

Curso de posgrado 2016: “Predicción y análisis in silico de la estructura e interacciones de proteínas en diálogo con la experimentación”

Lugar y fechas 2016: Facultad de Ciencias, Universidad de la República. **27/11/16 al 09/12/16.**

Objetivos: Brindar una panorámica actualizada (dirigida a estudiantes de posgrado e investigadores activos en áreas afines) sobre fundamentos y aplicaciones de una serie de modelos y herramientas de la *Química Teórica y Computacional*, la *Biofísica computacional* y la *Bioinformática Estructural* disponibles para predecir y analizar *in silico* la estructura e interacciones de proteínas y su interpretación en el contexto de problemas de interés biológico, biotecnológico y/o biomédico.

Modalidad del curso: clases teóricas de 4 hs diarias (9-13 hs) constituidas por presentación de fundamentos y seminarios a cargo de expertos exponiendo casos de investigación abordados bajo un enfoque integrado teórico-experimental. Actividades prácticas computacionales (14-18 hs) y seminarios finales a cargo de los participantes.

Requisitos previos: ser estudiante de posgrado o investigador/a activo/a en áreas afines a la temática, con conocimientos básicos a nivel universitario sobre estructura de proteínas e interacciones moleculares.

Responsables: **Dras. E. Laura Coitiño y Alicia Merlino**

*Laboratorio de Química Teórica y Computacional, Instituto de Química Biológica (IQB),
Facultad de Ciencias, Udelar y PEDECIBA-Área Química.*

Especialistas invitados confirmados en la edición 2016:

- Dra. Beatriz Álvarez-** Laboratorio de Enzimología, IQB-Facultad de Ciencias-Udelar y PEDECIBA. (*Albúmina sérica humana -HSA- y la reactividad de su tiol*)
- Dr. Guzmán Álvarez-** PDU “Investigación y Desarrollo de Moléculas Bioactivas”, Dpto. Cs. Biológicas CenUR-Litoral Norte, Centro Universitario de Paysandú, Udelar y PEDECIBA (*Desarrollo de inhibidores orgánicos para TIM de parásitos*).
- Dr. A. Buschiazzo -** Unidad de Cristalografía de Proteínas, Institut Pasteur de Montevideo, Uruguay y PEDECIBA. (*Determinación estructural de proteínas por cristalografía de RX*).
- Dra. Ana Denicola-** Laboratorio de Físicoquímica Biológica, IQB, Facultad de Ciencias, Udelar y PEDECIBA. (*Estudios de Sirtuína 6 y la modulación de sus interacciones por ácidos grasos*).
- Dra. Ana M. Ferreira-** Laboratorio de Inmunología, Facultad de Ciencias-Facultad de Química, Udelar y PEDECIBA. (*Estudios de la activación de PPARγ por nitroalquenos derivados de ácidos grasos*).
- Dr. Gerardo Ferrer-** Laboratorio de Físicoquímica Biológica, IQB, Facultad de Ciencias, Udelar. (*Estudios del papel de residuos conservados en la eficiencia catalítica de la Prx5*)
- Dra. D. Gambino-** Grupo Quím. Inorgánica Medicinal & Bioinorgánica Medicinal, Fac. de Química, Udelar y PEDECIBA. (*Estructura de fumarato reductasas de parásitos y su inhibición por compuestos de coordinación de Pt/Pd/V*).
- Dr. Homero Rubbo-** Depto. de Bioquímica, Facultad de Medicina, Udelar y PEDECIBA. (*Estudios de inhibición de las enzimas PGHS-1/-2 por nitroalquenos de ácidos grasos*).
- Dr. Munir Skaff-** Centro de Ingeniería y Ciencias de la Computación, Instituto de Química, Universidad de Campinas, UNICAMP, Brasil. (*Muestreo avanzado en dinámica molecular de interacciones ligando-proteína, Interacciones en receptores nucleares y otras proteínas de relevancia en diabetes*).
- Dra. Laura Masgrau-** Grupo de Biología Molecular Teórica, Instituto de Biotecnología y Biomedicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Campus de Bellaterra, Barcelona, España. (*Enzimología Computacional, caracterización del mecanismo de glicosiltransferasas y lipoxigenasas*).

Carga horaria global: **44 hs teóricas, 44 hs prácticas** (con cupos para desarrollar un trabajo final aplicado de un mínimo de 30 hs. adicionales).

Régimen de ganancia: asistencia al 80% de las actividades y presentación de un seminario; examen global final (e informe escrito del trabajo aplicado final para quienes opten por esta modalidad).

Créditos propuestos: **10 créditos sin trabajo final, 12 créditos mínimos con trabajo final aplicado.**

Frecuencia: bianual, ubicado en 2 semanas al final del 2^{do} semestre, en años pares.

Cupos: c/práctico: 20 participantes; **Módulo teórico** (6 créditos): 30 participantes.

PROGRAMA ANALÍTICO

A) CONTENIDOS TEÓRICOS

Semana 1. Domingo 27/11–Viernes 02/12 de 2016 – 4 hs diarias (9-13 hs)

1. La arquitectura proteica y su relevancia en problemas de interés biológico y biomédico. Interacciones reactivas y no reactivas de proteínas: actualización de viejos conceptos a la luz de avances recientes del conocimiento científico (i.e.: nueva visión del enlace de hidrógeno). Escalas espaciales y temporales de los fenómenos a modelar. Teorías, modelos, métodos y procedimientos de modelado computacional de base fisicoquímica vs. métodos de base estadística. Influencia del entorno y su incorporación en los modelos. Almacenamiento y búsqueda de información estructural: formatos *FASTA*, *PDB* y *mmCIF*; portales públicos para obtener secuencias y estructuras. Visualización molecular y representación y análisis de la estructura 2D/3D asistidos por computadora. (L. Coitiño)
2. ¿Qué información se puede predecir *in silico* desde la secuencia? Localización sub-celular de proteínas. Estructura secundaria, análisis DSSP. Grado de orden molecular. Modificaciones post-traducción (PTMs). Exposición de residuos al solvente: superficies accesibles. Confiabilidad de los resultados. Paquetes vs. servidores de acceso público. (L. Coitiño)

27/11/16 – Seminario #1: Enzimología Computacional de lipoxigenasas y glicosiltransferasas-(L. Masgrau)

3. Niveles de organización estructural de proteínas, repaso y profundización. Métodos experimentales para la determinación estructural en cristales y solución (cristalografía de rayos X, NMR y microscopía electrónica) alcances y obstáculos en el campo. Aspectos a tener en cuenta al trabajar con estructuras experimentales como base para el modelado. (A. Buschiazzo)
4. La estructura proteica en solución al detalle atómico: Mecánica y Dinámica Molecular clásicas (MM+MD). Preparación de estructuras: residuos ionizables, campos de fuerza y paquetes, descripción del solvente y el medio, tratamiento de interacciones electrostáticas de largo alcance. Condiciones periódicas (PBC). Algoritmos de minimización y simulación. Análisis de trayectoria: evolución temporal de la estructura y flexibilidad (RMSD, GDT, RMSF). Selección de estructuras representativas por análisis de *cluster*. Redes de enlace de hidrógeno desde la perspectiva geométrica (identidad, ocupación). (A. Merlino).

28/11/16 – Seminario #2: Glicación de péptidos y proteínas clave en Diabetes, Alzheimer y Cáncer-(L. Coitiño)

5. El campo de fuerza CHARMM, la suite CHARMM y sus aplicaciones al estudio de estructura y dinámica de proteínas y sus interacciones. (L. Masgrau).

29/11/16 - Seminario #3: Albúmina sérica humana: pKa y oxidación de su tiol - (B. Álvarez)

6. Predicción de la estructura 3D de proteínas a partir de su secuencia. Comparativa Homología, *threading* y *ab initio*. Fundamentos y aplicaciones de modelado por homología. Principales paquetes y servidores de acceso público disponibles. Fundamentos y aplicaciones de modelado estructural por *threading*. Principales paquetes y servidores de acceso público. Calidad de las estructuras obtenidas en solución: refinamiento y validación de los resultados. Las iniciativas CASP (*Critical Assessment of Techniques for Protein Structure Prediction*). (A. Merlino).

30/11/16 - Seminario #4 – NAD-Fumarato reductasas de protozoarios y su inhibición - (D. Gambino)

7. El campo de fuerza AMBER, la suite AMBER14 y aplicaciones al estudio estructural de proteínas en solución. Predicción *in silico* del efecto de mutaciones puntuales en proteínas (ejs.: SF-1, pVHL, Prx5). Residuos no estándar y su parametrización (GAFF y RESP). Determinación del pKa de residuos proteicos por integración termodinámica y muestreo MD. (J. Bonanata - L. Coitiño - S.Portillo).

01/12/16 - Seminario #5 – Prx5 y mutantes: residuos clave en su oxidación por H₂O₂ - (G. Ferrer-Sueta)

8. Cuando el detalle atómico no basta: métodos mixtos QM/MM para refinar localmente la estructura proteica. QM/MM aditivo y sustractivo. La estrategia ONIOM aplicada a proteínas. *Embedding* mecánico y electrónico, sobre-polarización y *refitting* de cargas atómicas. Comparativa de métodos QM aplicables. Propiedades a predecir desde la estructura proteica: tendencia global a reaccionar, nucleofilia/electrofilia de residuos específicos. Selección de residuos blanco de reacción en estructuras proteicas: reactividad local (funciones de Fukui mapeadas sobre la superficie molecular y condensadas, blandura local). Caracterización de redes de enlace de hidrógeno: órdenes de enlace. (J. Bonanata - L. Coitiño).

02/12/16 - Seminario #6 – Activación del receptor nuclear PPAR γ por ácidos grasos nitrados - (A.M. Ferreira)

Semana 2. Lunes 05/12–Viernes 09/12 de 2016 – 4 hs diarias (9-13 hs)

9. Predicción y caracterización detallada de interacciones no covalentes ligando-proteína: del análisis de la superficie molecular 3D al *docking* ligando-proteína (algoritmos de búsqueda y funciones de puntuación, *scoring*). Ventajas y desventajas. Iniciativas CAPRI (*Critical Assessment of PRotein Interactions*). Ejemplos y aplicaciones (A. Merlino).

05/12/16 - Seminario #7- *Triosafosfato isomerasas de parásitos y su inhibición* (G. Álvarez)

10. Estrategias MM/MD aplicadas a complejos no covalentes. Determinación de la energía de formación de complejos ligando-proteína con MM-PB(GB)SA vs. estrategias QM/MM ONIOM con *embedding* mecánico y electrostático. Aplicaciones sobre interacciones con cofactores, sustratos e inhibidores de enzimas; activadores de receptores nucleares. (A. Merlino, L. Coitiño).

06/12/16 – Seminario #8- *PGHS-1/-2: sitios COX/POX e inhibición por NO₂-Araquidonato*. (H. Rubbo)

11. Predicción y caracterización detallada de interacciones reactivas en proteínas: determinación de la estructura de complejos de Michaelis enzima-sustrato y estados de transición en proteínas con estrategias ONIOM(QM:MM) y modelos reducidos QM-PCM (*clusters*). Caminos de reacción IRC y barreras de energía libre. Seguimiento detallado de la reorganización geométrica y electrónica a lo largo de la coordenada de reacción. Ancho de la barrera y efecto túnel. Ejemplos de aplicación sobre casos de interés previamente presentados. (L. Coitiño).

07/12/16 – Seminario #9- *Sirtuina 6 y su modulación por ácidos grasos*. (A. Denicola)

12. Muestreo avanzado en dinámica molecular de complejos ligando-proteína. (M. Skaf)
Presentación y análisis de estrategias en el abordaje del problema abierto (aspectos teóricos).

08/12/16 – Seminario #10 – *Nuclear receptors and other proteins of relevance in diabetes; carbohydrate-modifying enzymes*. (M. Skaf)

Seminarios a cargo de los participantes (parte teórica del examen final)

09/12/16 - Seminarios a cargo de los participantes (continuación) y definición de temas de proyecto aplicado.

B) CONTENIDOS PRÁCTICOS

Semana 1. EJE ESTRUCTURA - Domingo 27/11–Viernes 02/12 de 2016 – 4 hs diarias (14-18 hs)

Práctico 1– Bases de datos de secuencias y estructuras. Predicción a partir de la secuencia. Visualización y análisis estructural 3D con DS Visualizer y VMD.

1A- Secuencia: búsqueda en UniProt (Fasta), alineamiento y comparación – Predicción de la localización sub-celular, la estructura secundaria y el grado de desorden (DSSP; PSIPRED, DISOPRED) – Sitios de modificaciones PTM (glicosilación, glicosilación, oxidación tioles, hidroxilación, acetilación, etc., ExPasy, FindMod).

1B- Estructuras 3D: búsqueda en PDB Databank y visualización (Jmol, Ligand Explorer). Análisis de estructura secundaria (DSSP) y superficie expuesta al solvente (GetArea, NetSurfP, etc.) - Representación 3D y análisis estructural detallado con *Discovery Studio 2016* y *VMD 1.9.2*.

Práctico 2- Visualización+análisis 3D: preparación de estructuras proteicas para MM/MD en solución.

2A- Determinación aproximada de pKa de residuos ionizables (PropKa y H++).

2B- Preparación de estructuras en solución y archivos para MM/MD con AMBER14 (insulina, HSA, Histona H1)

2C- Preparación de estructuras y archivos para MM/MD con CHARMM (Lipoxigenasas, glicosiltransferasas)

Práctico 3- Modelado MM/MD de proteínas en solución con la suite CHARMM

3A- Producción MM/MD con CHARMM aplicado a enzimas

3B- Análisis de estructura y dinámica

Práctico 4- Predicción de la estructura 3D a partir de la secuencia. Análisis de calidad estructural.

4A- Homología – *Modeller* y *Swiss-Model* aplicado a Fumarato Reductasas (FRs) de *T. cruzi* y *L. major*

4B- Threading – *I-Tasser* y *Phyre*² aplicado a FRs

4C- Determinación de calidad de las estructuras obtenidas (Verify3D, ProQ, Procheck).

Práctico 5- Modelado MM/MD de proteínas en solución con la suite AMBER (generación o refinamiento).

5A- Producción MM/MD AMBER14 (CPU y GPU; simulación sub-microsegundos HSA y Prx5 en estado reducido).

5B- Análisis: comparación estructural global (RMSD y GDT) y específica (parámetros geométricos, SASA) - Flexibilidad p/residuo (RMSF) - Red de EdH (naturaleza, ocupación) – estructuras representativas por clustering.

5C- Mutaciones puntuales y refinamiento estructural (Prx5, SF-1, pVHL en VBC-HIF) – Parametrización de residuos no estándar (oxidación de Cys en HSA y Prx5, modificaciones por glicación en Lys/Arg de HSA e Histona H1).

Práctico 6- Refinamiento local de la estructura con métodos QM/MM (ONIOM) y predicción QM/MM y QM de la reactividad de residuos proteicos.

6A- Selección de regiones QM y MM con Gaussian09 (g09) y Gaussview5; tratamiento de la frontera QM/MM. Optimización (regiones QM y MM flexibles)+Hessiano vs. single-point QM/MM. ONIOM ME vs EE. Complejos de HSA y Prx5 con H₂O₂ y nitroalquenos de ácidos grasos con PPAR γ .

6B- Tendencia a reaccionar de residuos proteicos con ONIOM y PCM-DFT usando g09 (dureza global, E_{HOMO}/E_{LUMO} como predictores globales de ganancia y pérdida de electrones; funciones de Fukui mapeadas en la densidad electrónica y condensadas; blandura local). Ejemplos en HSA, Prx5, Histona H1, EAL.

6C- Los modelos materiales reducidos con QM (estrategias de recorte: clusters de átomos esenciales): Análisis del entorno en mutaciones puntuales y modificaciones post-traducción. Redes de enlace de hidrógeno llegando al detalle electrónico (Cargas NPA e índices de enlace de Wiberg).

Semana 2 – EJE INTERACCIONES – Lunes 05/12 al Viernes 09/12 de 2016. – 4 hs diarias (14-18 hs)

Práctico 7-Interacciones no covalentes ligando-proteína por docking molecular y refinamiento MM/MD.

7A- Docking molecular – Autodock aplicado a inhibidores de TIM.

7B- Refinamiento estructural de complejos ligando-proteína a nivel MM/MD con Amber14

7C- Análisis estructural: RMDS, RMSF, caracterización de enlaces de hidrógeno, superficies expuestas

Práctico 8- Selección de capacidades avanzadas con AMBER y Gaussian09.

8A- Energética de la interacción con MM-PB(GB)-SA (VBC-HIF) y con ONIOM-EE (PPAR γ -nitrolípidos).

8B- Determinación de pKa de residuos proteicos por integración termodinámica (TI) y constant pH MD en Prx5.

Práctico 9- Interacciones reactivas de proteínas: mecanismos de reacción QM/MM (ONIOM): TSs e IRCs.

9A- Búsqueda de estados de transición (TS) y complejos intermediarios de reacción y su verificación. Refinamiento por reajuste de cargas atómicas vs. embedding electrónico en la oxidación de HSA y Prx5.

9B- Determinación del camino de reacción IRC y análisis de la evolución de descriptores estructurales (geométricos y electrónicos) y de reactividad a lo largo del mismo.

9C- Energética del proceso: barrera de reacción y energía de reacción. Ancho de la barrera y efecto túnel.

Práctico 10- Aplicación a problemas abiertos: el caso de la Sirt6

Diseño de estrategias de abordaje y preparación de estructuras y archivos por los participantes.

Práctico 11 - Examen global final de práctico - Viernes 09 de diciembre - 14-18 hs.

Equipo docente a cargo de los tutoriales - laboratorios computacionales

Stephanie Portillo, Jenner Bonanata, Lucía Minini, Alicia Merlino, Laura Masgrau, Laura Coitiño

BIBLIOGRAFÍA: TEXTOS DE BASE

- Frenkel, D.; Smith, B. *Understanding Molecular Simulations. From algorithms to applications.* Acades Press, 2002.
- Cramer, C. *Essentials of Computational Chemistry: Theories and Models, 2nd Ed.* John Wiley & Sons, 2004.
- Gu, J.; Bourne, P.E. (Eds). *Structural Bioinformatics, 2nd Ed.* Wiley-Blackwell, 2009.
- Lewars, E. *Computational Chemistry: Introduction to the Theory and Applications of Molecular and Quantum Mechanics, 2nd Ed.* Springer, 2011.
- Christov, C. (Ed.) *Computational Chemistry Methods in Structural Biology-Advances in Protein Chemistry and Structural Biology, vol.85.* Academic Press, 2011.
- Christov, C.; Karabancheva-Christova, T. (Eds.) *Structural and Mechanistic Enzymology: Bringing Together Experiments and Computing -Advances in Protein Chemistry and Structural Biology, vol.87.* Academic Press, 2012.
- Náray-Szabó, G.; Warshel, A. (Eds.). *Computational Approaches to Biochemical Reactivity (Understanding Chemical Reactivity),* Springer-Science+Business Media, B.V., 2013.
- Náray-Szabó, G. (Ed.). *Protein Modelling,* Springer-Science+Business Media, B.V., 2014.

Artículos relacionados. En el Entorno Virtual de Aprendizaje (eva.universidad.edu.uy) del curso se dispondrá de la colección de artículos originales de referencia que exponen los problemas abordados bajo una óptica integrada in silico-experimento por varios de los docentes del curso.