

CAPÍTULO 6. RESULTADOS

6.1 Modelamiento por homología

6.1.1 Búsqueda del patrón

En SWISSPROT (Boeckmann *et al* 2003) se obtuvo la secuencia de amino ácidos para la proteína KatG de *M.tuberculosis* cepa H37Rv, bajo el nombre CATA_MYCTU y número de acceso Q08129. La secuencia se muestra en la figura 5.

```
>sp|Q08129|CATA_MYCTU Peroxidase/catalase T (EC 1.11.1.6)
(Catalase-peroxidase T) - Mycobacterium tuberculosis.
MPEQHPPI TETTTTGAASNGCPVVGHMKY PVEGGGNQDWPNRLNLKVLHQ NPAVADPMGA
AFDYAAEVATIDVDALTRDIEEVMTTSQPWWPADYGHYGPLFIRMAWHAAGTYRIHDGRG
GAGGGMQRFAPLNSWPDNASL DKARLLWPKKYGKKLSWADLIVFAGNCALES MGFKT
FGFGFGRVDQWEPDEVYWGKEATWLGDERYS GKRDLENPLAAVQMGLIYVNPEGPNGNPD
PMAAAVDIRETFRRMAMNDVETAALIVGGHTFGKTHGAGPADLVGPEPEAAPLEQMGLGW
KSSYGTGTGKDAITSGIEVVWNTPTKWDNSFLEIILYGYEWELTKSPAGAWQYTAKDGAG
AGTIPDPFGGPGRSPTMLATDLSLRVDPIYERITRRWLEHPEELADEFAKAWYKLIHRDM
GPVARYLGPLVPKQTLWQDPVPAVSHDLVGEAEIASLKSQIRASGLTVS QLVSTAWAAA
SSFRRGSDKRGANGGRIRLQPQVGWEVNDPDGDLR KVVIRTLEEIQESFN SAAPGNIKVSF
ADLVVLGGCAAIEKAAKAAGHNITVPFPTPGRTDASQEQT DVESFAVLEPKADGFRNYL GK
GNPLPAEYMLLDKANLLTLSAPEMTVLVGGRLRVLGANYKRLPLGVFTEASESLTNDFFVN
LLDMGITWEPSPADDGTYQKDGSGKVKWTGSRVDLVFGSNSELRALVEVYGADDAQPKF
VQDFVAAWDKVMNLD RFDVR
```

Figura 5. Secuencia de amino ácidos (código de una letra) de MtKatG (Q08129 de SwissProt)

Se realizó una búsqueda directa del patrón mediante el programa BLAST (Altschul *et al* 1990). Se identificaron únicamente segmentos de entre trescientos y cuatrocientos amino ácidos, siendo la proteína KatG de 740. Paralelamente se ejecutó la búsqueda “Q08129” en SWISS-MODEL (Guex y Peitsch 1997) para producir un modelo automático, usándose como patrones las proteínas con los siguientes ID en PDB (y % de identidad): 1JCI (34.9%), 1JDR(34.9%), 1KRJ (34.9%), 1EBE (35.7%) y 2CYP (35.7%) (ver descripción en el Apéndice 10.3). Estos produjeron un fragmento de 106 amino ácidos, correspondientes a P89-D194, cuya topología corresponde al fragmento D33-T138 de 1JCI.

Puesto que los patrones encontrados tuvieron un porcentaje de homología bajo (debe ser mayor del 40%), se realizó una búsqueda directa en el Brookhaven Protein Data Bank (Berman *et al* 2000) con los criterios: catalasa, peroxidasa, oxidoreductasa. Se obtuvieron los siguientes resultados: 1CCP, 1ITK, 1GGE, 1A4E, 1JDR.

6.1.2 Selección del patrón

Tras realizar los correspondientes alineamientos se obtuvieron los porcentajes de identidad con MtKatG mostrados en la tabla 2, seleccionándose como patrón a la proteína 1ITK por su alta homología.

Tabla 2. Porcentajes de identidad según alineamiento con CLUSTAL W

<i>Proteína</i>	<i>% de identidad</i>	<i>Microorganismo</i>
1CCP	28	<i>S.cerevisiae</i>
1 ^a 4E	4	<i>S.cerevisiae</i>
1GGE	6	<i>E.coli</i>
1ITK	56	<i>Haloarcula marismortui</i>
1JDR	30	<i>S.cerevisiae</i>

1ITK es el ID en PDB para la catalasa-peroxidasa de *Haloarcula marismortui* (HmCP), reportada por Yamada y cols, quienes determinaron su estructura mediante cristalografía a una resolución de 2.0 Å. Es una enzima homodimérica, donde cada subunidad une un grupo hemo *b* y se divide en dos dominios: el N-terminal que abarca de los amino ácidos 18-430, y el C-terminal, que comprende los residuos 431-731. La estructura secundaria corresponde a las de CCP y APX, y consta de 10 α hélices (A-J) en cada dominio.

Adicionalmente en el dominio N-terminal de HmCP se identificaron la inserción corta y las tres inserciones largas discutidas en la página 18, confirmándose su localización en la superficie proteica y su papel en el control del acceso al sitio activo. Se observó la formación de enlaces covalentes entre los residuos Y218-W95 y Y218-M244, mas no pudieron confirmarse experimentalmente. Al ser la primera catalasa-peroxidasa en

conocerse la estructura tridimensional, puede especularse que dichos enlaces covalentes son comunes y tienen un papel catalítico importante (Yamada *et al* 2002).

6.1.3 Alineamiento

A partir del alineamiento con HmCP se pudo observar que faltaban en un inicio correspondencia a 29 amino ácidos. 17 de ellos forman parte de la secuencia de HmCP, mas no pudieron ser detectados experimentalmente por su alta movilidad (Yamada *et al* 2002). Adicionalmente, se observó que HmCP contiene cuatro omisiones (*gaps*) respecto a MtKatG (K183, D269, P360 y R673), mientras que MtKatG tiene un amino ácido más (inserción G512) que HmCP (Figura 6).

MtKatG	MPEQHPPITETTTGAASNGCPVVGHMKYPVEGGGNQDWWPNRLNLKVLHQ	50
1ITK	-----KRPK---SNQDWWPSKLNLEILDQ	21
MtKatG	NPAVADPMGAAFDYAAEVATIDVDALTRDIEEVMTTSQPWWPADYGHYGP	100
1ITK	NARDVGPVEDDFDYAEFQKLDLEAVKSDLEELMTSSQDWWPADYGHYGP	71
MtKatG	LFIRMAWHAAGTYRIHDGRGGAGGGMQRFAPLNSWPDNASLDKARRLLWP	150
1ITK	LFIRMAWHSAGTYRTADGRGGAAGGRQRFAPINSWPDNANLDKARRLLLP	121
MtKat	VKKKYGKKLSWADLIVFAGNCALESMGFKTFGFGFGRVDQWEPD-EVYWG	199
1ITK	IKQKYGQKISWADLMI LAGNVAIESMGFKTFGYAGGREDAFEEDKAVNWG	171
MtKat	KEATWLGDERYSGKRDLENPLAAVQMGLIYVNPEGPNGNPDMAAAVDIR	249
1ITK	PEDEFETQERFDEPGEIQEGLGASVMGLIYVNPEGPDGNPDPEASAKNIR	221
MtKat	ETFRRMAMNDVETAALIVGGHTFGKTHGAG-PADLVGPEPEEAAPLEQMGL	298
1ITK	QTFDRMAMNDKETAALIAGGHTFGKVHGADDPEENLGPEPEAAPIEQQGL	271
MtKat	GWKSSYGTGTGKDAITSGIEVVWNTNPTKWDNSFLEIILYGYEWELTKSPA	348
1ITK	GWQNKNGNSKGGEMITSGIEGPWTQSPTEWDMGYINNLLDYEWEPKGGPG	321
MtKatG	GAWQYTAKDGAGAGTIPDPFG-GPGRSPTMLATDLSLRVDPIYERITRRW	397
1ITK	GAWQWAPKSEELKNSVPDAHDPDEKQTPMMLTTDIALKRDPDYREVMETF	371
MtKatG	LEHPEELADEFAKAWYKLIHRDMGPVARYLGPLVPKQTLWQDPVPAVSH	447
1ITK	QENPMEFGMNFKAAYKLT HRDMGPPERFLGPEVPDEEMIWQDPLPDADY	421
MtKatG	DLVGAEIASLKSQIRASGLTVS SQLVSTAWAAASSFRGSDKRGGANGGRI	497
1ITK	DLIGDEEIAELKEEILDSLSVSQLVKTAWASASTYRSDKRGGANGARL	471
MtKat	RLQPQVGWEVNDPDDLRKVRTLEEIQESFN SAAPGNIKVSFADLVVLG	547
1ITK	RLPEPQKNWEVNEPE-QLETVLGTLENIQTEFNDSRSDGTQVSLADLIVLG	520
MtKat	GCAAIEKAAKAAGHNITVPFTPGRTDASQEQT DVESFAVLEPKADGFRNY	597
1ITK	GNAAVEQAAANAGYDVEIPFEPGRVDAGPEHTDAPSFDALKPKVDGVRNY	570
MtKat	LGKGNPLPAEYMLLDKANLLTSAPEMTVLVGG LRVLGANYKRLPLGVFT	647
1ITK	IQDDITRPAEEVLVDNADLLNLTASELTALIGGMRSIGANYQD TDLGVFT	620
MtKat	EASESLTNDFVNLDMGITWEPSPADDGTYQGKD-GSGKV KWTGSRVDL	696
1ITK	DEPETLTNDFVNLDMGTEWEPAADSEHRYKGLDRDTGEVKWEATRIDL	670
MtKat	VFGSNSELRALVEVYGADDAQPKFVQDFVAAWDKVMNLD RFDVR	740
1ITK	IFGSNDRLRAISEVYGSADA EKKLVDHDFVDTWSKVMKLD RFDLE	714

Figura 6. Alineamiento de MtKatG y HmCP mediante CLUSTAL W. Las omisiones se indican en rojo. La numeración de HmCP no es la absoluta.

Figura 7 (continúa)

JPRED HHHH-----HHHHEEEEEEE-----
 3D-PSSM HHHHLLLLLHHHHHHHHHHHHEELLLLLLLLLLLLLLLLLLHH-HHLLL
 PREDATOR LLLLLLLLLLLEEEEEELLLLLLLLLLEEEELLLLLLLLLLLLLL-LLLLL
 MtKat VKKKYGKLSWADLIVFAGNCALESMSGFKTFGFGFGRVDQWEPD-EVYWG 199
 HmCP IKQKYGQKISWADLMILAGNVAIESMGFKTFGYAGGREDAFEEDKAVNNG 188
 2^aHmCP HHHHHHHHL HHHHHHHHHHHHHLL L E LL LL

D

JPRED -----EE-----HHHH
 3D-PSSM LLLLLLLLLLLLLLHHHLLLLLLLLLLEELLLLLLLLLLLLLLHHHHH
 PREDATOR LLLLLLLLLLLLLLLLLLHHHHHHHHHEEEELLLLLLLLLHHHHHHHHH
 MtKat KEATWLGDERYSGRDLENPLAAVQMGLIYVNPEGPNPNPMAAAVDIR 249
 HmCP PEDEFETQERFDEPGEIQEGLGASVMGLIYVNPEGPDGNPDPEASAKNIR 238
 2^aHmCP L LLLL L LLLL LL L LLLL LLL LLLHHH HHHHHHHHH

E

JPRED HHHHHH---HHHHHEE-----HHHH-
 3D-PSSM LHHHHLLLLHHHHHHHHHLLLEELLLLLLLL-LHHLLLLLLLLLHHHHHHH
 PREDATOR HHHHHHHHHHHHHHHHLLLLLLLLLLLLL-LLLLLLLLLLHHHHHLLL
 MtKat ETFRMAMNDVETAALIVGGHTFGKTHGAG-PADLVGPEPEAAPLEQMGL 298
 HmCP QTFDRMAMNDKETAALIAGGHTFGKVGADDPEENLGPEPEAAPIEQOGL 288
 2^aHmCP HHHLLL HHHHHHHHHHHLL EE ELL HHHHE HHHLLHHHLL

F

F_N'

JPRED -----EEEE-----HHHHHHHH-----
 3D-PSSM HHLLLLLLLLLLLLLLLLLLLLLLLLLLLLLLLLHHHHHHHHHHLLLLLLLLL
 PREDATOR LLLLLLLLLLLEELLLLLLLLLLEEEELLLLLLLLLLLEELLLLLLLLLL
 MtKat GWKSSYGTGTGKDAITSGIEVVTNTPTKWDNSFLEILYGYEWELTKSPA 348
 HmCP GWQNKNGNSKGGEMITSGIEGPWTQSPTEWDMGYINNLLDYEWEPKGGP 338
 2^aHmCP ELLLLLHHH ELLL EELLLLLL LLHHHHHHHLL EEEE LL

G

JPRED -----HHHH-----HHHHHHHH
 3D-PSSM LLLLLLLLLLLLLLLEELLLLLL-LLLLLLLLLLHHHHHHHHLHHHHHHHH
 PREDATOR LLEEEELLLLLLLLLLLEELLLLLL-LLLLLLLLLLHHHHHHHHH
 MtKatG GAWQYTAKDGAGAGTIPDPFG-GPGRSPTMLATDLSLRVDPIYERITRW 397
 HmCP GAWQWAPKSEELKNSVPAHDPEKQTPMMLTTDIALKRDPDYREVMETF 388
 2^aHmCP L EEEEELLLLLL EE LL LL EE E HHHHHHHLLHHHHHHHHH

H

I

JPRED H---HHHHHHHHHHHHHHHHHH-----
 3D-PSSM HLLHHHHHHHHHHHHHHHHHLLLEELLLLLLLLLLHHHHHLLLLLLLLLLLH
 PREDATOR HHLLHHHHHHHHHHHHHHHHHLLLEELLLLLLLLLLEEEELLLLLLLLLL
 MtKatG LEHPEELADEFAKAWYKLIHRDMGPVARYLGPLVPKQTLWQDPVPAVSH 447
 HmCP QENPMEFGMNAKAWYKLIHRDMGPPERFLGPEVPDEEMIWQDPLPDADY 438
 2^aHmCP HLLHHHHHHHHHHHHHHHHHLLHHHHHHHHHLL LL HHH L

J

JPRED ----HHHHHHHHHHHHHHHHHH-----HHHHHHH-----H
 3D-PSSM HLLHHHHHHHHHHHHHHHHHLLHHHHHHHHHHHLLLLLLLLLLLLLLLLL
 PREDATOR LLLLLHHHHHHHHHHHHHHHLLLLHHHHHHHHHHHLLLLLLLLLLLLLLLE
 MtKatG DLVGEAEIASLKSQIRASGLTVSGLVSTAWAAASSFRGSDKRGANGGRI 497
 HmCP DLIGDEEIAELKEEILDSDLSVSQLVKTAWASASTYRSDKRGANGARL 488
 2^aHmCP E HHHHHHHHHHHHHLL HHHHHHHHHHHLL ELLLE LLELHH

A

B

Figura 7 (continúa)

JPRED	HH-----HHHHHHHHHHHHHHHH-----EEEEEEEE-	
3D-PSSM	LLHHHLLLLLLLLLHHHHHHHHHHHHHHHHHHLLLLLLLLLEEEEEEEEEEL	
PREDATOR	EEELLLLLLLLLLLLLLHHHHHHHHHHHHHHHHHHLLLLLLLLLEEEEEEEEEEL	
MtKat	RLQPQVGWEVNDPDGDLRKVIRTLEEIQESFNSAAPGNIKVSFADLVVLG	547
HmCP	RLEPQKNWEVNEPE-QLETVLGTLENIQTEFNDSRSDGTQVSLADLIVLG	537
2 ^a HmCP	HLLLLHHHLHHH <u>HH-HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH</u> L L L E <u>HHHHHHHH</u>	
	C	
JPRED	-HHHHHHHHHH-----EEE-----	
3D-PSSM	LHHHHHHHHHHLLLLLLEELLLLLLLLLLLLLLLLLLLLLLLLLLLLLLLLL	
PREDATOR	LLHHHHHHHHHHLLLLLEELLLLLLLLLLLLLLLLLLLLLLLLLLLLLLLLL	
MtKat	GCAAIEKAAKAAGHNITVPFTRGRDASQEQTDVESFAVLEPKADGFRNY	597
HmCP	GNAAVEQAAANAGYDVEIPFEPGRVDAGPEHTDAPSFDAKPKVDGVRNY	587
2 ^a HmCP	<u>HHHHHHHHHHHLL</u> E <u>HHHLLHHHHHHH</u> <u>LEELLLLE</u>	
	D D_c'	
JPRED	-----HHHHHHH-----EEE-----E-----	
3D-PSSM	LLLLLLLLLHHHHHHHHHHHHLLLLHHHHHHHHHHHHHEEELLLLLLLLLLLLL	
PREDATOR	LLLLLLLLLLEEEELLEEELLLLLLEEEEEEELLEEELLLLLLLLLLLLL	
MtKat	LGKGNPLPAEYMLLDKANLLTSLAPEMTVLVGGRLRVLGANYKRLPLGVFT	647
HmCP	IQDDITRPAEEVLVDNADLLNLTASELTALIGGMRSIGANYQDTDLGVFT	637
2 ^a HmCP	<u>E LL LL</u> <u>HHHHHHHHHHHLL</u> <u>HHHHHHHHHHHHHHH</u> HHHLLL	
	E F	
JPRED	-----EEEE-----	
3D-PSSM	LLLLLLLLLHHHHHHHHHHLLLLLEEEELLLLLLLLLLEELL-LLLLLEELLHHHE	
PREDATOR	LLLLLLLLLHHHHHEEELLEEELLLLLLLLLLLLLL-LLLEEEELLLLLLEE	
MtKat	EASESLTNDFFVNLLDMGITWEPSPADDGTYQGKD-GSGKVKWTGSRVDL	696
HmCP	DEPETLTNDFFVNLLDMGTEWEPADSEHRYKGLDRDTGEVKWEATRIDL	687
2 ^a HmCP	LLLLL <u>LLHHHHHHH</u> <u>LLEEEEEE</u> LL LL <u>EEEEELL</u> <u>E</u> <u>EEE</u> <u>HHHH</u>	
	G H	
JPRED	-----HHHHHHHHHH-----HHHHHHHHHHHHHH-----	
3D-PSSM	EEELHHHHHHHHHHHHHHHHLLLLLHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH	
PREDATOR	EELLLLLHHHHHHHHHHHHHHHHLHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH	
MtKat	VFGSNSELRALVEVYGADDAQPKFVQDFVAAWDKVMNLDLRFDVR	740
HmCP	IFGSNDRRLRAISEVYGSADAEEKLVHDFVDTWSKVMKLDLRFDL	731
2 ^a HmCP	<u>HHHHLHHHHHHHHHHHHHLL</u> <u>HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH</u>	
	I J	

En comparación, los dominios de hoja \square no fueron detectados adecuadamente, lo cual ocurre con frecuencia. Esto se debe a que los amino ácidos en una hélice se encuentran en una misma región, mientras que los amino ácidos que interactúan en una hoja \square se encuentran en regiones separadas. Los resultados obtenidos confirman la posición de las \square hélices y nos demuestran que, debido a que se conocen las estructuras de pocas catalasas-peroxidases procariontas, la construcción de un modelo tridimensional a partir de la predicción de la estructura secundaria no reportaría un resultado confiable.

6.1.4 Construcción del modelo

Al contar con una estructura con alta homología, se generó un modelo tridimensional automático de MtKatG mediante el programa en línea SWISS-MODEL (Peitsch 1995, 1996; Guex y Peitsch 1997) usando como patrón la cadena B de HmCP. Se eliminaron los 29 amino ácidos iniciales de la secuencia de MtKatG usada como blanco. El resultado (SM-MtKatG) se muestra en la Figura 9.

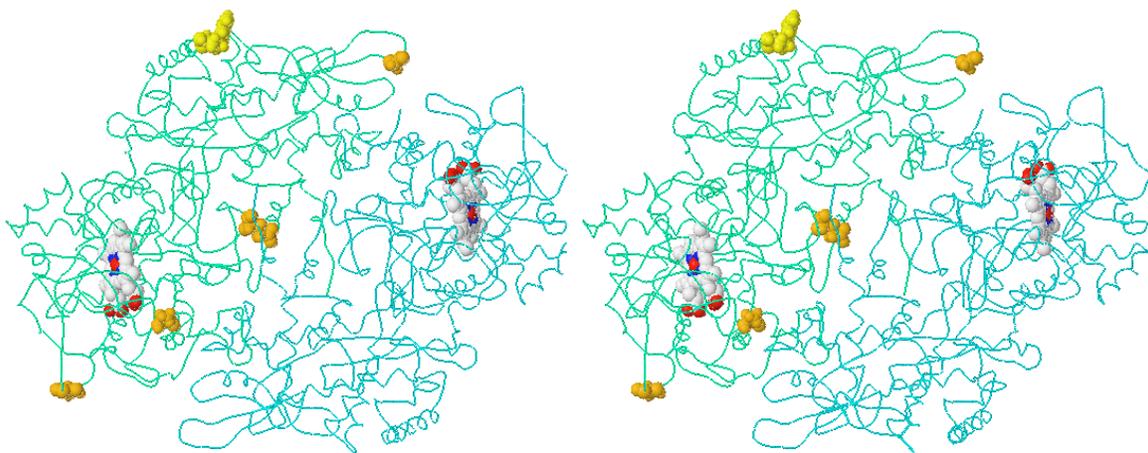


Figura 8. Esqueleto de amino ácidos de HmCP: cadena A en azul claro, cadena B en verde. Las omisiones (*gaps*) se muestran en naranja y la inserción se muestra en amarillo. Los residuos del grupo hemo se muestran como referencia para una mejor orientación y están coloreados de acuerdo al tipo de átomo: C en blanco, O en rojo, N azul oscuro, H en azul claro.

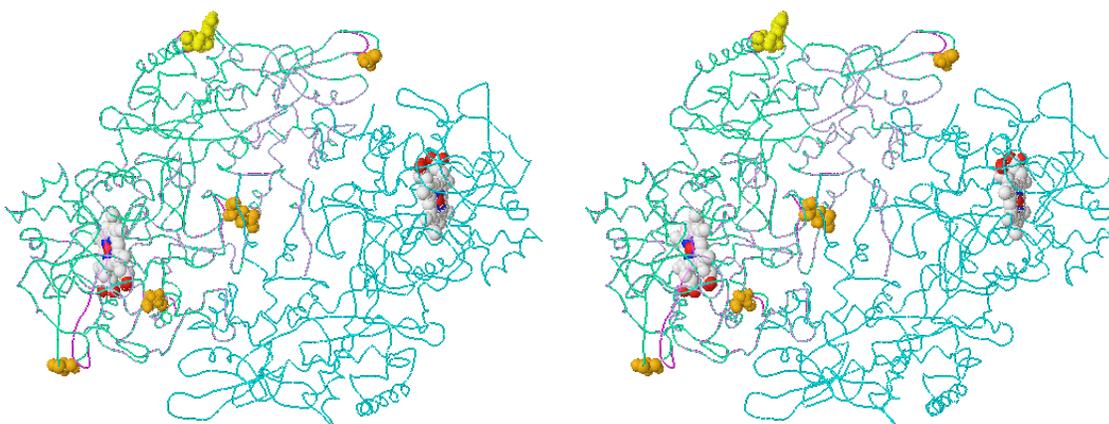


Figura 9. Sobreposición de SM-MtKatG (en magenta) a su patrón. Misma nomenclatura.

Es posible observar como el esqueleto proteico de SM-MtKatG se apega casi por completo al de su patrón, con excepción los segmentos en que se encuentran amino ácidos sin correspondencia. Dichos segmentos, como puede constatarse en las figuras 7 y 8, no poseen una estructura secundaria definida, siendo asas. En la Figura 10 se ilustra la estructura de la primera omisión, la Lys183 de HmCP, localizada entre los amino ácidos Asp194 y Glu195 de MtKatG. Si se hubiera simplemente eliminado el residuo, las posiciones del esqueleto proteico se hubiesen recorrido, alterando la estructura del resto de la molécula. Por lo tanto, es necesario definir nuevas coordenadas para dichos segmentos, de modo que pueda mantenerse la posición relativa del resto de los residuos.

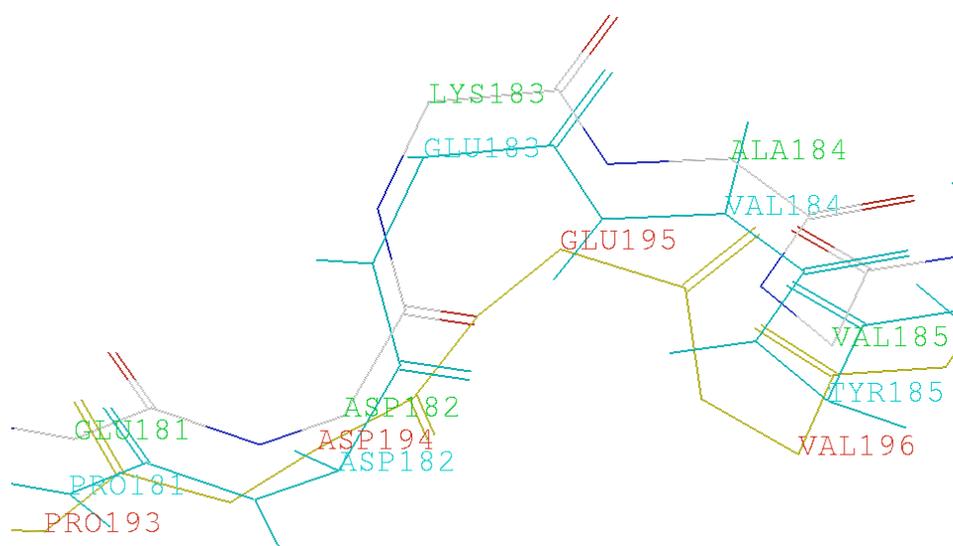


Figura 10. Omisión del amino ácido 183 de HmCP. Coloreada según el tipo de átomo se muestra la cadena B de HmCP. En azul claro, vista de haberse eliminado el amino ácido. En amarillo, el fragmento en SM-MtKatG.

Adicionalmente, se generó manualmente un modelo de MtKatG usando el mismo patrón. Buscando mantener la posición absoluta del esqueleto proteico lo más apegado posible a la del patrón, se insertaron en la secuencia de MtKatG los amino ácidos que no tenían correspondencia, además de eliminar de la secuencia de MtKatG los 29 amino ácidos del extremo N-terminal. En un primer paso, se eliminaron las cadenas laterales de la estructura de HmCP, quedando únicamente el esqueleto proteico. A dicho esqueleto se le agregaron los sustituyentes según la secuencia de MtKatG. Se refinó su posición mediante

una simulación de dinámica molecular corta en un campo de fuerza tipo Amber estándar, manteniendo fijas las posiciones de las prolinas, del esqueleto proteico y de los residuos del grupo hemo (agregado de los amino ácidos ubicados en un radio de 3Å alrededor del grupo hemo).

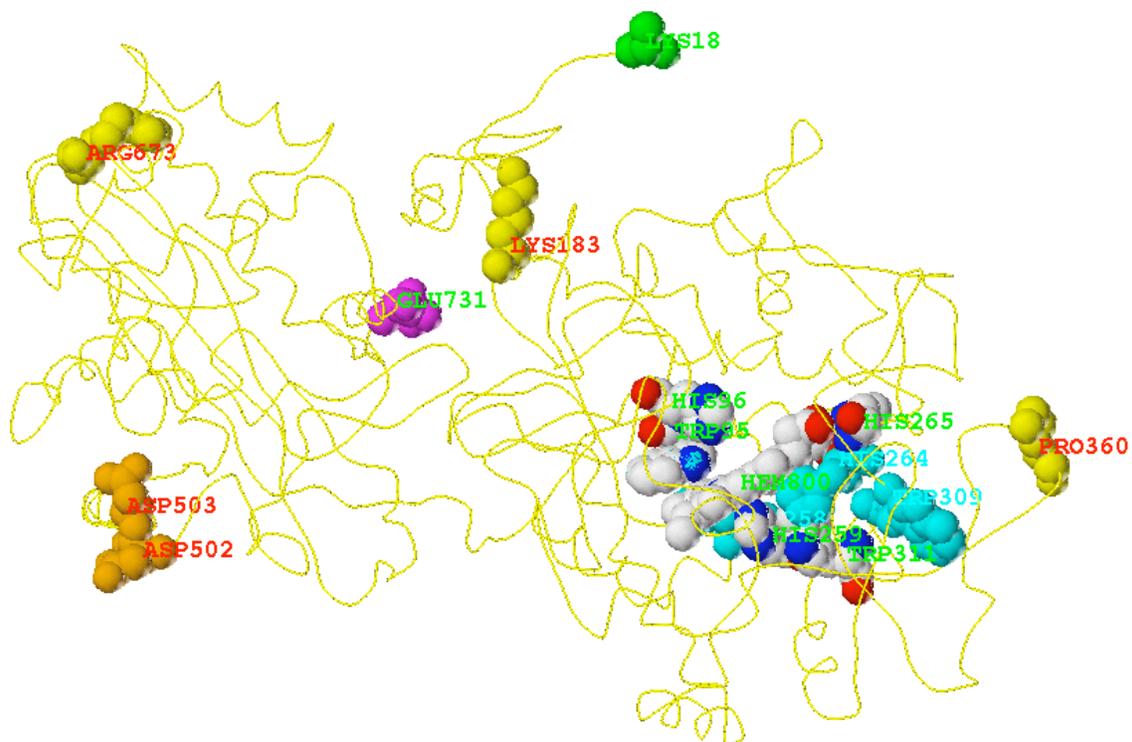


Figura 11. Estructura de HmCP. Inicia en Lys18 y termina en Glu731. Los amino ácidos sin correspondencia se muestran como anteriormente y se etiquetan en rojo. Los residuos del grupo hemo se colorean según el tipo de átomo y se etiquetan en verde.

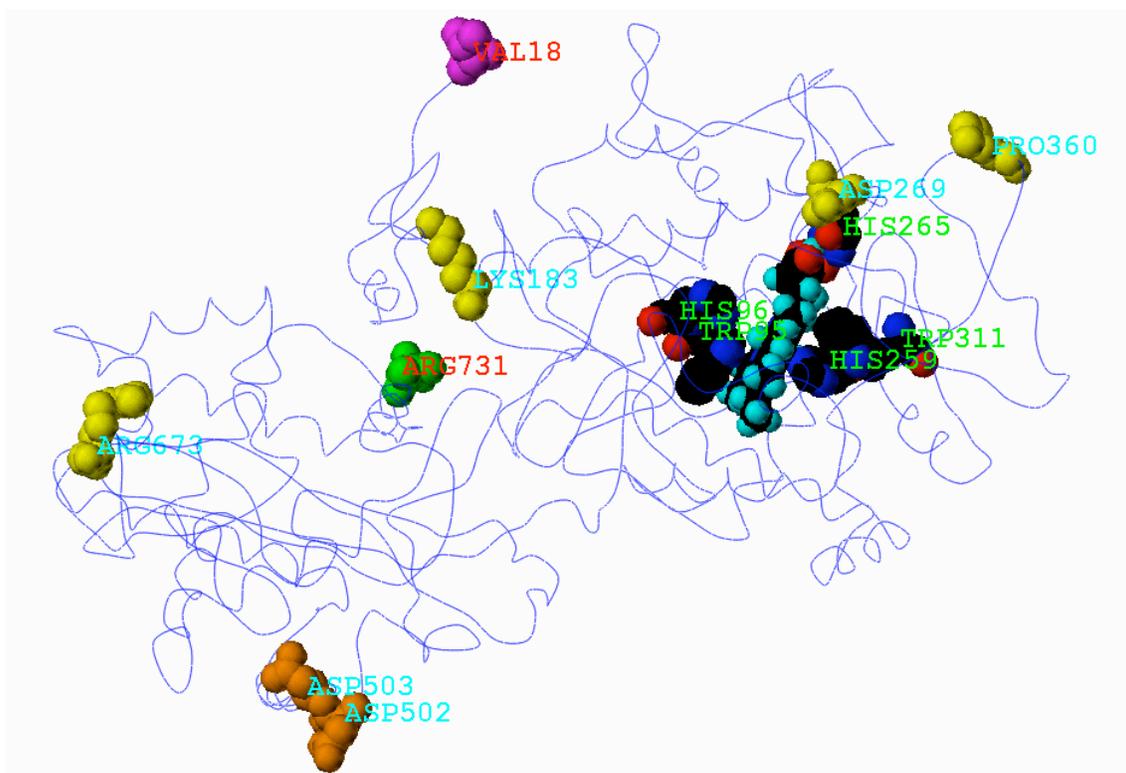


Figura 12. Estructura manual de MtKatG. Inicia en Val18 y termina en Arg731 (numeración de HmCP). Los amino ácidos sin correspondencia se muestran como anteriormente y se etiquetan en azul claro. Los residuos del grupo hemo se colorean según el tipo de átomo (excepto C en negro) y se etiquetan en verde.

Una vez teniendo el esqueleto principal, se procedió a quitar manualmente los amino ácidos que no pertenecían a la secuencia de MtKatG: K183, D269, P360 y R673. Al encontrarse en asas, se buscaron dos puntos en que las cadenas coincidieran perfectamente, se fijaron, y se modificó el fragmento que unía dichos puntos. En el mismo orden de ideas se agregó manualmente una glicina entre los residuos E502 y Q503, manteniendo la misma estructura secundaria del patrón (una hélice α).

Se refinó el modelo mediante dos simulaciones de dinámica molecular en un campo de fuerza tipo Amber. En la primera se fijaron los extremos y el esqueleto proteico, mientras que en la segunda simulación ambos quedaron libres de cambiar de conformación. La temperatura varió entre los 206 y los 328 K, calculándose una energía total promedio de 7 590.31 kcal/mol y una energía mínima de 5 993.914 kcal/mol (la energía inicial era de 83 005 930 794.855 kcal/mol). El resultado obtenido es el modelo manual de MtKatG.

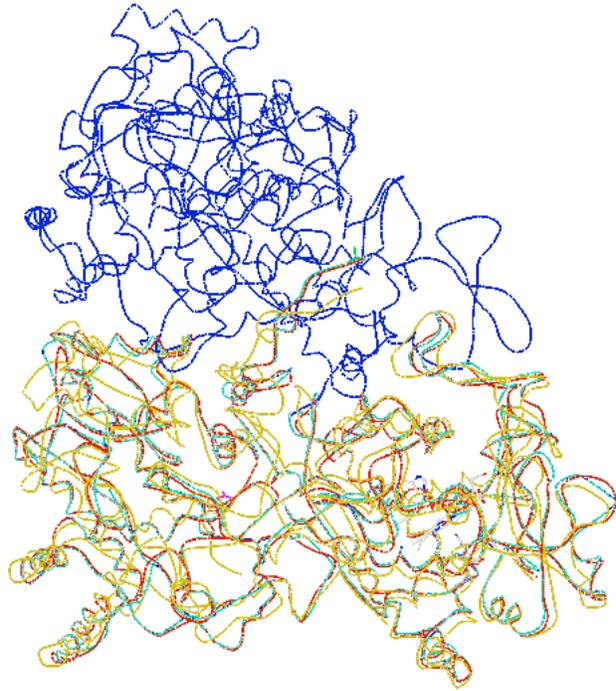


Figura 13. HmCP(1itk.pdb) cadena A en azul, cadena B en verde. Estructura de MtKatG antes de la dinámica molecular en rojo, después de la segunda simulación en amarillo

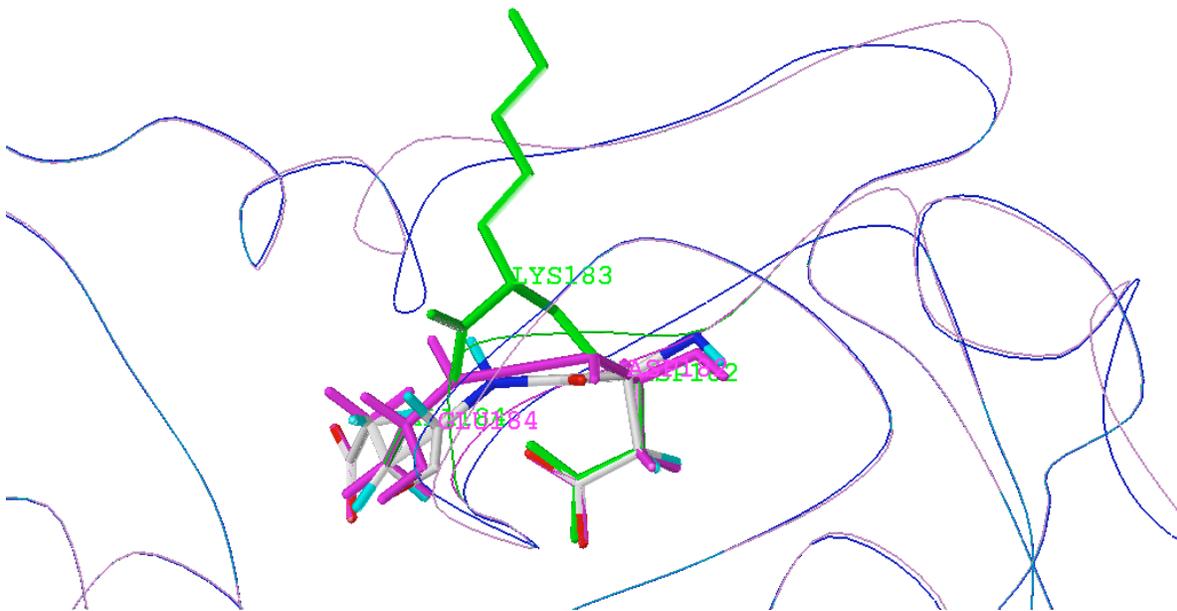


Figura 14. Primera omisión, Lys183. En verde, HmCP. En magenta, geometría inicial de MtKatG, con esqueleto azul y residuos según el tipo de átomo el resultado de la optimización de geometría.

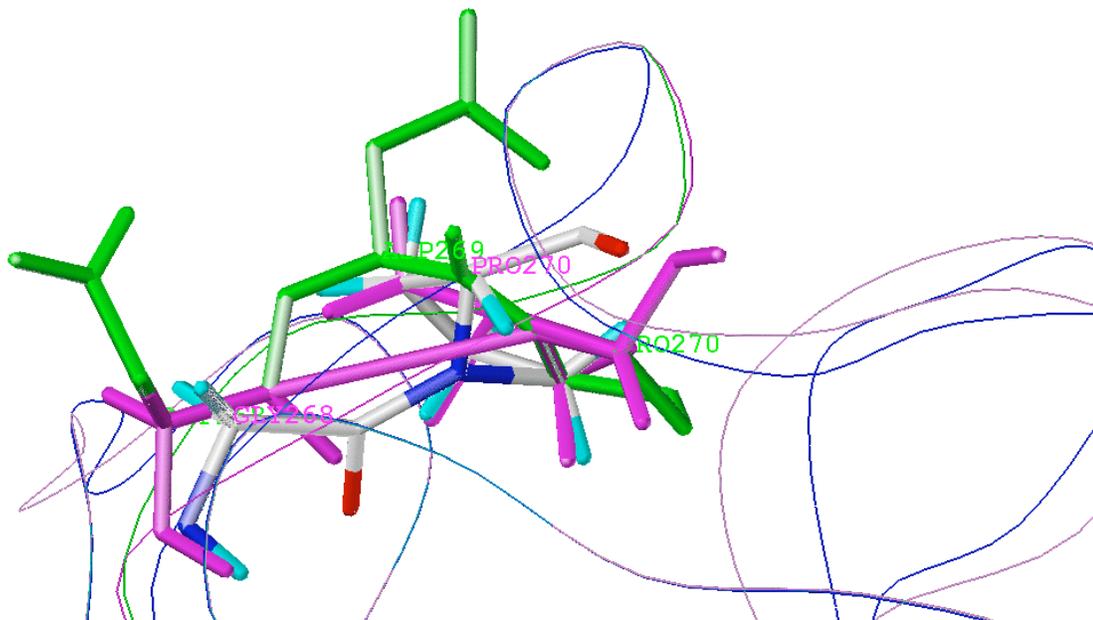


Figura 15. Segunda omisión, Asp269. Misma nomenclatura que en la figura anterior.

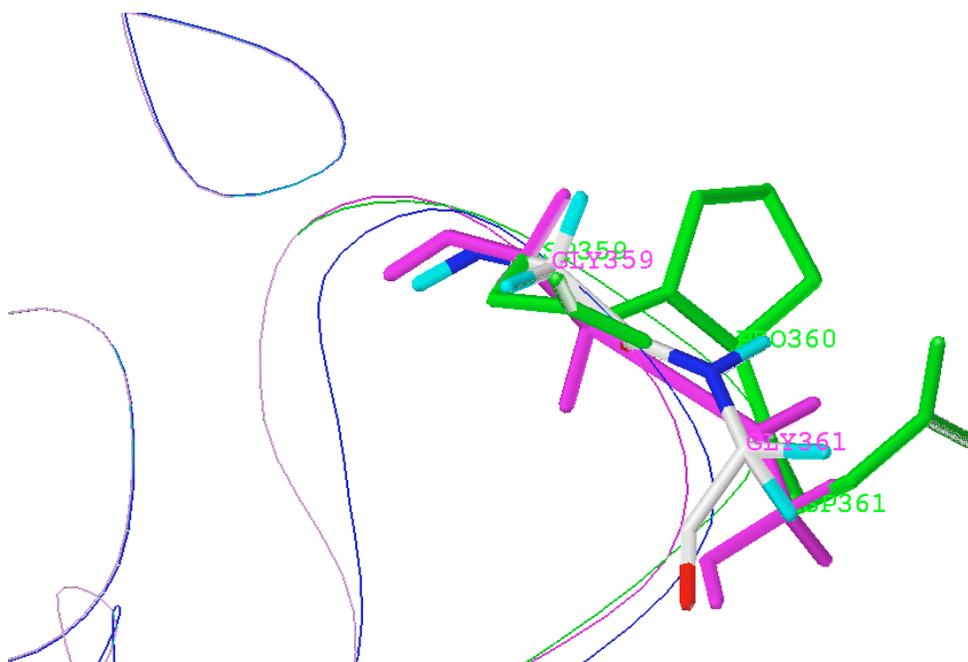


Figura 16. Tercera omisión, Pro 360. Misma nomenclatura que en la figura anterior.

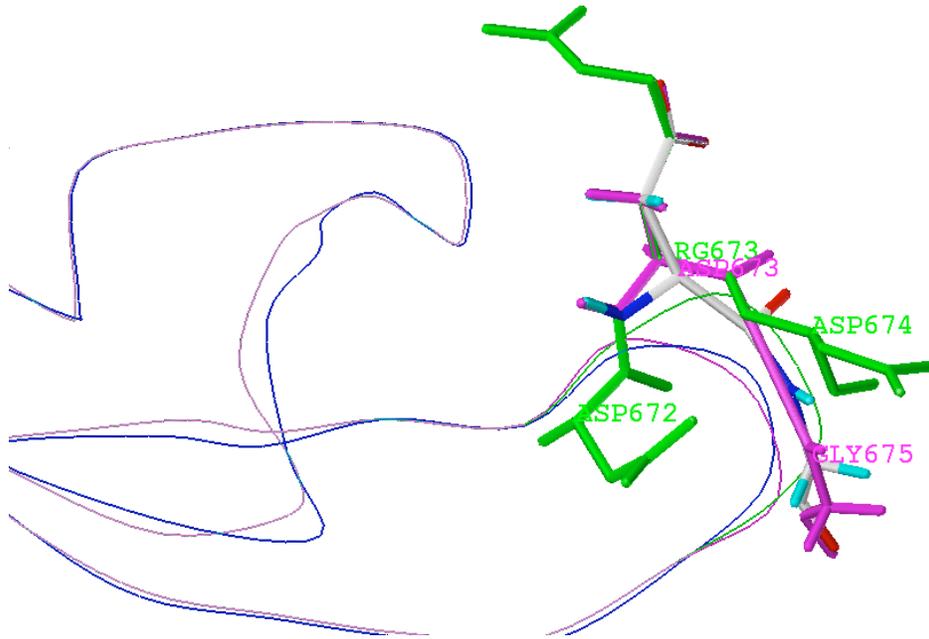


Figura 17. Cuarta omisión, Arg673.

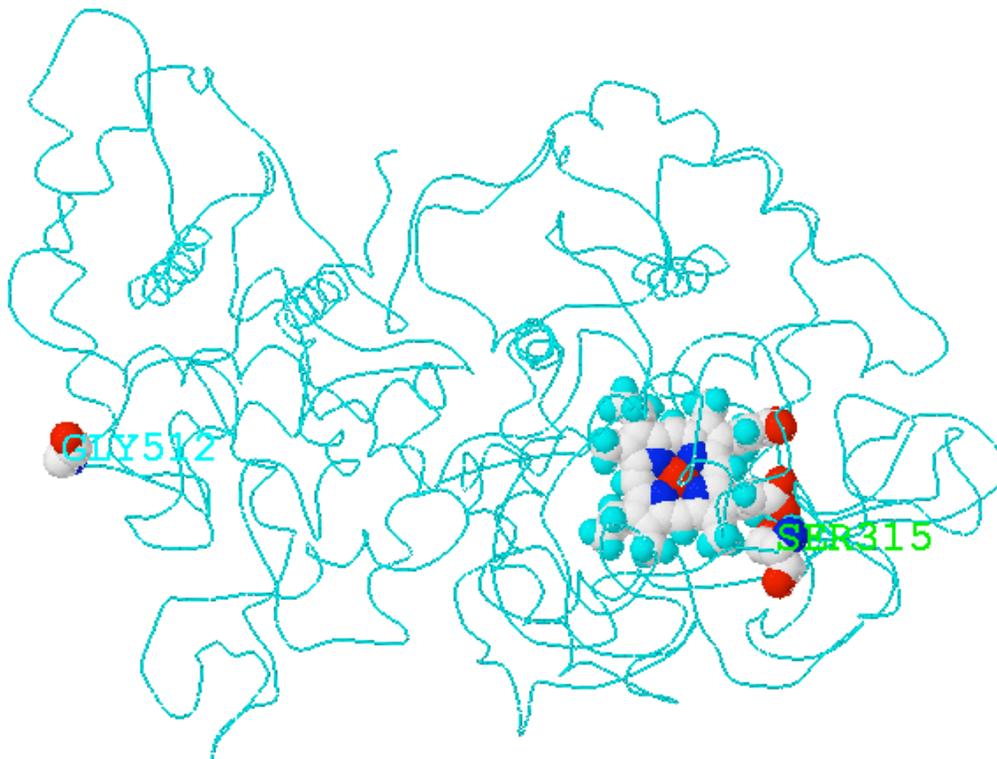


Figura 18. Inserción de Gly512. El esqueleto de MtKatG se muestra en azul claro y los residuos indicados según el tipo de átomo. La inserción de Gly512 se etiqueta en azul claro y la Ser315 en verde.

Puede observarse que debido a las omisiones, el esqueleto amino ácido se vuelve más corto. Ello se nota en las asas menos pronunciadas, mas en el resto de la molécula el esqueleto sigue sobreponiéndose.

6.1.5 Evaluación

Un ángulo dihedro está definido por cuatro átomos sucesivos y los tres enlaces que los unen. Por convención se le asigna valores en el rango de -180° a $+180^\circ$. En el esqueleto proteico pueden distinguirse tres en cada residuo: ϕ , ψ y ω ; además de los ángulos dihedros del sustituyente: ϕ_1 , ϕ_2 . Dichos ángulos, junto con el ángulo tetrahedral θ (Figura 19), permiten describir la conformación local de una molécula. La representación de Ramachadran considera los ángulos ϕ y ψ , logrando una descripción casi completa de las conformaciones permitidas en el esqueleto de la proteína (Richardson y Richardson 1989).

Al calcular un modelo automático de SWISS-MODEL, puede solicitarse se incluya una evaluación del resultado mediante el programa WHAT IF. Para SM-MtKatG se reportaron errores en la planaridad de las cadenas adyacentes y en algunas distancias interatómicas. También se realizaron evaluaciones de HmCP y del modelo manual de MtKatG mediante el programa en línea de WHAT IF. Para el patrón se reportaron errores en las distancias interatómicas, al igual que en el modelo manual. Este también presento errores en el empaquetamiento estructural y en el esqueleto proteico (indicado como inusual). Los resultados se presentan en la tabla 3.

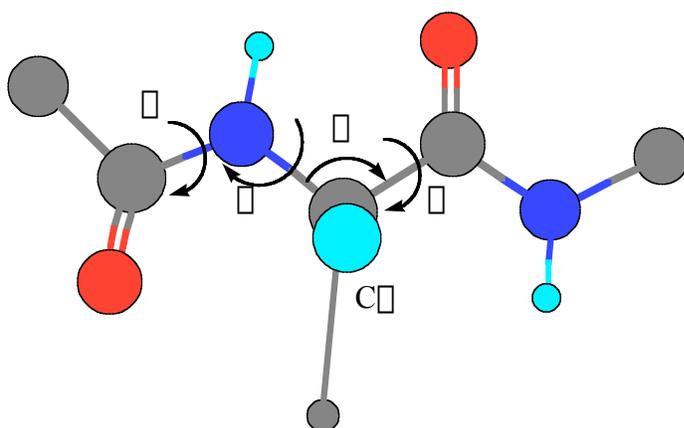


Figura 19. Nomenclatura de los ángulos dihedros y ángulo tetrahedral. Coloreado por tipo de átomo. (elaborado en Chem3D a partir de Richardson y Richardson 1989).

Tabla 3. Resultados obtenidos con WHAT IF evaluando ambos modelos (el automático, SM-MtKatG, y el manual).

Indicadores de calidad, valores Z de la estructura			
	<i>HmCP</i>	<i>SM-MtKatG</i>	<i>MtKatGmanual</i>
Calidad del empacamiento en la 1a generación	-1.207	-1.749	-2.699
Calidad del empacamiento en la 2a generación	-1.81	-2.974	-4.056
Gráfica de Ramachadran	-0.219	-0.806	-2.534
normalidad de chi-1/chi-2 de los rotámeros	1.412	0.744	-0.558
Conformación del esqueleto	0.049	-1.243	-5.953
Indicadores de la conformación, RMS Z			
Longitud de enlace	0.209	1.428	4.612
Ángulo de enlace	0.517	0.989	2.326
Restricciones del ángulo omega	0.193	0.829	2.93
Planaridad de sustituyentes	0.222	1.338	0.038
Distribución dihedral inapropiada	0.309	1.098	2.7
Distribución interna/externa	1.003	1.016	1.126

De los valores reportados puede observarse que el patrón utilizado tiene una calidad adecuada, pero con errores en la conformación, pues los valores RMS Z deberían acercarse al 1.0. De ahí podrían derivarse los defectos encontrados en los modelos producidos, pues algunos de los errores reportados en las distancias interatómicas de ambos modelos aparecen también en el patrón.

A partir de los datos de planaridad, puede establecerse que el SM-MtKatG ha sido tratado con el método GROMOS para optimizarlo, mientras que el modelo manual se ha tratado con Amber en un primer intento. Por otra parte los valores obtenidos para los ángulos de enlace y la torsión indican que el modelo automático ha sido más refinado. Dichas diferencias en el tratamiento se deben a los recursos computacionales disponibles para la generación del modelo automático, en contraste con los disponibles en la generación del modelo manual.