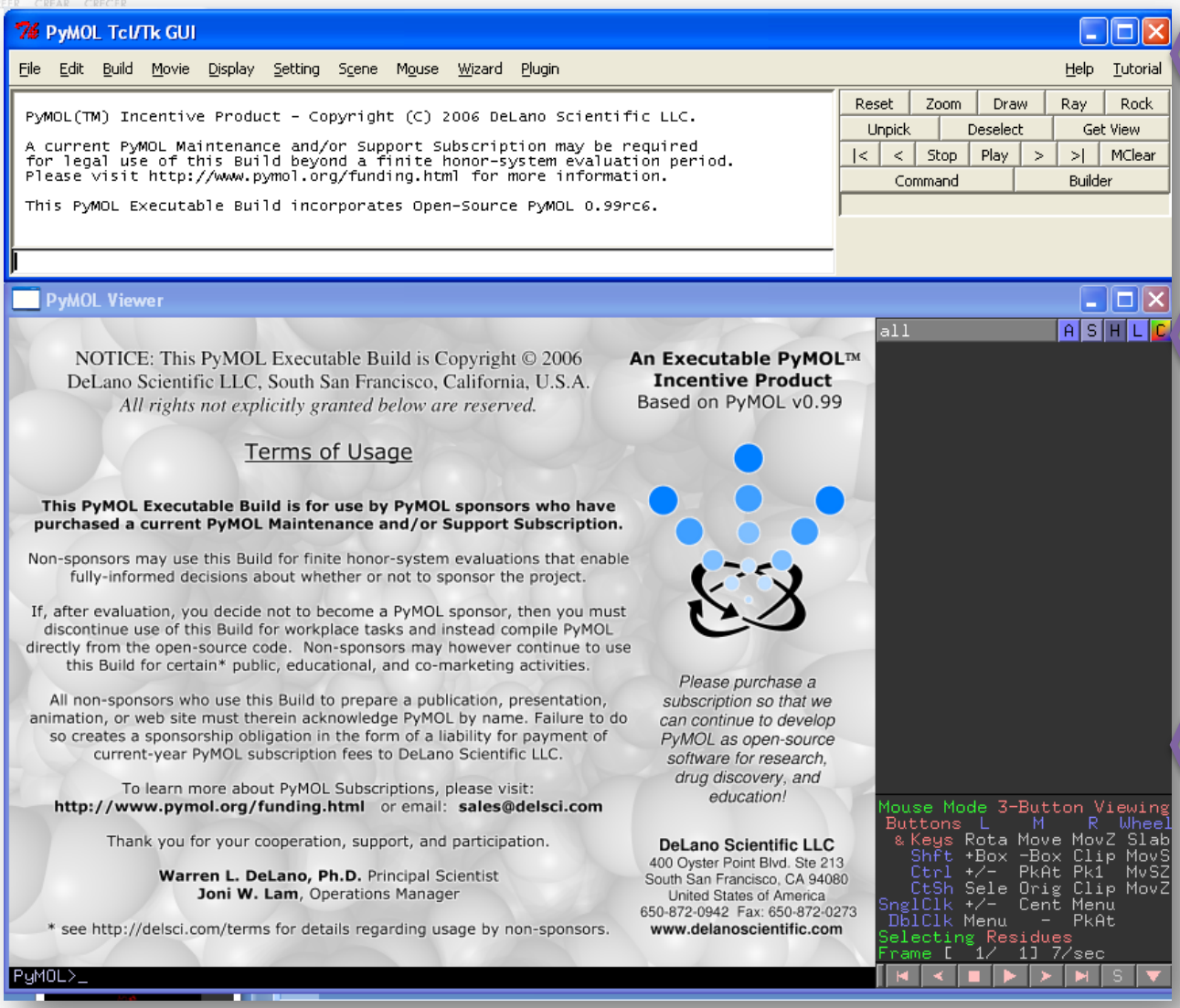
Analizar el gráfico de Ramachandran

Muy Bien!!! En este punto, hemos construido y validado el modelo del transportador de amonio AmtB de *P. aeruginosa*. Pero la unidad funcional es un trímero, ahora debemos ensamblar los monómeros para obtener el trímero.

PyMOL (versión Educacional)
http://pymol.org/edu/

VMD
http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/

En este Trabajo Practico emplearemos PyMOL



Consola de comandos

A: action
S: show
H: hide
L: label
C: color

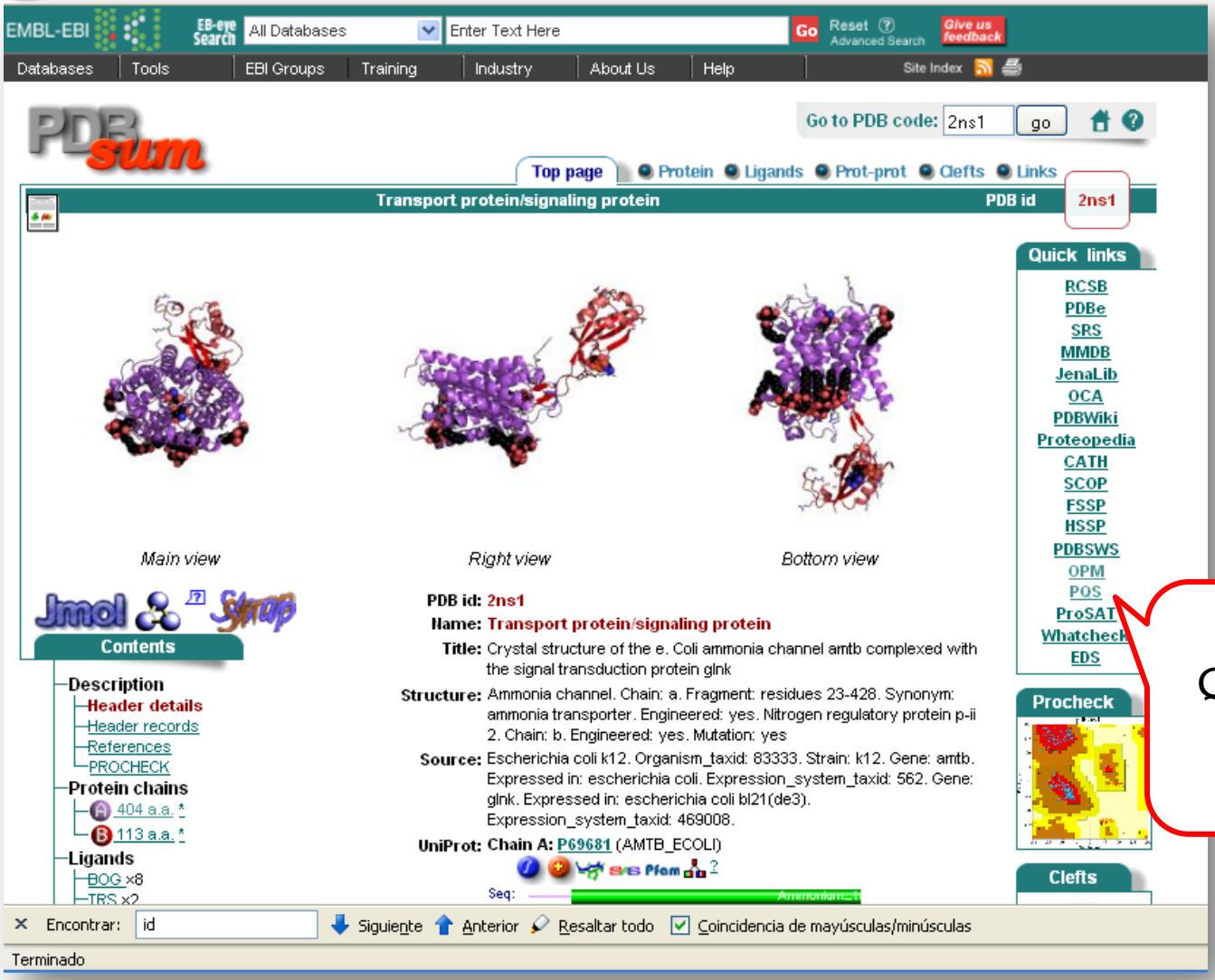
Visor de moleculas

En primer lugar debemos buscar la estructura de la unidad biológica, ya que la molécula que usamos hasta el momento (2NS1) solo tiene las coordenadas atómicas de un monómero de cada proteína

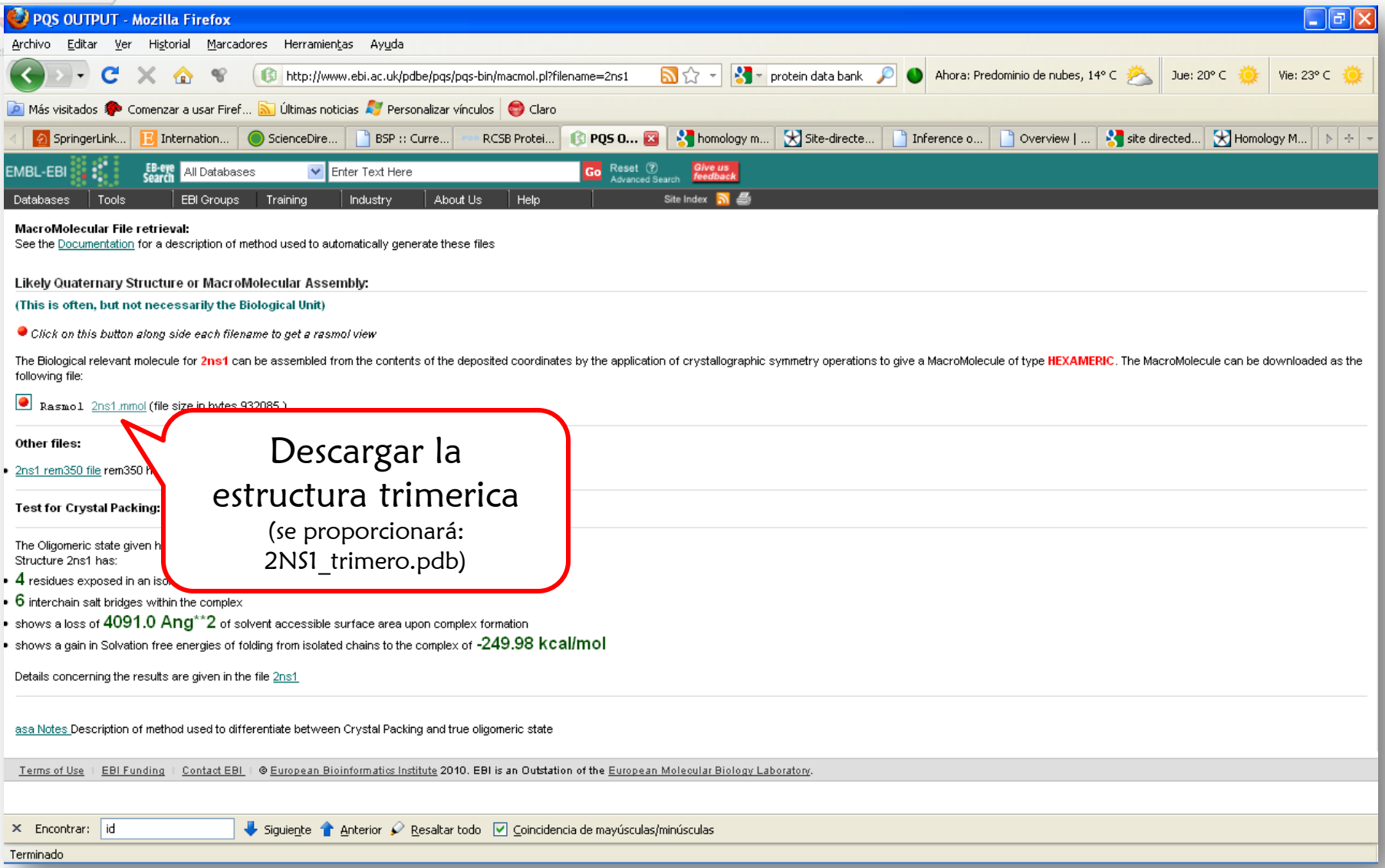
En la pagina del Protein Data Bank, busca nuevamente la entrada para 2NS1, y accede a la solapa links

Accede a PDBSum. Esta es una base de datos del Instituto Europeo de Bioinformática de Inglaterra (EBI) que nuclea mucha de la información disponible para la estructura buscada

Al margen derecho, en el menu "Quick links" acceder a PQS (Protein Quaternary Structure Server). Descargar la estructura trimerica como formato pdb. Aquí la nombraremos 2NS1_trimero.pdb



Protein Quaternary Structure Server

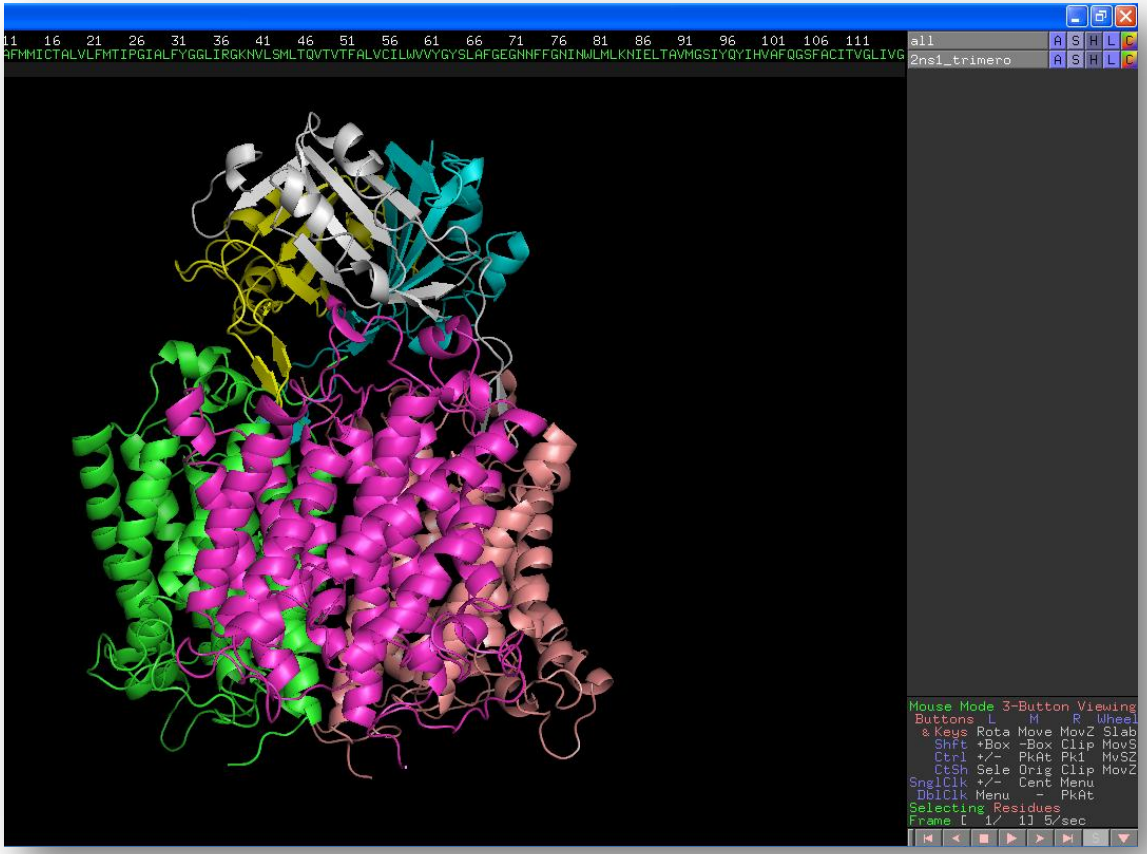

PQS OUTPUT - Mozilla Firefox
http://www.ebi.ac.uk/pdbe/pqs/pqs-bin/macmol.pl?filename=2ns1
MacroMolecular File retrieval:
See the Documentation for a description of method used to automatically generate these files
Likely Quaternary Structure or MacroMolecular Assembly:
(This is often, but not necessarily the Biological Unit)
Click on this button along side each filename to get a rasmol view
The Biological relevant molecule for 2ns1 can be assembled from the contents of the deposited coordinates by the application of crystallographic symmetry operations to give a MacroMolecule of type HEXAMERIC. The MacroMolecule can be downloaded as the following file:
Rasmol 2ns1.mmol (file size in bytes 932085.)
Other files:
2ns1 rem350 file
Test for Crystal Packing:
4 residues exposed in an iso
6 interchain salt bridges within the complex
shows a loss of 4091.0 Ang**2 of solvent accessible surface area upon complex formation
shows a gain in Solvation free energies of folding from isolated chains to the complex of -249.98 kcal/mol
Details concerning the results are given in the file 2ns1
asa Notes Description of method used to differentiate between Crystal Packing and true oligomeric state
Descargar la estructura trimerica
(se proporcionará: 2NS1_trimero.pdb)

- Cargar la unidad biológica del molde: 2NS1_trimero.pdb

File →open

- Representar en cartoon, colorear por cadena

Hide →everything
Show →cartoon
Color →by chan →by chain



- Crear una selección para cada monómero de AmtB, y renombrarla
(en el trímero, corresponde a cadenas A, C y E).
Pintar los residuos a seleccionar, se crea automaticamente la selección "sele".
Actions →rename selection

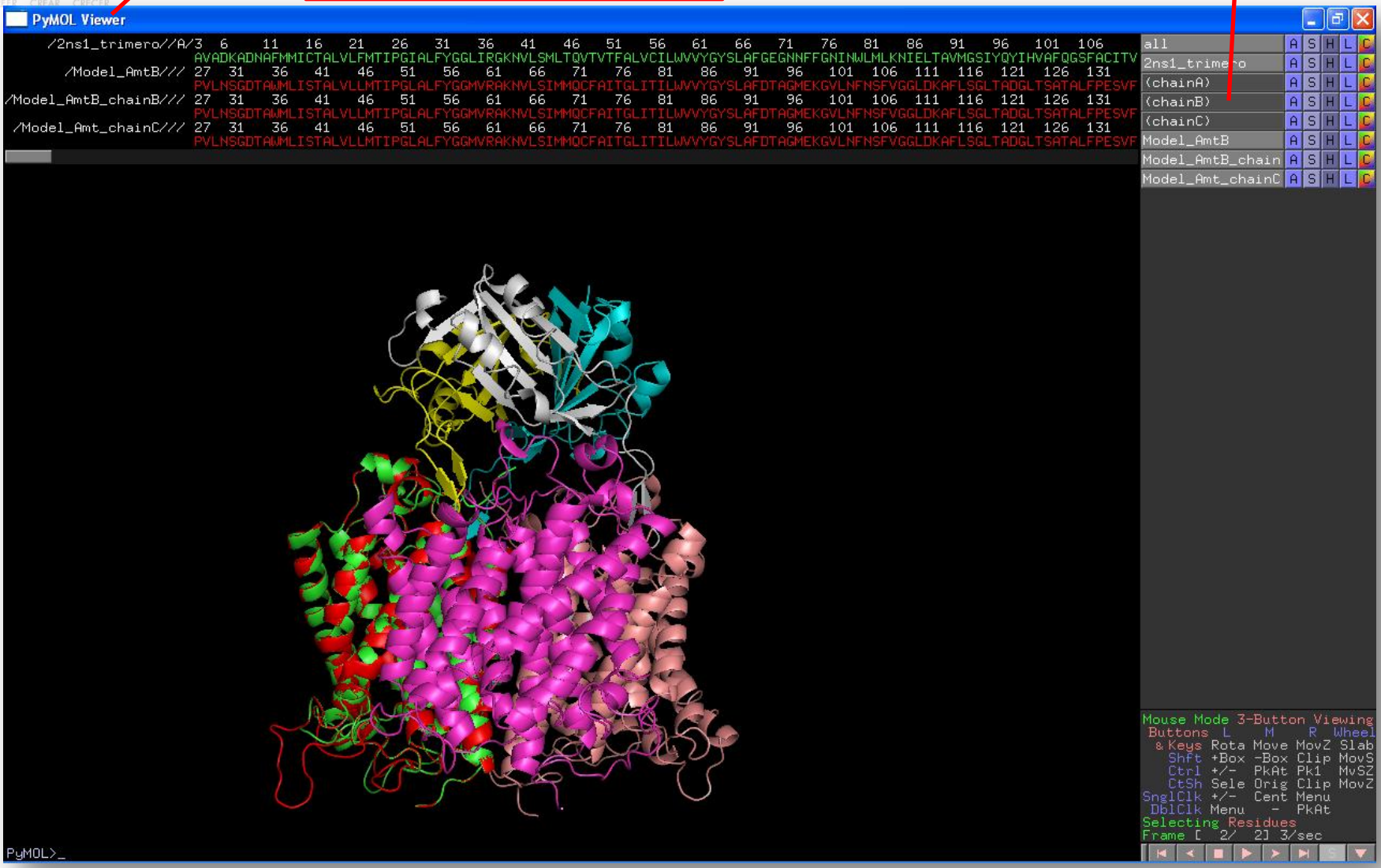
- Abrir el archivo correspondiente al modelo, representar en cartoon coloreado por cadena
File → Open
Hide → everything
Show → cartoon
color → by chain → by chain

- Duplicar el objeto del modelo 2 veces, de modo de contar con 3 copias. Opcionalmente puede renombrar las copias.
Actions →duplicate object
Actions → rename object

- Finalmente se obtiene un sistema como se muestra a continuación

2NS1_trimero
3 copias del modelo

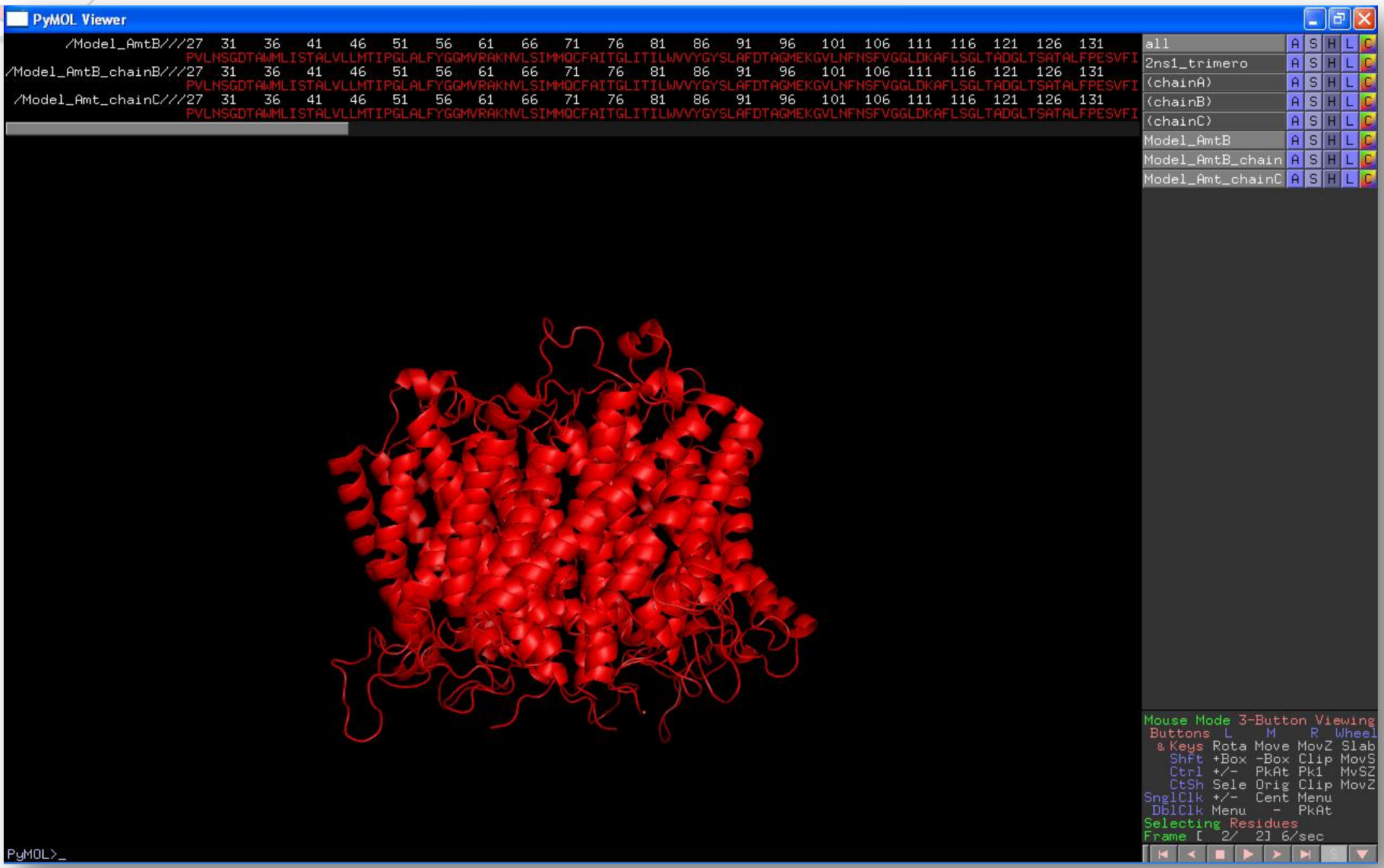
Monómeros seleccionados



- Alinear cada uno de los 3 objetos correspondientes al modelo con la selección correspondiente.

Model_AmtB: Action → align → to selection → chainA
Model_AmtB_chainB: Action → align → to selection → chainB
Model_AmtB_chainC: Action → align → to selection → chainC

- De este modo se posicionan las 3 copias del modelo superpuestas con el trímero. Ocultar 2NS1 y se vera el trímero del modelo como se muestra a continuación

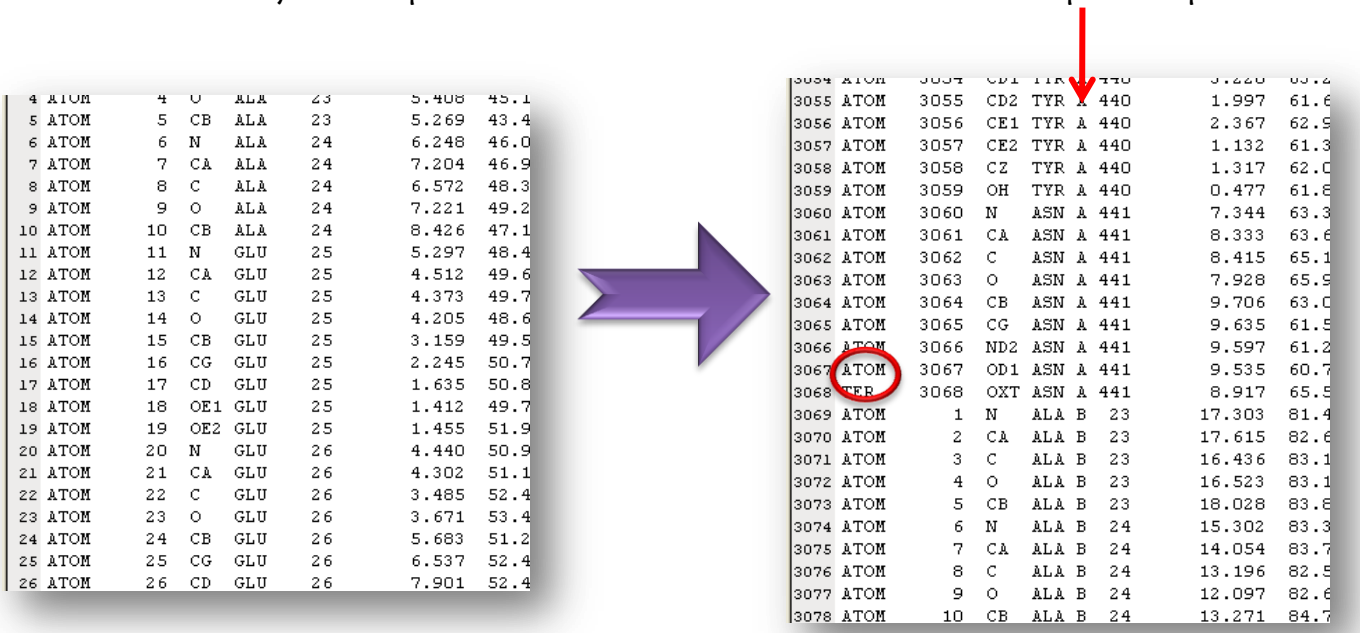

PyMOL Viewer
/Model_AmtB///27 31 36 41 46 51 56 61 66 71 76 81 86 91 96 101 106 111 116 121 126 131
PVLNSGDTAWMLISTALVLLMTIPGLALFYGGMVRAKNVLSIMMQCFAITGLITILWVVYGYSLAFDTAGMEKGVLNFNSFVGGLDKAFLSGLTADGLTSATALFPESVFI
/Model_AmtB_chainB///27 31 36 41 46 51 56 61 66 71 76 81 86 91 96 101 106 111 116 121 126 131
PVLNSGDTAWMLISTALVLLMTIPGLALFYGGMVRAKNVLSIMMQCFAITGLITILWVVYGYSLAFDTAGMEKGVLNFNSFVGGLDKAFLSGLTADGLTSATALFPESVFI
/Model_Amt_chainC///27 31 36 41 46 51 56 61 66 71 76 81 86 91 96 101 106 111 116 121 126 131
PVLNSGDTAWMLISTALVLLMTIPGLALFYGGMVRAKNVLSIMMQCFAITGLITILWVVYGYSLAFDTAGMEKGVLNFNSFVGGLDKAFLSGLTADGLTSATALFPESVFI
all
2ns1_trimero
(chainA)
(chainB)
(chainC)
Model_AmtB
Model_AmtB_chain
Model_Amt_chainC
Mouse Mode 3-Button Viewing
Buttons L M R Wheel
& Keys Rota Move MovZ Slab
Shft +Box -Box Clip MovS
Ctrl +/- PkAt Pk1 MvSZ
CtSh Sele Orig Clip MovZ
SnglClk +/- Cent Menu
DblClk Menu - PkAt
Selecting Residues
Frame [2/ 2] 6/sec
PyMOL>_

- Grabar cada monómero por separado con formato pdb

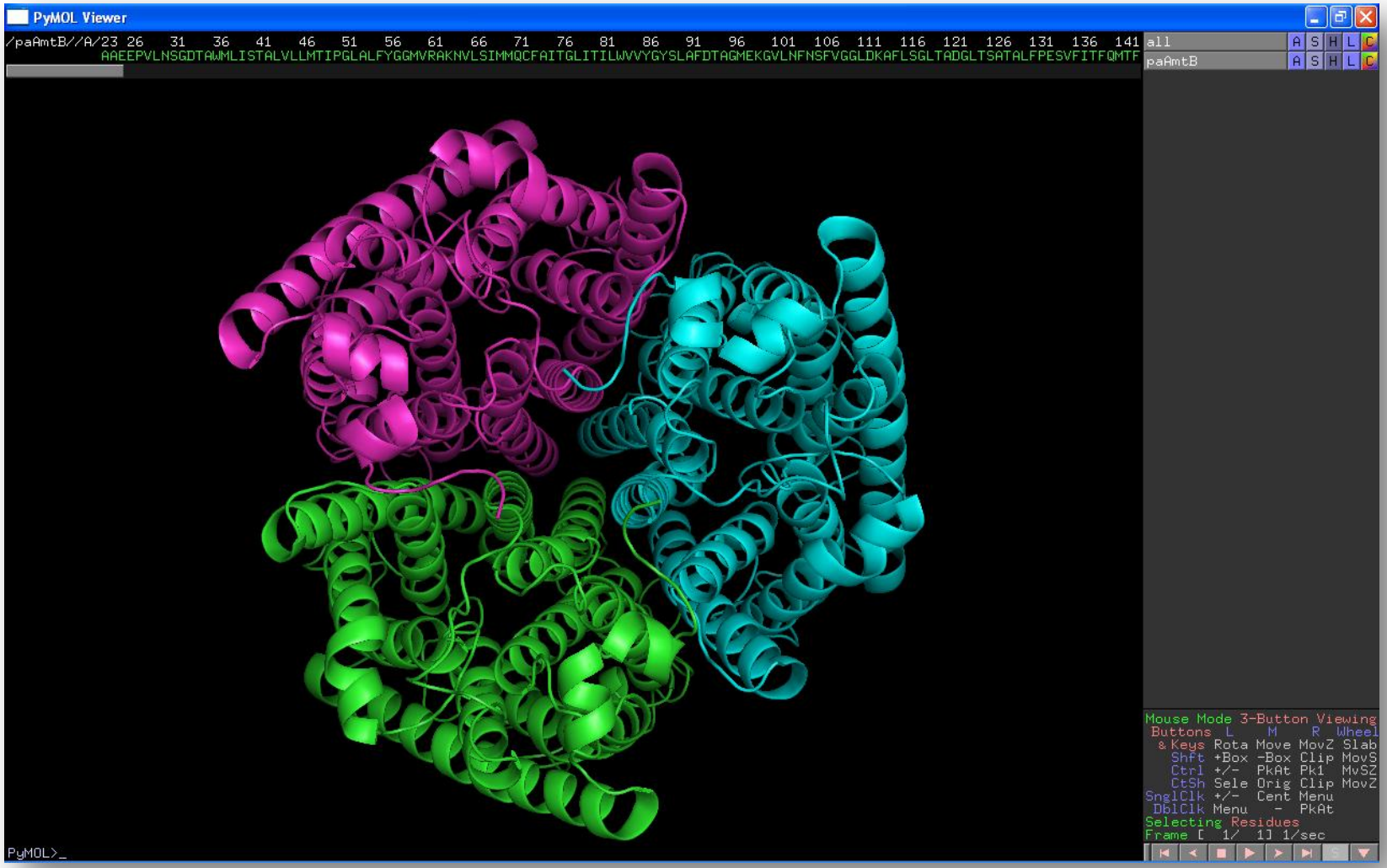
File →save molecule →(elegir molécula) →OK →(elegir destino) →Guardar (Model_AmtB_chainA, Model_AmtB_chainB y Model_AmtB_chainC)

- Abrir los archivos de los monómeros con editor de texto.
- Copiar toda la información del monómero B y pegarla debajo del monómero A, con cuidado de mantener la expresión "TER"
- Repetir lo mismo para el monómero C de modo de tener un solo archivo con las coordenadas atómicas del trímero.
- Modificar manualmente el archivo agregando una columna donde indicar cadenas A, B y C. Guardar en formato pdb (paAmtB.pdb)

Esta es una tarea lenta y tediosa pero necesaria. Se suministrara el archivo final: paAmtB.pdb



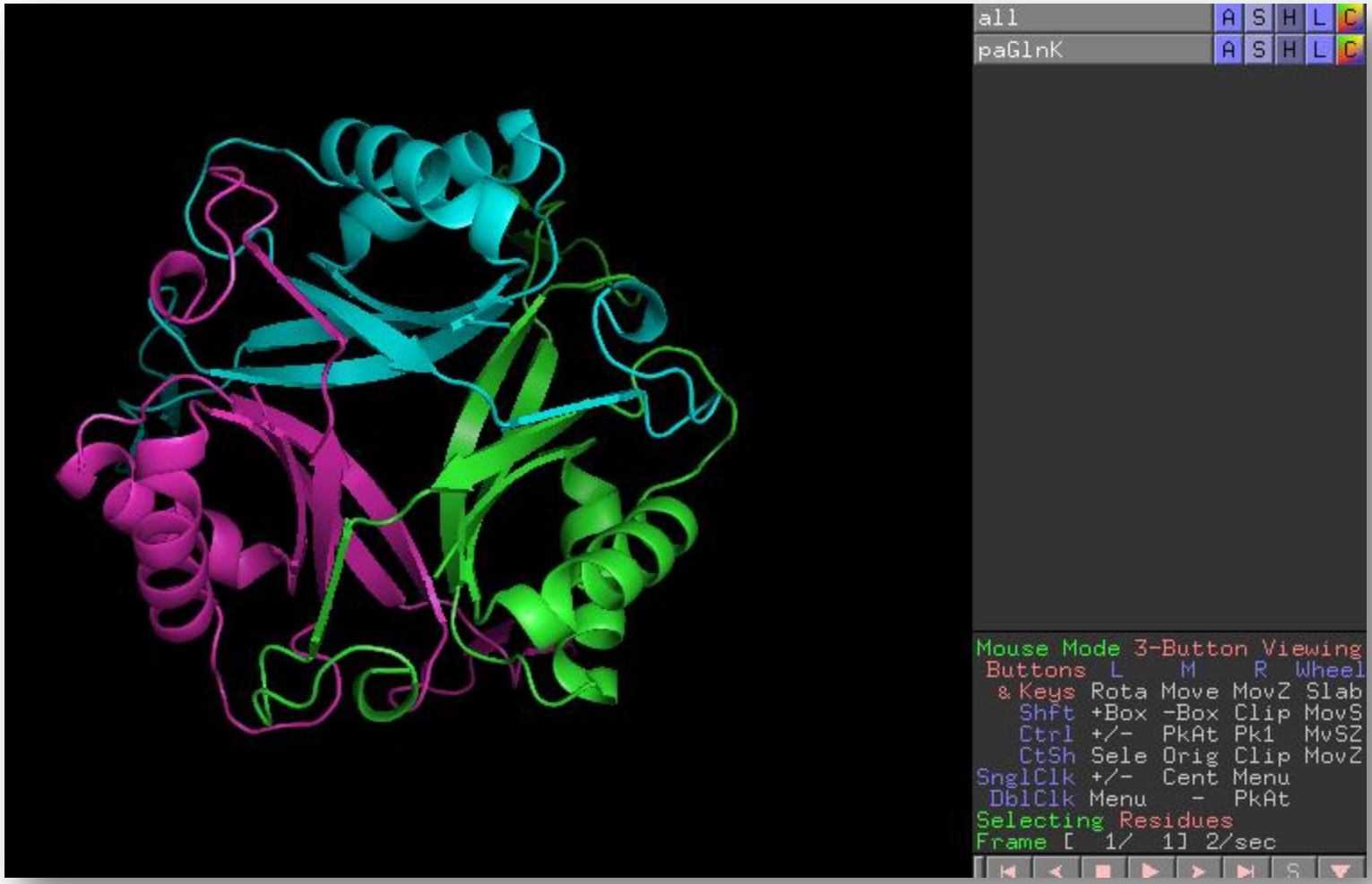
Listo el modelo del trímero del transportador AmtB de *Pseudomonas aeruginosa*!



Te animas a….

- Modelar la proteína reguladora GlnK
- Ensamblar el trímero de la proteína regulatoria GlnK
- Ensamblar el hexámero AmtB-GlnK de *P. aeruginosa*

Modelo del unidad biológica de GlnK de *Pseudomonas aeruginosa*



Modelo del complejo AmtB- GlnK de *Pseudomonas aeruginosa*