

De la genómica secuencial a la proteómica estructural. Contribución de la RMN al proteoma.

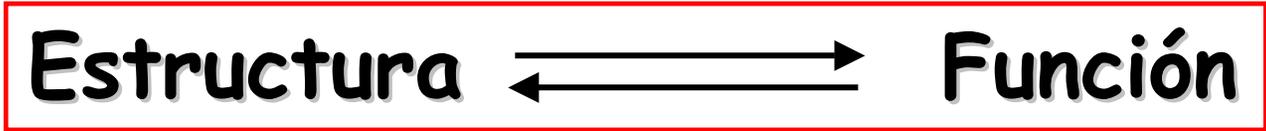
B. Celda, D. Monleón, V. Esteve, M.C. Martínez-Bisbal, E. Navarro, B. Martínez-Granados

*Depto. Química Física, Universitat de Valencia,
Burjassot 46100, Valencia, Spain*

Esquema Presentación Genómica (Proteómica) Estructural

- 1.- Definiciones y Características Genómica Estructural
- 2.- Ejemplo de Aproximación de aplicación de RMN a la Proteómica Estructural
(Ontario Center for Structural Proteomics)
- 3.- Determinación Estructura de proteína "hipotética" del genoma del *Thermoplasma acidophilum* (TA1414)
- 4.- Dinámica Molecular \leftrightarrow Función mediante RMN.
Aplicación a Venenos de Serpiente
- 5.- Reconocimiento Molecular Proteína/Proteína mediante RMN: Aplicación al complejo BPTI/Tripsina

Genómica (Proteómica) Estructural



Iniciativa de Estructura de Proteínas PSI

	Nº Total Secuencias Proteínas	Nº Total Familias Proteínas
Nombre Familiar Colección	Nº Secuencias	Nº Familias
COGs	332	34 (34)
Pfam	169524	1389 (818)
PIRALN	40739	3794 (2906)
ProClass	54535	2125 (1594)
ProDom	15454	2587 (2587)
ProtoMap	31119	2285 (1744) [1304]
PSSP	148377	30336 (24381)
Systems	80201	51069 (49681) [45044]
TOTAL	540281	93620 (88745)

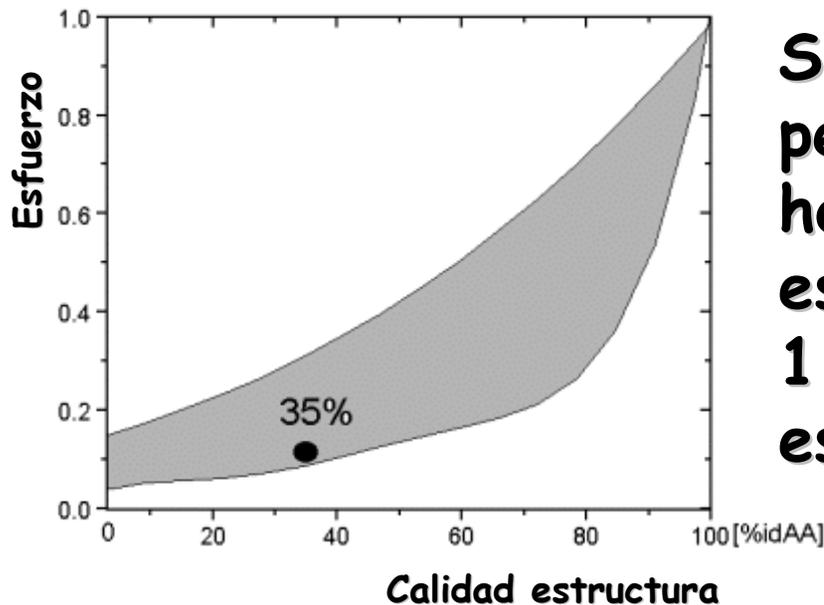
(Sin estructuras conocidas);

[Sin estructuras conocidas y no transmembrana]

<http://www.structuralgenomics.org/>

Objetivo Fundamental Genómica Estructural

Obtención de 1 o más Estructuras 3D representativa para cada dominio estructural de una familia en la naturaleza mediante la aplicación de **Técnicas Estructurales de Elevada Rapidez**



Si se supone que un $<35\%$ id. aa permite una modelización por homología con una calidad estructural aceptable
1 de cada 10-16 proteínas
esfuerzo (0,1-0,06)

Retos y Objetivos Parciales Proteómica Estructural

- Organización bases de datos de proteínas (familias)
- Priorización familia/s proteína/s
- Selección proteínas diana
- Predicción resto proteínas familia→Modelización Homología
- Coordinación evitar repetición de esfuerzos
- Desarrollo procesos automatización: Aceleración 3D
- 10.000 estructuras/5 años?
- 3D proteína \longleftrightarrow Función Molecular
- Estructura 3D en células??
- Descubrimiento y/o diseño de nuevos fármacos
proteínas/diana

Función Molecular

Tipo:

- 1.- Sitios unión y Especificidad
- 2.- Actividades Catalíticas
- 3.- Regulación mediante Cambios Conformacionales y Modificaciones Covalentes

Niveles:

- 1.- Baja Resolución:
Clase de función: Enzima; Enlazante ADN,...
- 2.- Mediana Resolución:
Función Primaria: beta-lactamasa o proteasa
- 3.- Alta resolución:
Especificidad primaria: beta lactamasa efectiva contra penicilinas más que cefalosporinas.

Técnicas Genómica Estructural

A) Rayos-X (Sincrotón)

Estructura 3D precisa y rápida

B) RMN

Estructura 3D precisa y rápida↓

Dinámica ↔ Función

Reconocimiento Molecular

C) Modelización por Homología

Parques "Temáticos" Genómica Estructural

Iniciativas Mundiales	Número
USA/Canadá	15(3)
Francia	3
UK	2
Alemania	1
Asia(Japón)	3
Israel	1

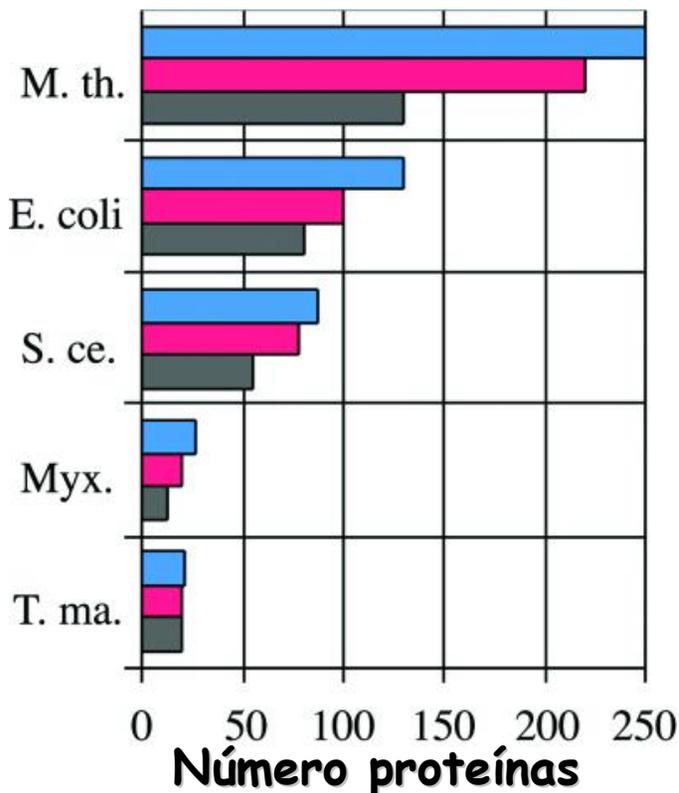
RIKEN Structural Genomics Initiative (Japón)



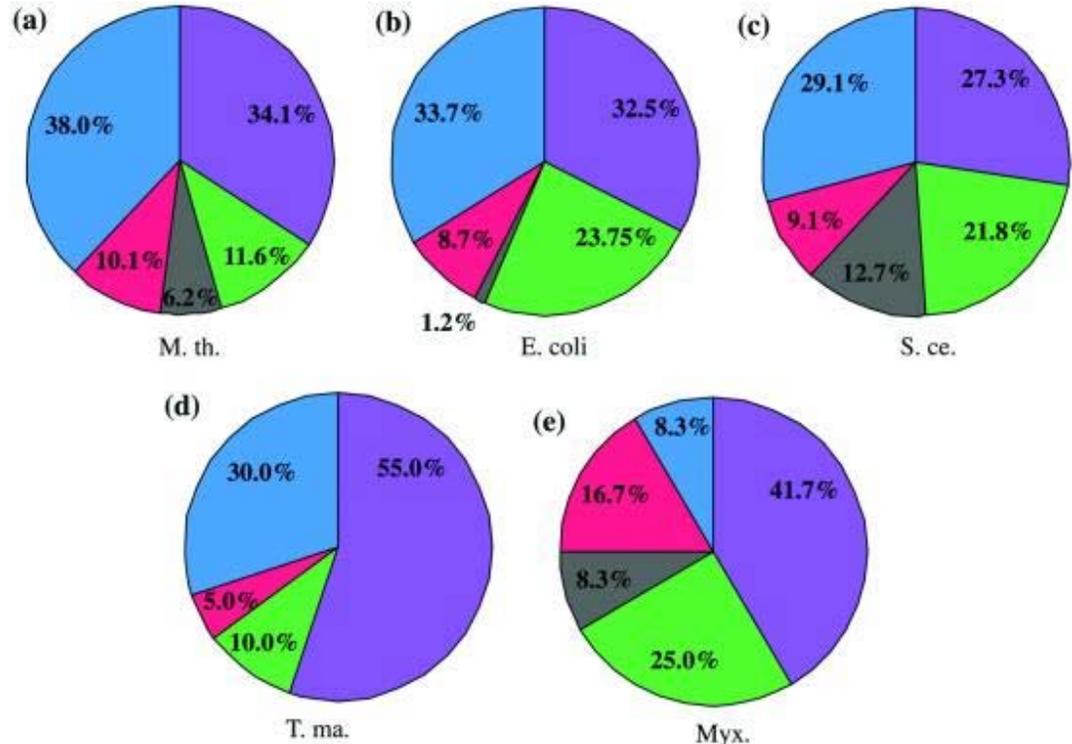
Dome RMN

Estructuras de proteínas de:
bacterias, plantas y mamíferos
Análisis Funcionales con proteínas diana

Ontario Center for Structural Proteomics



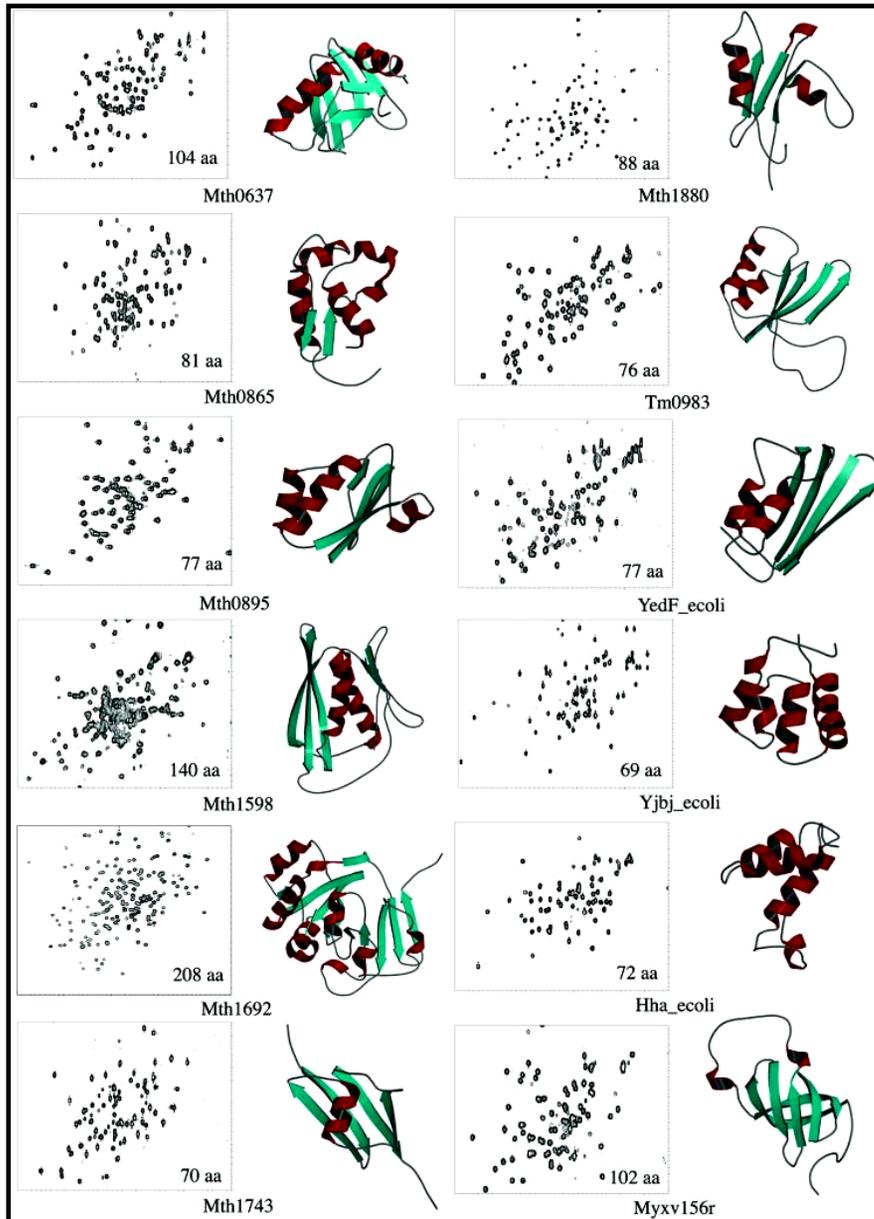
513 ORFs expresados
y purificados
Proteínas clonadas;
Expresadas; Solubles



Calificación proteínas solubles HSQC:
Azul (buena); Prometedora (rojo);
Prácticamente Desplegada (gris);
Morado (pobre); pérdida (verde)

M. thermoautotrophicum (M. Th.); *S. Cerevisiae* (S. Ce.); *T. Maritima* (T. Ma.)
Myxoma virus (Myx)

Ontario Center for Structural Proteomics



Biología Estructural a escala
Genómica con el objetivo
de deducir:

Función \longleftrightarrow Estructura

Ejemplo de 12 estructuras
resueltas mediante RMN
dentro de proyectos de
Proteómica Estructural
por Ontario Center for
Structural Proteomics
(69 a 208) aa

Características Estructurales de 10 dianas de Proteómica Estructural

Proteína	Anotación	Tipo Plegamiento	Homólogos Estructurales	Posible Función
Mth0637	CHP	β -sandwich ortogonal 2-hélices	Factor iniciación traslación(2IF1)	Desconocida
Mth0865	CHP	Haz de hélices con horquilla- β	Bsobi Endonucleasa restricción(1DC1)	Enlace ATP
Mth0895	CHP	Tioredoxina	Tioredoxina(1THX)	Redox
Mth1598	CHP	Sandwich α/β	Proteína 33 shock-calor(1I7F)	Enlace ARN
Mth1692	CHP	α/β girado hoja- β abierta	yrdC_ecoli(1HRU)	Enlace ARN
Mth1743	CHP	Ubiquitina	Ubiquitina(1UBI)	Conjugación C-terminal
Mth1880	CHP	$\alpha/\beta/\alpha$	Ninguna	Proteína Ca^{+2} dependiente
TM983	CHP	Sandwich 2 capas α/β	Factor iniciación traslación(1TIG)	Enlace ARN
YedF_ecoli	CHP	Sandwich 2 capas α/β	yhnp_ecoli(1DCJ)	Enlace ARN
Myxv156r	Resistencia Interferón	barril β	Fragmento PNPasa (1SRO)	Enlace ARN/proteína

CHP: Proteína hipotéticamente conservada

Yee et al., PNAS (2002)

Ontario Center for Structural Proteomics

Instalaciones y Equipamiento Genómica/Proteómica Universitat de Valencia

SCSIE (Servicio Central Soporte a la Investigación Experimental)

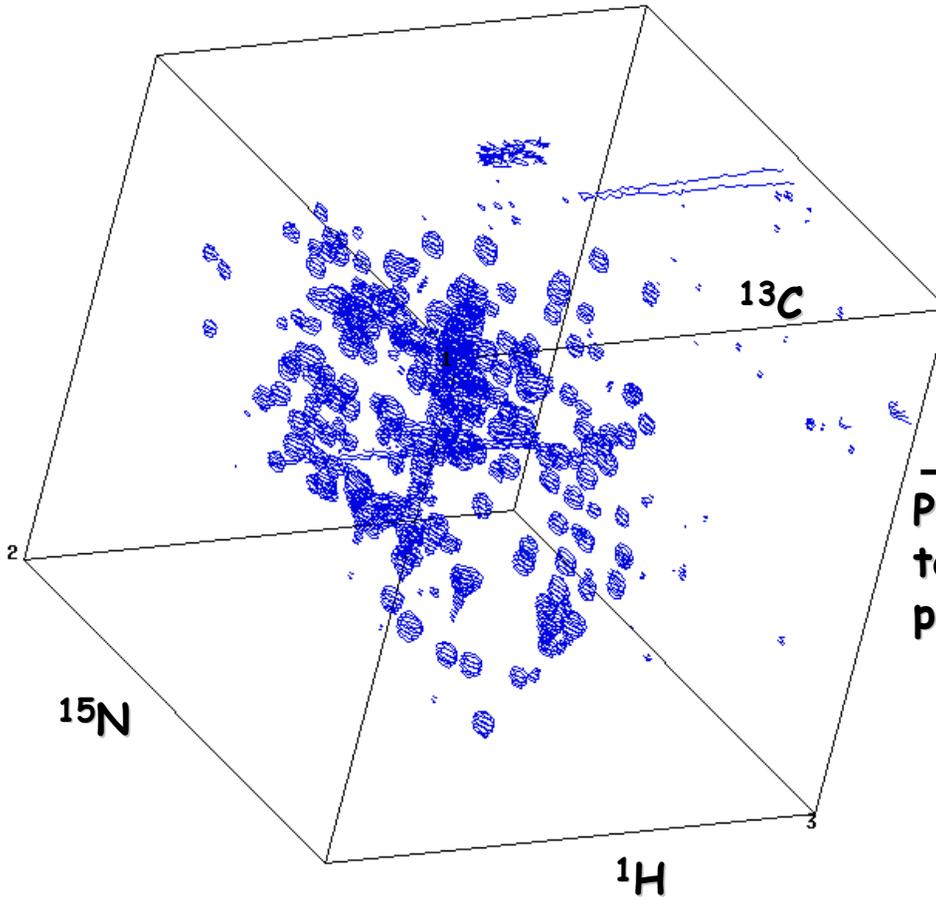
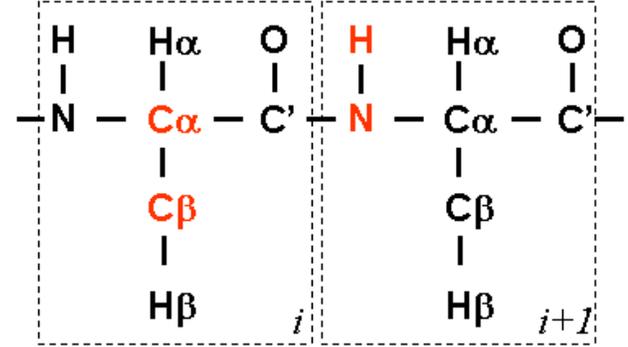
- Sección Secuenciación de ADN
- Sección Chips de ADN
- Sección Espectrometría Masas (Proteómica)*
- Sección Rayos-X
- Sección Bioinformática*
- Sección RMN (Centro de RMN Altas Prestaciones ?)

Requerimientos RMN en Genómica Estructural (determinación acelerada de estructuras 3D)

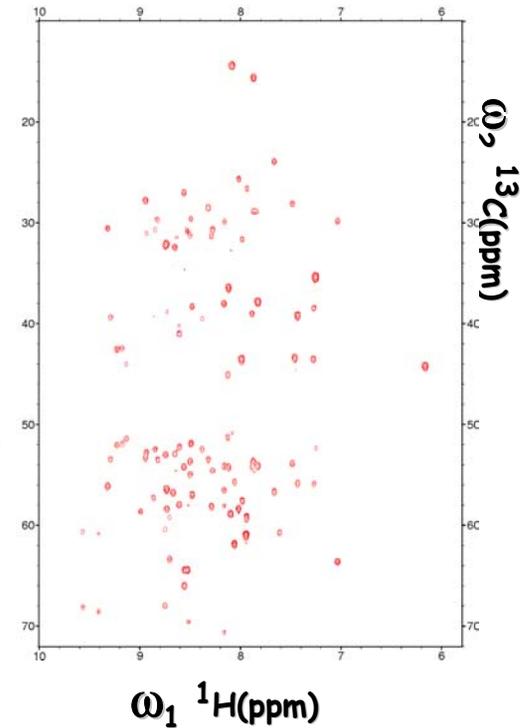
- **Expresión eficiente** para marcaje doble-triple (15N, 13C y 2D)
- **Solubilidad**: 0,5-1,0 mM (300-500 μ l)
(criosonda: 0,3-0,5 mM)
- **Estabilidad**: 1 semana en disolución
- **Alto campo magnético**: > 500 MHz
- **Automatización**:
 - identificación señales
 - asignación secuencial específica
 - cálculo estructura 3D

GENÓMICA ESTRUCTURAL *Thermoplasma acidophilum* (TA)

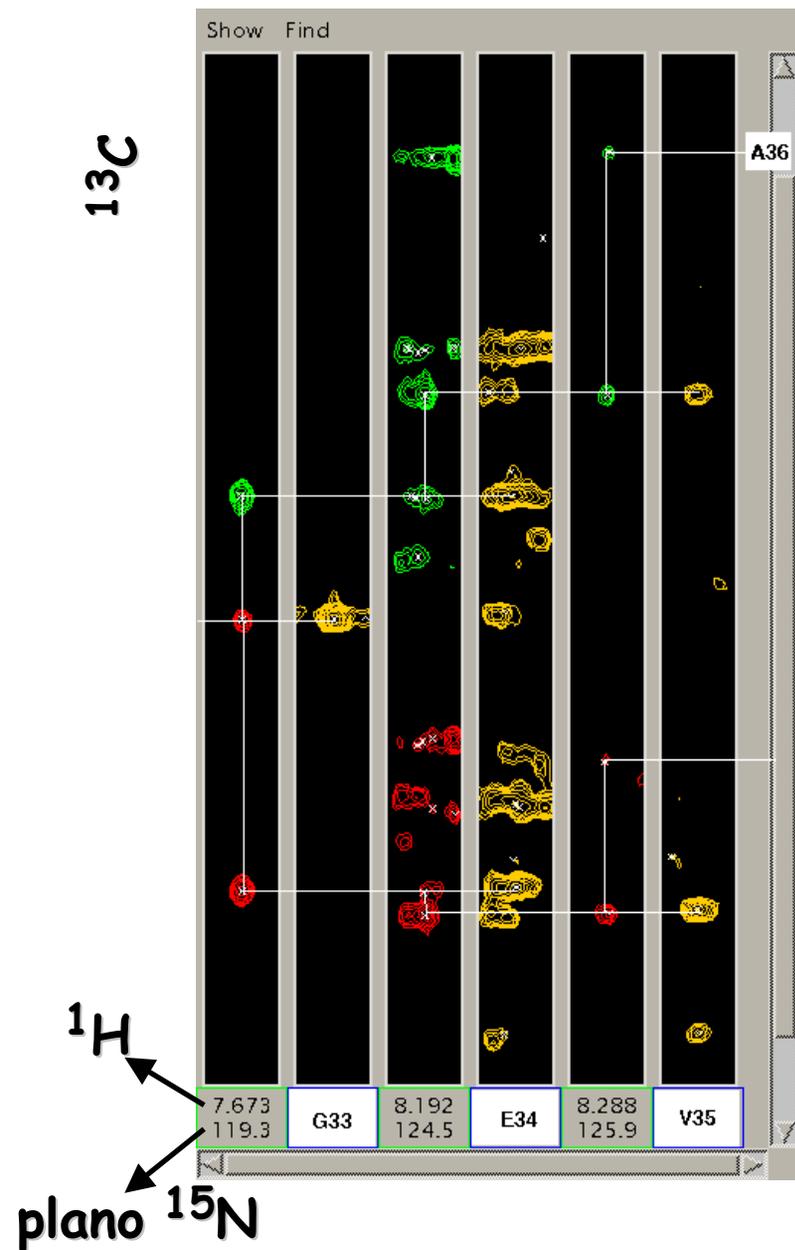
3D CBCA(CO)NH
TA0938 (120 aa)
15N/13C 1mM



Proyección
total
plano ^1H - ^{13}C



GENÓMICA ESTRUCTURAL *Thermoplasma acidophilum* (TA)



Ejemplo asignación secuencial mediante "strips" TA1414

Combinación de 2 espectros 3D multidimensionales (^1H , ^{13}C , ^{15}N)

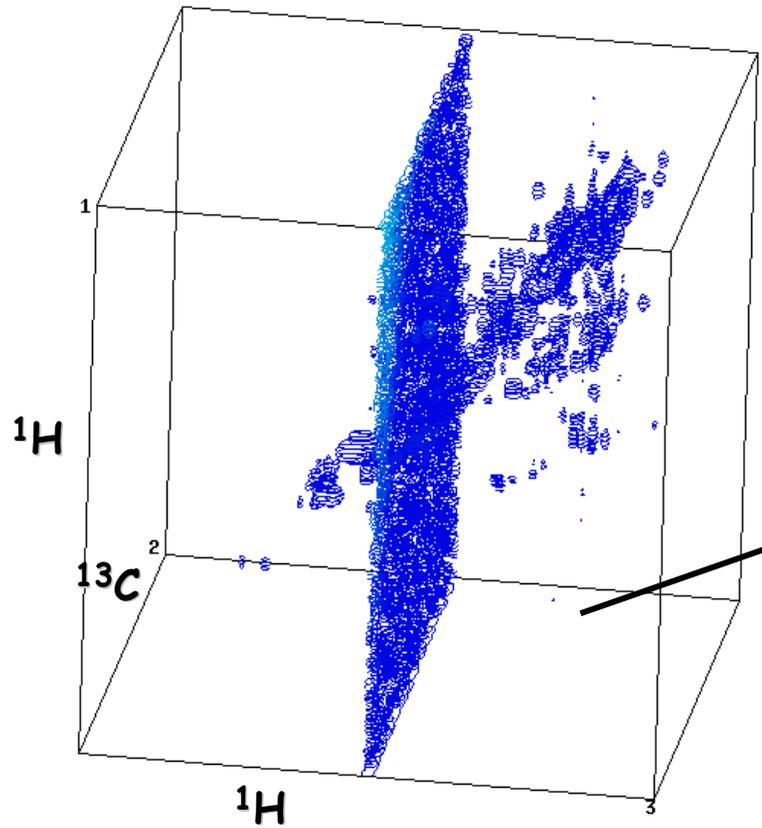
Amarillo: CBCA(CO)NH (Inter)

Rojo/Verde:

HNCACB(Intra+Inter)

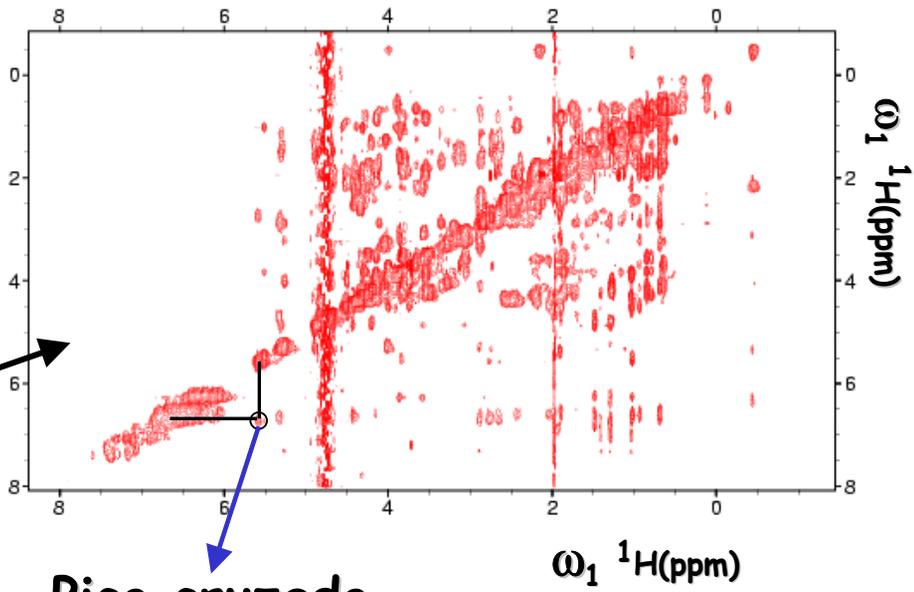
GENÓMICA ESTRUCTURAL *Thermoplasma acidophilum* (TA)

Distancias < 5Å mediante
3D C13-NOESY y N15-NOESY



3D C13-NOESY

Proyección 1H-1H NOESY
editado en 13C no NH

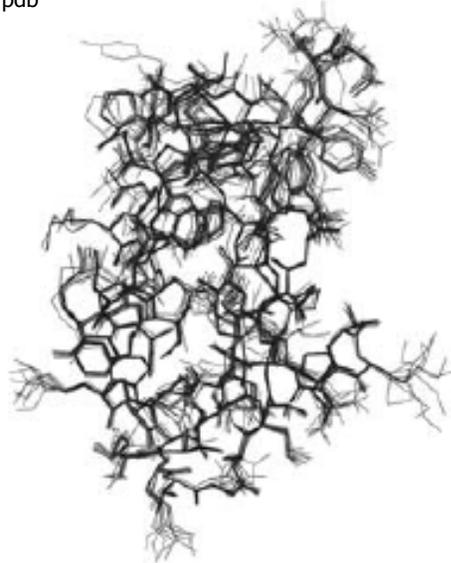
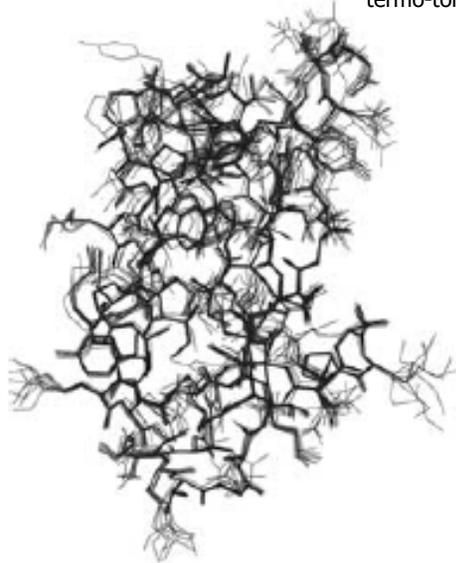


Pico cruzado
Entre 2 1H ≤ 5 Å

GENÓMICA ESTRUCTURAL *Thermoplasma acidophilum* (TA)

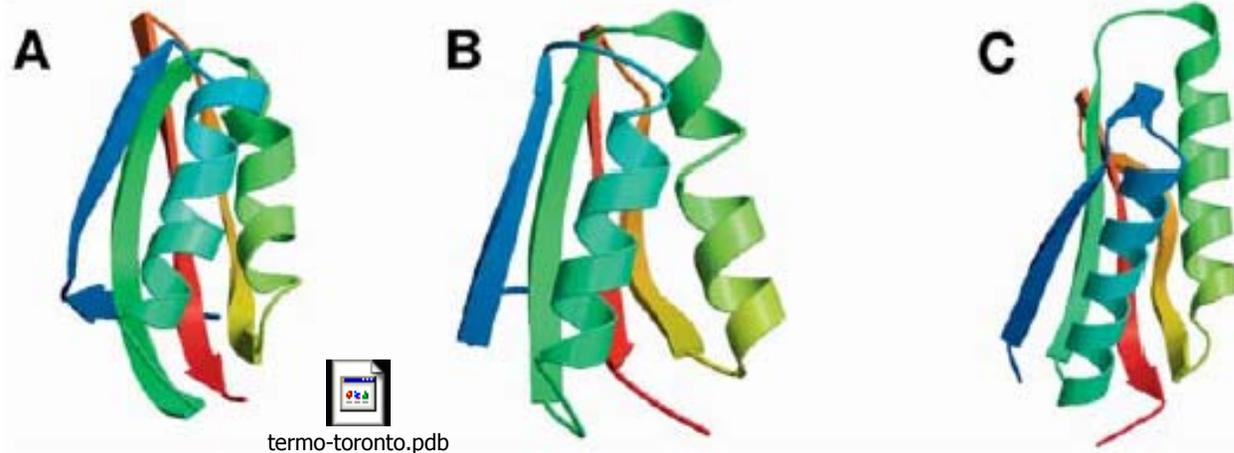


thermo-toronto.pdb



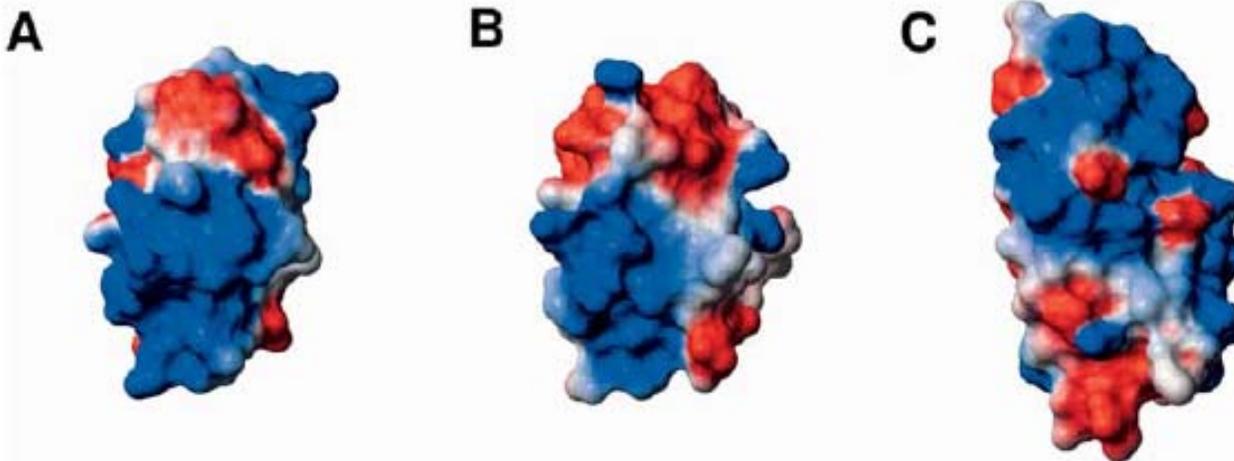
Superposición 10
estructuras de mínima
Energía TA1414
Vista estereoscópica
Estructura compacta
tipo sandwich de
dos capas $\alpha\beta$ con
plegamiento $\beta\alpha\beta\alpha\beta$

GENÓMICA ESTRUCTURAL *Thermoplasma acidophilum* (TA)



TA1414 vs. YhhP
23% secuencial
RMSD C α 2,5 Å

Búsqueda 3D DALI
(DALI Z-score 3,5)
segmento C-terminal
factor iniciación
traslación IF3 del
B. Stearothermophilus
9% secuencial
RMSD C α 3,5 Å



A TA1414
(1PAV)

B YhhP *E. Coli*
1DCJ

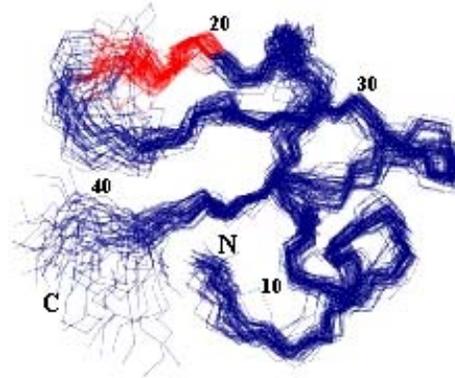
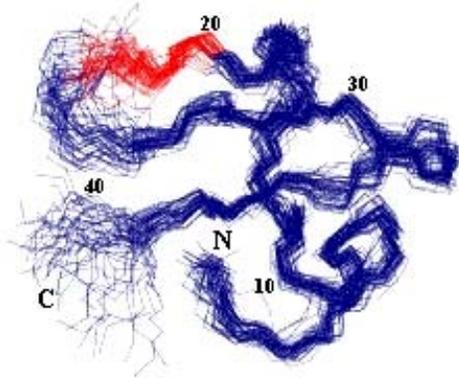
C IF3 1TIG
B. stearothermophilus

D. Monleón et al.

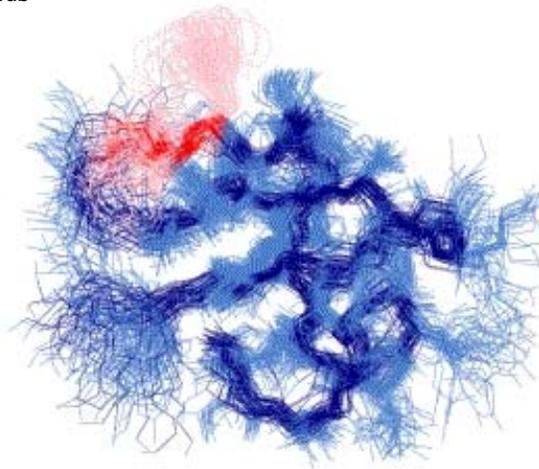
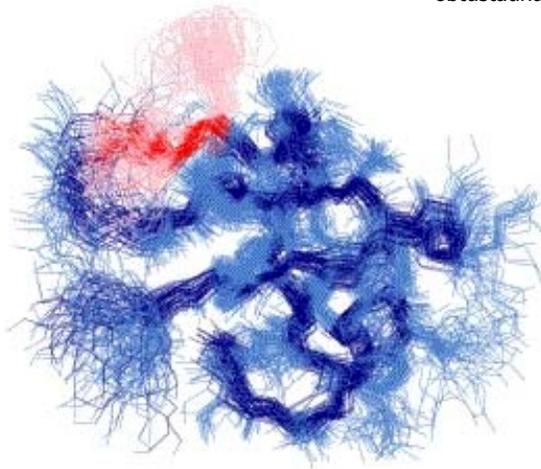
J. Biomolecular NMR (2003)

Colaboración Ontario Center for Structural Proteomics

ESTRUCTURA Y DINÁMICA VENENOS SERPIENTE

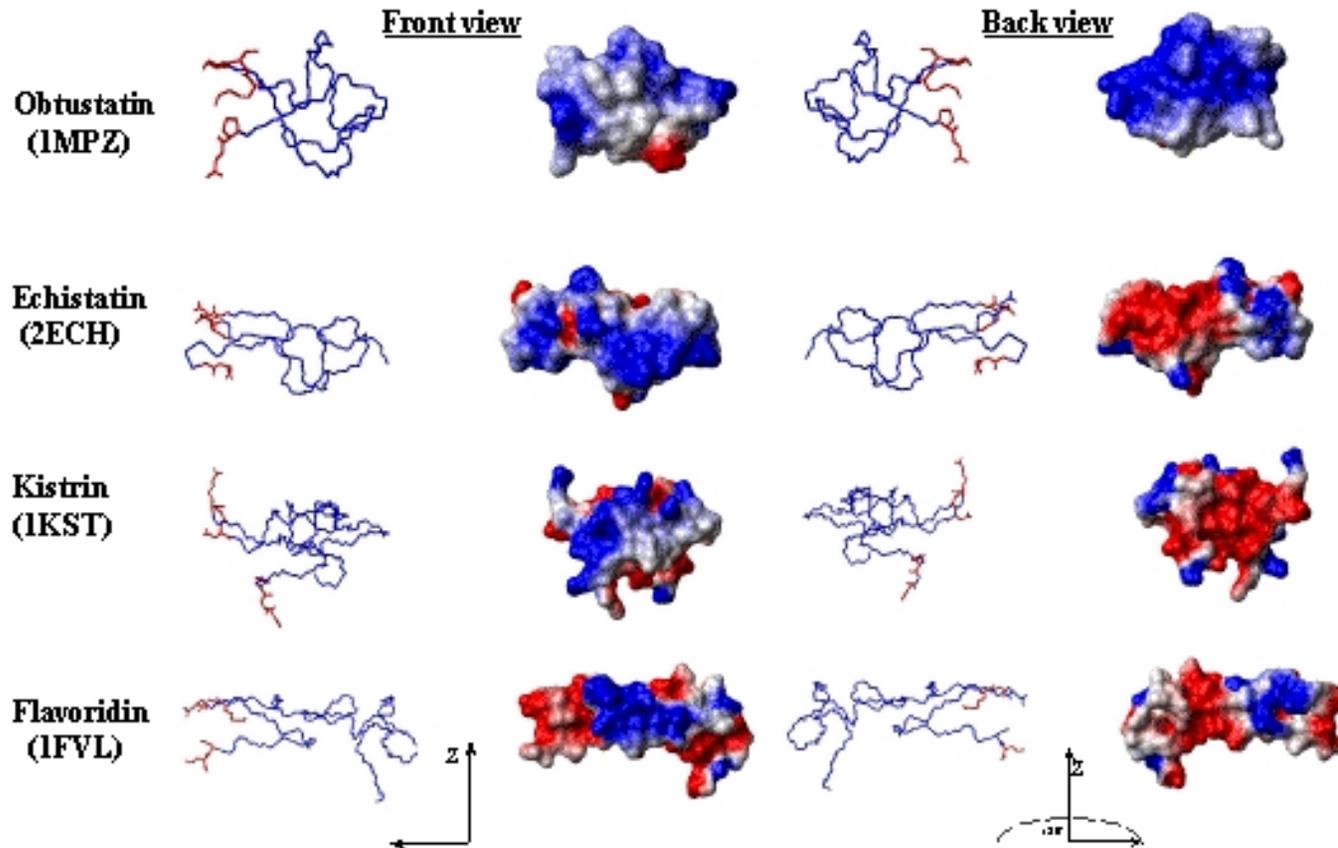


obtustatina.pdb



Superposición 50
estructuras de mínima
energía Obtustatina
Vista estereoscópica
41 aa (1MPZ)
Ausencia e. secundaria
KTS lateral
↑ Inhibición selectiva
 $\alpha 1\beta 1$

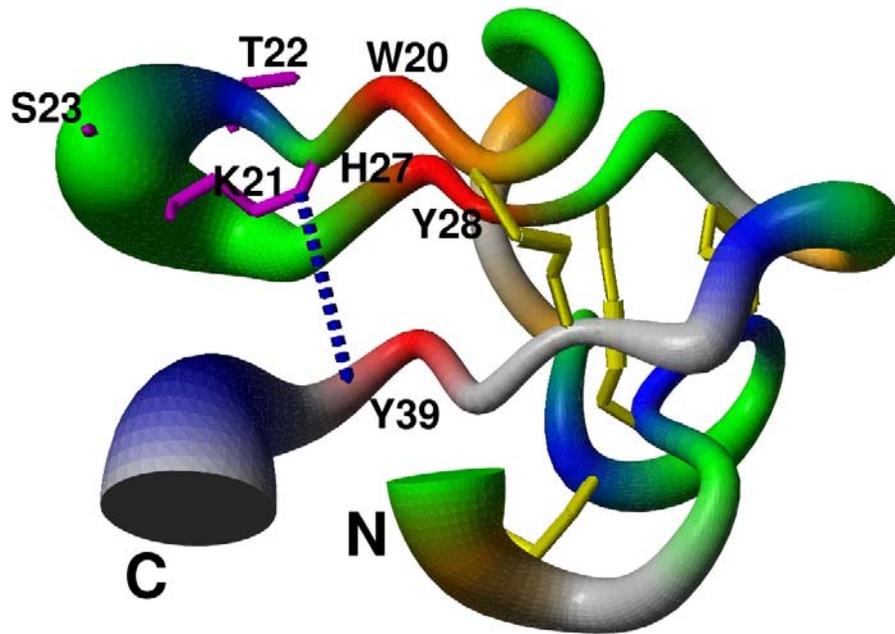
ESTRUCTURA Y DINÁMICA VENENOS SERPIENTE



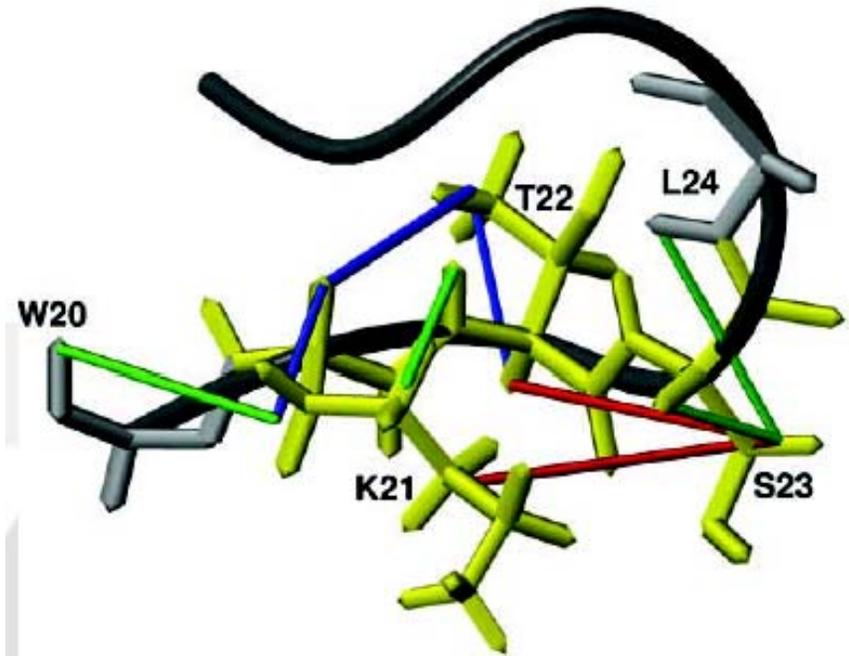
Distribución de la Superficie de Potencial Electroestático

Azul: carga positiva; **Rojo:** carga negativa; **Gris:** carga neutra

ESTRUCTURA Y DINÁMICA VENENOS SERPIENTE



Representación "salchicha" en función Flexibilidad: RMN homonuclear ^1H
 $\theta^\circ < 0,8$ (rojo); $0,8 < \theta^\circ < 0,9$ (naranja);
 $0,9 < \theta^\circ < 1,0$ (verde); $\theta^\circ > 1,0$ (azul);
no datos (gris)



Esquema de la estructura promedio de RMN del pliegue de enlace a Integrina de Obtustatina. Incluye red de NOEs implicando cadenas laterales de los residuos del sitio activo K21, T22 y S23 y adyacentes W20 y L24. Movilidad: rojo grande; verde media; azul baja

D. Monleón et al.

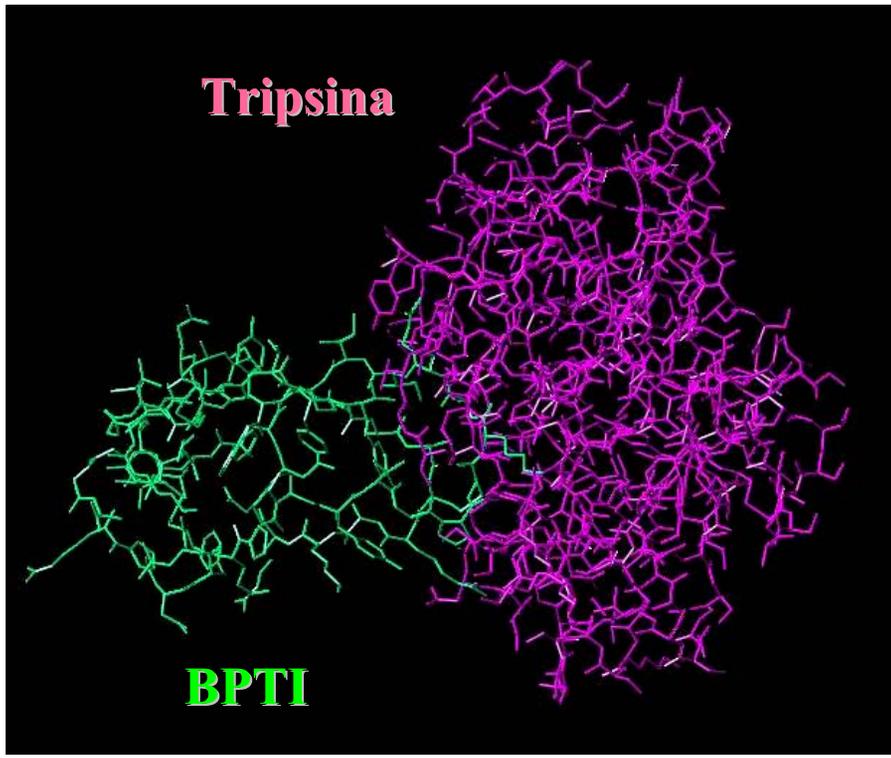
J. Biological Chemistry (2003)

Colaboración IBV, Lab. Dr. J. Calvete

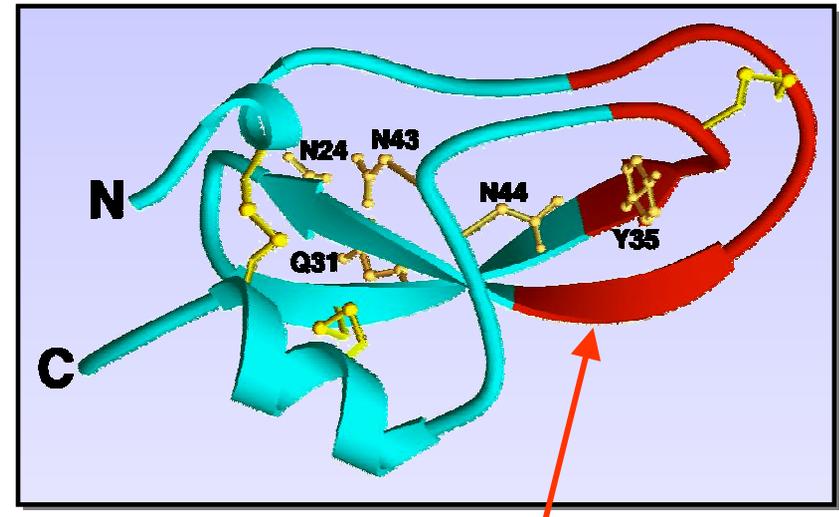
Reconocimiento Molecular: Interacciones Proteína-Proteína

Complejo BPTI/Tripsina

Cristalografía Rayos-X



Estructura Secundaria BPTI



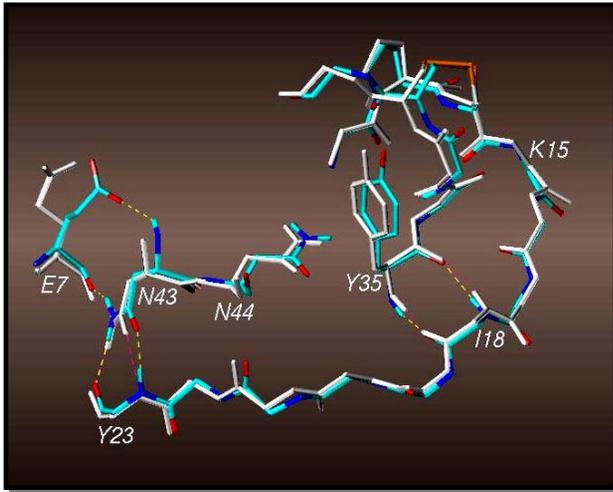
Rojo: Superficie Contacto



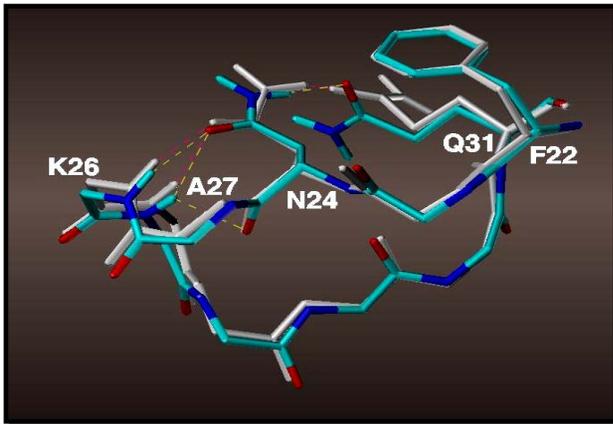
bpti-tryp.pdb

Reconocimiento Molecular: Interacciones Proteína-Proteína

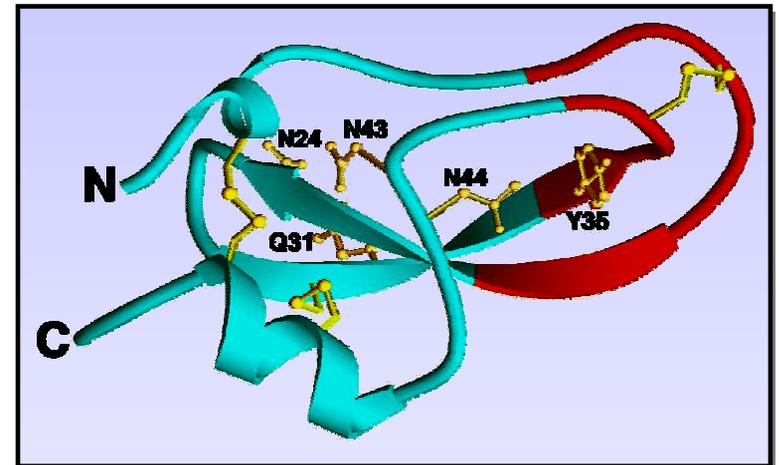
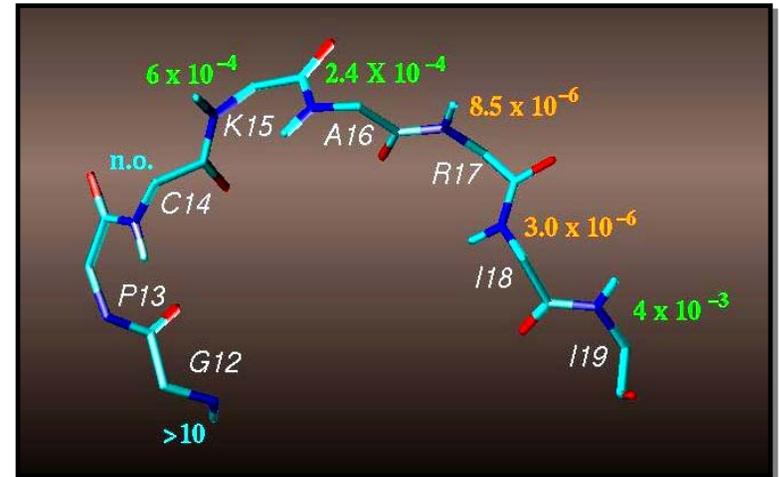
Complejo BPTI/Tripsina



Modificación Estructural



Dinámica Interfase



Colaboraciones

Genómica Estructural
Thermoplasma acidophilum

Dra. Cheryl Arrowsmith

Dra. Adelinda Yee

*Ontario Center for
Structural Genomics
(Toronto, Canadá)*

Venenos Serpiente
Estructura, Dinámica

Dr. Juan J. Calvete
IBV-CSIC (Valencia)

Interacciones Proteína-Proteína

Dr. Gaetano Montelione
CABM (Rutgers U. USA)

