

ACTIVIDAD PRÁCTICA 2.1.

Modelización estructural de interacciones proteína-proteína (PPI)

En los ejercicios que se proponen a continuación se estudiará como caso modelo el complejo formado entre las proteínas **savinasa** de la bacteria *B. lentus* y **BASI** de cebada (Micheelsen et al. 2008). BASI (por sus siglas en inglés: *Barley α -Amylase/Subtilisin Inhibitor*) es un inhibidor que se encuentra en la semilla de cebada y la protege de las proteasas secretadas por patógenos, como la savinasa, mediante la formación de un complejo de alta afinidad. Este complejo entre savinasa y BASI fue uno de los casos propuestos ("Target 32") en el experimento CAPRI (Janin et al. 2003), para el que los grupos participantes fueron invitados a enviar predicciones antes de que la estructura del complejo se hiciera pública (Pons et al. 2010).

La información de partida disponible durante el experimento CAPRI fue la siguiente:

- Estructura individual de savinasa: código **PDB 1svn**
- Estructura de BASI en complejo con α -amilasa: código **PDB 1ava** (cadena C)

Dado que ya está disponible la estructura cristalográfica del complejo savinasa/BASI (código **PDB 3bx1**, cadenas A y C), podemos usar este caso para evaluar la capacidad predictiva de diferentes métodos computacionales en condiciones lo más realistas posibles.

1. DOCKING DE CUERPO RÍGIDO (I): PATCHDOCK

Continuando con el caso de la interacción entre savinasa y BASI, ahora se aplicará el método de *docking* de cuerpo rígido del programa PatchDock, que se basa en la búsqueda de regiones en la superficie de las proteínas de partida que muestren complementariedad geométrica.

1.1. Preparación de los ficheros de partida

1.1.1. Descargar las coordenadas del PDB

Desde la página web del Protein Data Bank (www.rcsb.org), busca la entrada correspondiente a savinasa (código **PDB 1svn**) y descarga el fichero asociado en formato PDB ("Download Files" --> "PDB Format"): 1svn.pdb. Haz lo mismo con la entrada correspondiente a BASI (código **PDB 1ava**) y descarga el fichero en formato PDB: 1ava.pdb.

1.1.2. Quitar moléculas no polipeptídicas (iones, aguas, moléculas pequeñas, etc.)

Ahora, prepara los ficheros de coordenadas para poder usarlos en los cálculos de *docking*.

Nota: Es necesario quitar de los ficheros de coordenadas PDB los cofactores, iones, moléculas de agua y otras moléculas que pudieran dar problemas en el cálculo de *docking*. Esto se puede hacer de varias formas: editando el fichero PDB con un editor de textos, usando un visualizador de gráficos moleculares como ICM, o mediante comandos desde la terminal. En este último caso, se podría realizar ejecutando los siguientes comandos que generarían nuevos ficheros que contienen solo las coordenadas correspondientes a las cadenas polipeptídicas (líneas ATOM):

```
>cat 1svn.pdb | grep ^ATOM > 1svn_atom.pdb
>cat 1ava.pdb | grep ^ATOM > 1ava_atom.pdb
```

1.1.3. Seleccionar la/s cadena/s de interés en el fichero PDB

Nota: en el caso de BASI, dado que el fichero PDB contiene dos copias de esta proteína unida a otra (α -amilasa), será necesario generar otro fichero (ej. 1ava_atom_C.pdb) que contenga solo las coordenadas correspondientes a la cadena C. Esto se puede hacer mediante un editor de texto, usando un programa de visualización de gráficos moleculares como ICM, o mediante comandos desde la terminal.

1.2. Ejecución de PatchDock

2.1.1. Producción del fichero de parámetros (params.txt)

```
>buildParams.pl 1svn_atom.pdb 1ava_atom_C.pdb 4.0 EI
```

NOTA: Ver detalles sobre las instrucciones de ejecución de PatchDock en el archivo README que se encuentra en la carpeta de instalación.

Importante:

En el caso actual del sistema savinasa/SABl, nos encontramos ante un *docking* donde el receptor es una enzima (E) y el ligando un inhibidor (I); es por ello que en la preparación del archivo de parámetros (ver comando previo) se especifica al final la etiqueta 'EI'. En otros casos, como por ejemplo cuando el receptor es un anticuerpo (A) y el ligando un antígeno (A), la etiqueta al final deberá ser 'AA' (en el archivo `README` se describe algún caso más). Ten en cuenta este aspecto de manera muy concienzudamente cuando vayas a lanzar el *docking* rígido con PatchDock.

Otras opciones útiles y que se verán más adelante también aparecen descritas en el archivo `README`.

2.1.2. Lanzamiento del programa PatchDock

```
>patch_dock.Linux params.txt out_file1
```

(el cálculo tardará unos 10-15 minutos)

1.3. Generación de las coordenadas de los modelos de PatchDock

Nota: Es posible generar los ficheros PDB para las orientaciones de *docking* de PatchDock almacenadas en su fichero de salida. Por ejemplo, para generar las 10 primeras orientaciones:

```
>transOutput.pl out_file1 1 10
```

Nota: Los ficheros PDB resultantes se llamarán `out_file1.1.pdb`, `out_file1.2.pdb`, etc.

1.4. Análisis de los resultados y comparación con la estructura de referencia del complejo

Para esta sección podemos emplear Chimera, cargaremos la estructura de referencia PDB 3bx1 cadenas A y C y los modelos resultantes de PatchDock y emplearemos MatchMaker para superponer las estructuras y comprobar su RMSD.

2. DOCKING DE CUERPO RÍGIDO (II): SERVIDOR GRAMM-X

El servidor de GRAMM-X es accesible en el enlace <https://gramm.compbio.ku.edu>. Este servidor permite realizar acoplamiento rígido de proteínas identificando la complementariedad en la superficie molecular entre dos proteínas, usando para ello una aproximación geométrica.