

Reporte de Resultados
Febrero de 2016-Enero 2017

Dr. León David Islas Suárez
Proyecto:
Investigador Titular A, TC.
Facultad de Medicina
UNAM.

Recursos obtenidos:

300000 horas.

Resumen

En este proyecto se planteó el diseño *in silico* de mutantes de la proteína Tyr-RNAsil transferasa para lograr su unión a aminoácidos no canónicos. También se realizó un estudio de dinámica molecular y “docking” para entender las interacciones del canal iónico TRPV1 con inhibidores y finalmente se inició el estudio de las interacciones entre las proteínas solubles GPN1 y 3. La principal herramienta utilizada en estos proyectos fueron cálculos de dinámica molecular.

Objetivos académicos planteados:

1. Minimización de la energía de estructuras activas e inactivas del canal iónico TRPV1 mediante dinámica molecular y simulación de “docking” molecular de sustancias inhibitorias en dichas estructuras.
2. Simular mediante dinámica molecular la interacción de tRNA sintetasa y aminoácidos no naturales, con el fin de “madurar” *in-silico* la interacción de las proteínas para mejorar su eficiencia.
3. Simular la interacción del dímero de interés médico GPN1-GPN3 que es esencial para la transcripción de RNA, su interacción es de reciente descubrimiento.
4. Optimizar la superficie de la proteína fluorescente verde de Amphioxus, esta proteína de reciente descubrimiento es un dímero en la naturaleza, pero es necesario optimizar su superficie que la proteína se exprese como un monomero.

Los objetivos planteados están en desarrollo, hasta el punto que dos manuscritos de las simulaciones realizadas en 2016 están en preparación, estos son los correspondientes a los objetivos 2 y 3 planteados en la pasada convocatoria, el objetivo 2 ha sido completado en su parte computacional y el objetivo 1 ha sido completado en su totalidad.

Maduración *in-silico* de la proteína tirosil tRNA sintetasa de E. coli para incorporar aminoácidos no naturales

La parte computacional del objetivo de estudiar la tRNA sintetasa de tirosina (tyrRS) de E. coli ha sido completado, de esta línea emanó el diseño *in-silico* de tres secuencias de proteínas. Los diseños ya han pasado a la parte experimental donde se realizó la síntesis de DNA que codifique para las proteínas para después se harán ensayos de función. Los resultados esperados de este trabajo deben permitir que las proteínas diseñadas *in-silico* funcionen al igual que proteínas endógenas de E. coli, con la variante de que las proteínas de E. coli restauran la función al insertar el aminoácido natural tirosina dentro del codón correspondiente, pero nuestro sistema cambio el sitio de interacción específico para tirosina y fue adaptado para el aminoácido no natural L-Coumarina, el cual contiene la parte fundamental de todos los aminoácidos, el amino y carboxilo unidos a través del carbono alfa pero tiene como diferencia que su cadena lateral incluye Coumarina que es un compuesto orgánico fluorescente. En la figura 1 se muestra los datos de dos ligantes en la proteína original tyrRS, la técnica utilizada MM-PBSA (Molecular Mechanics Poisson-Boltzmann Surface Area,) es una técnica para obtener la energía libre de interacción de complejos a través de descomponer cada una de sus partes y calcularlas mediante PB, la suma de las energías es distinta de cero y equivale a la energía del sistema. En la figura 2 se observa el cálculo de las energías para una proteína modelada, las energías cambiaron favoreciendo la unión de L-Coumarina y perdiendo afinidad por su ligando original Tirosina.

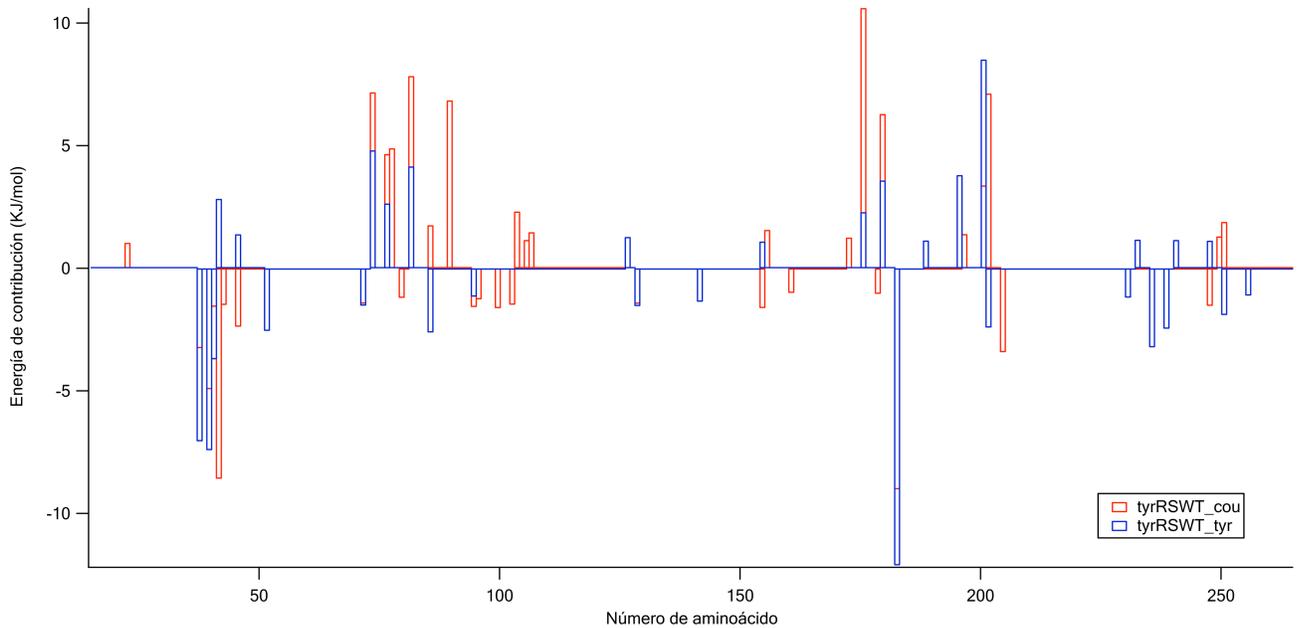


Figura 1. Interacción de Tirosina (Tyr) y L-Coumarina (Cou) con la proteína nativa TyrRS de *E. coli*, las diferencias fueron calculadas para cada aminoácido con las técnicas de perturbación de MM-PBSA.

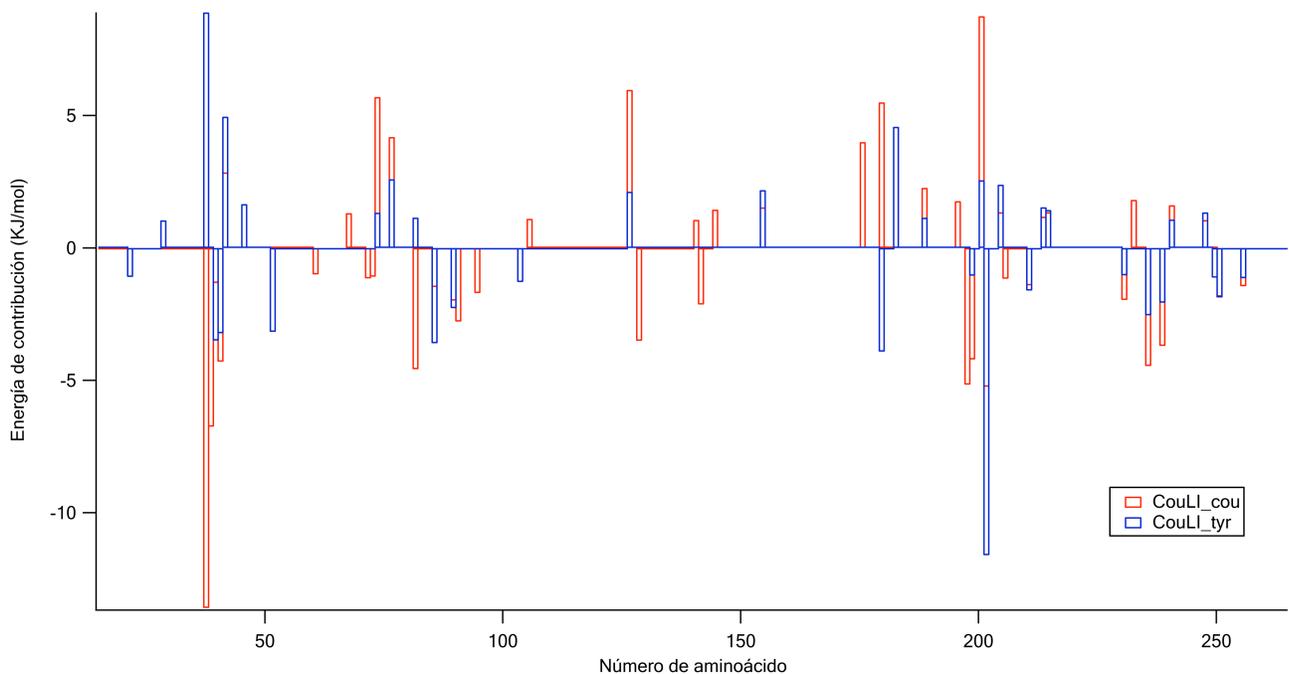


Figura 2 Interacción de Tirosina (Tyr) y L-Coumarina (Cou) con la proteína rediseñada CouLI de *E. coli*, las diferencias fueron calculadas para cada aminoácido con las técnicas de perturbación de MM-PBSA. La región del aminoácido 38 al 45 se ve mucho más favorecida ahora, lo que favorece la especificidad hacia el aminoácido no natural.

El gen correspondiente a la proteína CouLI fue sintetizado y está siendo probado en una fase experimental, este resultado cerraría un ciclo entre la parte experimental y computacional, que nos podría decir que la maduración in-silico de proteínas para modificar la especificidad por sustratos es viable.

Estudio de la interacción entre las GTPasas Gpn1 y Gpn3.

Las GTPasas GPN loop son proteínas esenciales que se encuentran en organismos eucariontes y arqueas. Gpn1, 2 y 3 son los miembros de esta familia y su nombre se deriva de la conservación de un motivo de 3 residuos de Glicina (G), Prolina (P) y Asparagina (N). La estructura cristalográfica del ortólogo de Gpn1 en *P. abbisy* (PAB0955) muestra una estructura homodimérica. Alonso y colaboradores demostraron mediante ensayos de doble híbrido en *S. cerevisiae* que pueden formarse heterodímeros entre Gpn1 y Gpn3. En este ensayo ellos demostraron que la interacción entre Gpn1 y Gpn3 está regulada por la formación de puentes de hidrógeno entre dos residuos de ácido glutámico que se encuentran conservados en ambas proteínas. En células de mamífero también se ha estudiado la interacción entre estas dos proteínas mediante ensayos de colocalización y co-inmunoprecipitación. En este proyecto nosotros encontramos que existe una interacción directa entre las GTPasas Gpn1 y Gpn3 de humano mediante mediciones de FRET. También logramos re-construir el heterodímero mediante el uso de modelado por homología, en el cual se tomó como molde la estructura cristalográfica de Gpn de *P. abbisy* para modelar por separado a Gpn1 y Gpn3, posteriormente se realizó un alineamiento de estructura de los modelos de Gpn1 y Gpn3 con el homodímero de *P. abbisy*. El heterodímero Gpn1-Gpn3 mostró un área de interacción que involucra los siguientes residuos para Gpn3 (A42, V60, E66, P73, N74, L77, Q110, E112, T115, L159, L220, T163 y Y225) y para Gpn1 (K77, P87, Q126, E128, W132, Y172, M227). Algunos de estos residuos se mutaron *in silico* para evaluar su importancia en la interacción entre Gpn1 y Gpn3. Se corrieron dinámicas de 50 ns en Gromacs para las siguientes versiones del heterodímero: Gpn1WT-Gpn3WT, Gpn1E128A-Gpn3WT, Gpn1D122A-Gpn3WT, Gpn1W132D-Gpn3WT, Gpn1Y172D-gpn3WT, Gpn1M227D-Gpn3, Gpn1Q126-Gpn3, Gpn1WT-Gpn3D106, Gpn1WT-Gpn3E112A, Gpn1WT-Q110Gpn3. Se calculó el RMSD, el área interacción (SASA), el radio de giro y la distancia para las diferentes versiones del heterodímero. El RMSD se mantuvo estable para todas las versiones. El radio de giro mostró un comportamiento diferente entre las WT y las mutantes, sin embargo las diferencias fueron menores a .4 nm. El área de interacción disminuyó 10 nm en la versión Gpn1Y172D-gpn3WT y la distancia entre los residuos de la interface aumento .3 nm en esta misma versión del heterodímero. Estos datos serán validados con la repetición de las dinámicas.

Descripción de los métodos utilizados en Miztli

1. Dinámicas moleculares de proteínas en agua con iones. Simuladas con la suite GROMACS, en 64, 128 o 256 procesadores. Se utilizaron cerca de 200 mil horas/CPU. La estrategia utilizada por nuestro grupo va en concordancia con lo que se aplica en varios grupos de trabajo que realizan dinámicas moleculares y consiste en separar una trayectoria larga en varias trayectorias pequeñas, con lo que el uso de la supercomputadora se realiza en pasos de 48 en 48 horas.
2. Simulación de Docking para la obtención de las mejores interacciones de aminoácidos no naturales con su receptor tRNA Sintetasa. Los dockings son procesos sencillos, pero a través de scripts programados por el grupo hicimos una rutina de "High Throughtput" para generar millones de datos que nos permiten realizar estadística de mejor calidad.
3. Las proteínas GPN1 y GPN3 estan siendo estudiadas en colaboracion con el grupo de investigación del doctor Roberto Sánchez en la Facultad de Física, de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Nuestra colaboración abarca el estudio de mutaciones in-silico de la interfaz GPN1-GPN3 que, aunque ha sido investigada por varios grupos, su estructura es de reciente descubrimiento. Lo cual nos da un modelo de calidad para determinar los componentes principales de la interacción.

Recursos utilizados

Nuestros cálculos no son dependientes de gran cantidad de RAM ni tampoco de un BATCH de gran tamaño (archivos almacenados durante el cálculo). Nuestro proyecto hace uso de 20 TB de almacenamiento y que después de ser filtrados y comprimidos los datos, se reducen a un tercio de su tamaño aproximadamente.

Colaboradores

M. en C. Ernesto Ladrón de Guevara Rosas, Facultad de Medicina, UNAM

M. en C. Gema Cristobal, Instituto de Física, UASLP

Dr. Tamara Rosenbaum , Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Productos obtenidos y por obtener:

1. **Se publicó el artículo:** "Inhibition of TRPV1 channels by a naturally occurring omega-9 fatty acid reduces pain and itch" Morales-Lázaro SL, Llorente I, Sierra-Ramírez F, López-Romero AE, Ortíz-Rentería M, Serrano-Flores B, Simon SA, **Islas LD**, Rosenbaum T. Nat Commun. 2016 Oct 10;7:13092. doi: 10.1038/ncomms13092.
2. Se presentó el trabajo "**Estudio de la interacción entre las GTPasas Gpn1 y Gpn3 mediante FRET**" en el XXXI Congreso Nacional de Bioquímica.
3. Se presento el trabajo: Inhibition of TRPV1 by an Unsaturated Fatty Acid en el congreso internacional de la Biophysical Society en Febrero de 2016.
4. Trabajo en revision: "A Rationally Designed Aminoacyl-tRNA Synthetase for Genetically Encoded Fluorescent Amino Acids" by Ximena Steinberg, Jason Galpin, Gibran Nasir, Jose Sepulveda-Ugarte, Romina Sepulveda, Fernando Gonzalez-Nilo, Leon Islas, Christopher Ahern, and Sebastian Brauchi

Lugar y Fecha: Ciudad Universitaria, México DF. A 31 de enero del 2017.