

ACTIVIDAD PRÁCTICA 1.3.

Comparación estructural de proteínas: Chimera (II)

Web: <http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>

Se propone Chimera para comparar estructuralmente estructuras globinas. Estas son proteínas encargadas del transporte de oxígeno, para lo que tienen un grupo hemo donde se une la molécula de dioxígeno. Los monómeros de globina se pueden asociar para formar homo-tetrámeros (complejos proteicos que contienen 4 subunidades idénticas).

En la comparación estructural de dos o más proteínas, hay varios conceptos importantes:

a. **Superposición estructural:** es el proceso que consiste en orientar y posicionar las proteínas de forma que se minimice la distancia entre sus átomos.

b. **Desviación cuadrática media o RMSD** (por sus siglas en inglés: *Root Mean Square Deviation*): es una medida para cuantificar la similitud estructural entre dos proteínas.

c. **Alineamiento estructural:** es el alineamiento entre dos o más proteínas en el que las posiciones equivalentes de sus residuos se definen de acuerdo a la superposición de las estructuras. Este alineamiento puede diferir del obtenido mediante alineamiento de secuencias.

3.1. Superposición de 2 estructuras

3.1.1. Lanzar Chimera desde un terminal:

```
>chimera
```

3.1.2. Abrir el fichero PDB *1ecd.pdb*. Desde el menú principal, seleccionar:

File>Open>localizar el fichero

3.1.3. Abrir el fichero PDB *1lh1.pdb*

File>Open>localizar el fichero

3.1.4. Superponer las dos estructuras:

Abrir la ventana informativa *Reply Log*, donde aparecerá información importante durante la ejecución de las diferentes operaciones:

Favorites>Reply Log

Abrir el menú *MatchMaker*:

Tools>Structure Comparison>MatchMaker

En el menú que aparece, definir los siguientes campos en los diferentes subapartados:

En *Reference structure*, seleccionar una estructura de referencia: *1ecd.pdb*

En *Structure(s) to match*, seleccionar la/s estructura/s que se superpondrá/n: *1lh1.pdb*

En *Chain pairing*, si las proteínas a comparar tienen más de 1 cadena, podemos seleccionar qué cadenas queremos superponer (en este caso las proteínas tienen solo 1 cadena, con lo que esta opción no es relevante).

En *Alignment algorithm* y *Matrix*, se eligen el algoritmo de alineamiento y la matriz de sustitución que se usarán para generar un alineamiento de secuencias como base para la superposición estructural (dejar valores por defecto).

Nota: con la opción *Show pairwise alignment(s)* se mostrará el alineamiento de secuencias que se ha usado como base para la superposición estructural. Para este análisis deje sin marcar esta casilla. Con la opción *After superposition, compute structure-based multiple sequence alignment*, se mostrará el alineamiento estructural obtenido tras la superposición. Deje también sin marcar esta casilla.

Hacer clic en el botón *Apply* para llevar a cabo la superposición.

Nota: Una vez ejecutada la superposición, se puede evaluar cómo se ajustan las dos estructuras. En la ventana *Reply Log* aparece la información sobre la superposición, y en la última línea aparece el valor de RMSD.

3.1.5. Guardar la estructura superpuesta en un fichero PDB:

Abrir el menú de *Save PDB*:

File...Save PDB

Nota: En el menú que aparece, definir los siguientes campos: en *Save models*, seleccionar la estructura que se ha superpuesto: *1lh1.pdb*, marcar *Save relative to model*, y seleccionar la estructura de referencia: *1ecd.pdb*. En *File name*, indicar el nombre para el fichero PDB con el que se guardará la estructura indicada en *Save models*: *1lh1_superimposed.pdb*

Hacer clic en el botón *Save*.

Nota: dado que en este caso se han superpuesto dos proteínas, y una de ellas se ha considerado como estructura de referencia, habrá solo un fichero PDB de salida, con la proteína cuya orientación y posición se ha modificado para hacer la superposición.

3.2. Superposición de varias estructuras

3.2.1. Abrir los ficheros PDB 21hb.pdb y 4mbn.pdb.

File>Open>localizar cada fichero

3.2.2. Superponer las estructuras:

Abrir la ventana informativa *Reply Log*, donde aparecerá información importante durante la ejecución de las diferentes operaciones:

En el menú *MatchMaker*, definir los siguientes campos en los diferentes subapartados:

En *Reference structure*, seleccionar una estructura de referencia: 1ecd.pdb

En *Structure(s) to match*, seleccionar el resto de estructuras que se superpondrá/n: 1lh1.pdb, 21hb.pdb, 4mbn.pdb

Nota: manteniendo presionado Mayúsculas (*Shift*) o Ctrl se pueden seleccionar varias estructuras.

Hacer clic en el botón *Apply* para efectuar la superposición.

Nota: En la ventana *Reply Log* podemos ver el valor de RMSD para cada proteína superpuesta en la de referencia.

3.2.3. Guardar las estructuras superpuestas:

Abrir el menú de *Save PDB*:

File>Save PDB

En el menú que aparece, definir los siguientes campos:

En *Save models*, seleccionar las estructuras que se han superpuesto: 1lh1.pdb, 21hb.pdb, 4mbn.pdb (manteniendo presionado Mayúsculas (*Shift*) o Ctrl podemos seleccionar varias estructuras). Marcar *Save relative to model*, y seleccionar la estructura de referencia: 1ecd.pdb

En *File name*, indicaremos el nombre para el fichero PDB en el que se guardará la estructura indicada en *Save models*: all_superimposed.pdb

En *Save multiple models*, se debe elegir si guardar todas las estructuras superpuestas en un solo fichero (opción "*a single file*") o en varios ficheros (opción "*multiple files*"), en cuyo caso, el nombre del fichero en *File name* deberá contener \$name o \$number para numerar los diferentes ficheros.

Hacer clic en el botón *Save*.

Nota: en el caso de elegir un solo fichero de salida, las diferentes estructuras estarán separadas por las líneas "MODEL 1", "MODEL 2", etc., como los ensamblados de RMN.

3.3. Modelado de ensamblados multimoleculares mediante superposición

La leghemoglobina (PDB 1LH1) es una globina vegetal cuya estructura cristalográfica es un monómero. Sin embargo, se sabe que un homólogo lejano, como la hemoglobina humana (PDB 1A3N), es capaz de formar homotetrámeros. Podemos usar esta información para tratar de construir el posible homo-tetrámero que podría formar la leghemoglobina, usando las herramientas de superposición de estructuras que hemos aprendido.

3.3.1. Abrir los ficheros PDB 1a3n.pdb y 1lh1.pdb (antes cerrar y volver a abrir Chimera para tener el *Workspace* limpio):

File>Open>localizar cada fichero

3.3.2. Superponer el monómero de leghemoglobina en la cadena A de hemoglobina:

Abrir la ventana informativa *Reply Log*, donde aparecerá información importante durante la ejecución de las diferentes operaciones:

Favorites>Reply Log

Abrir el menú *MatchMaker*:

Tools>Structure Comparison>MatchMaker

En el menú de *MatchMaker*, definir los siguientes campos:

En *Chain pairing*, marcar la opción *Specific chain in reference structure with best aligning chain in match structure*.

En *Reference structure*, seleccionar la cadena A de 1a3n.pdb como estructura de referencia: 1a3n.pdb *chain A*

En *Structure(s) to match*, seleccionar: 1lh1.pdb

Apply

3.3.3. Guardar el primer monómero superpuesto:

Abrir el menú de *Save PDB*:

File>Save PDB

En el menú que aparece, definir los siguientes campos:

En *Save models*, seleccionar: 1lh1.pdb

Marcar *Save relative to model*, y seleccionar: 1a3n.pdb

En *File name*, indicaremos: *leghemoglobin_A.pdb*

Save

3.3.4. Superponer el monómero de leghemoglobina en el resto de cadenas de hemoglobina y guardar sus coordenadas:

Nota: En el menú de *MatchMaker*, repetiremos la operación anterior, con la misma estructura a superponer (1lh1.pdb) pero seleccionando las diferentes cadenas de 1a3n.pdb como *Reference structure*: 1a3n.pdb *chain B* ... 1a3n.pdb *chain C* ... 1a3n.pdb *chain D*. Para cada superposición, la

orientación resultante se guardará en un fichero PDB de la misma forma que antes, con diferentes nombres: *leghemoglobin_B.pdb* ... *leghemoglobin_C.pdb* ... *leghemoglobin_D.pdb*

3.3.5. Generar el fichero PDB del homo-tetrámero:

Nota: Los ficheros creados para los monómeros de leghemoglobina en las diferentes orientaciones serán concatenados para formar un solo fichero PDB.

Ejecuta los siguientes comandos en una terminal para unir las cadenas de leghemoglobina en el fichero *tetrameric_leghemoglobin.pdb*:

```
>cat leghemoglobin_A.pdb >> tetrameric_leghemoglobin.pdb  
>cat leghemoglobin_B.pdb >> tetrameric_leghemoglobin.pdb  
>cat leghemoglobin_C.pdb >> tetrameric_leghemoglobin.pdb  
>cat leghemoglobin_D.pdb >> tetrameric_leghemoglobin.pdb
```

Nota: El nuevo fichero contiene un modelo para el posible homo-tetrámero de leghemoglobina.

Sugerencia: abrir el ensamblado con Chimera, analizar sus interacciones, o identificar los residuos relevantes para la hipotética formación del tetrámero (pista: ver regiones inter-monoméricas).