

CAPÍTULO 7. DISCUSIÓN

A partir de los modelos obtenidos, podemos analizar el sitio activo de la enzima, estudiando los residuos que unen y estabilizan al grupo hemo.

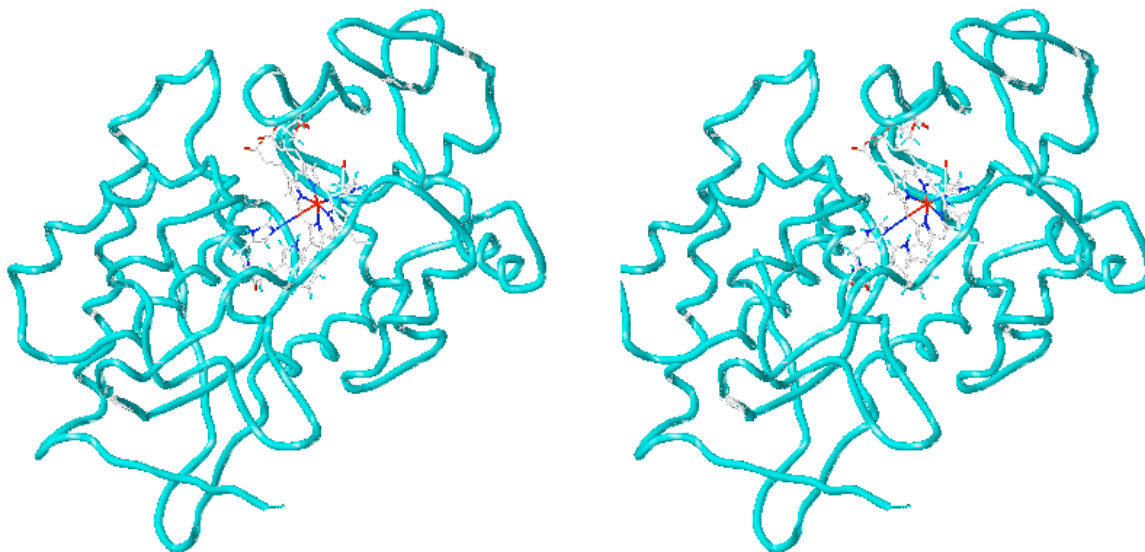


Figura 20. Localización del grupo hemo en MtKatG. Visualización estérica.

La enzima hasta el momento mejor caracterizada dentro de la clase I de peroxidasas es la CCP. Se cuentan con numerosos modelos tridimensionales en el Protein Data Bank, además de estudios sobre el sitio activo.

Según lo propuesto por Powers y cols. (2001), rodeando el sitio activo de CCP se encuentra la triada catalítica Arg-His-Trp. En el modelo de CCP (Figura 21) podemos efectivamente observar la ubicación del Trp51 y la His52. Adicionalmente se confirma el papel de dos histidinas como ligando distal y como unión al grupo hemo mediante puentes de hidrógeno, la His157 y la His181 respectivamente.

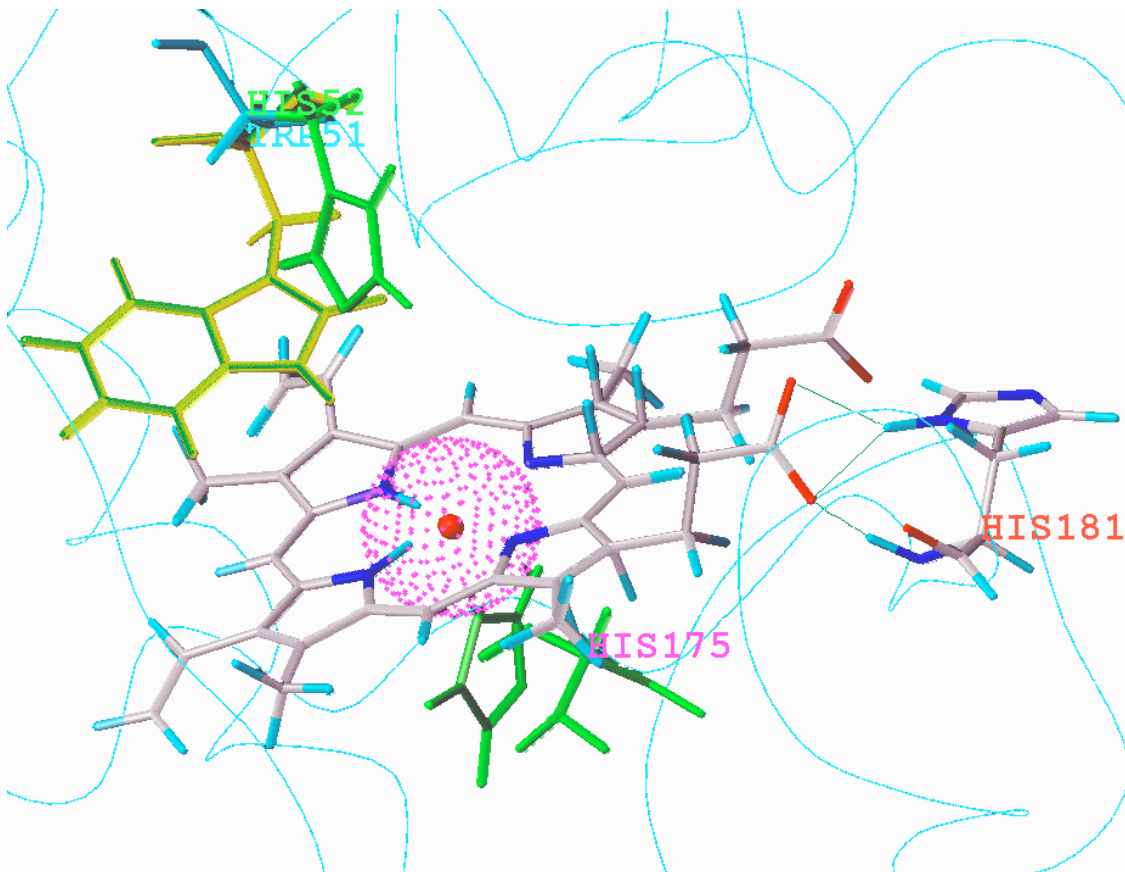


Figura 21. Amino ácidos en el sitio activo de CCP (PDB 1JCI). El grupo hemo se muestra coloreado por tipo de átomo, las histidinas en verde y el triptofano en amarillo. El puente de hidrógeno entre His181 y el grupo hemo se muestra en verde oscuro.

En el sitio activo de HmCP (figura 22) encontramos la triada catalítica Arg92, Trp95 e His96. Uniendo el grupo hemo está la Tyr218 y la His265. Del lado proximal se encuentran: el ligando His259, y el Trp311 que interactúa mediante una molécula de agua con el hemo.

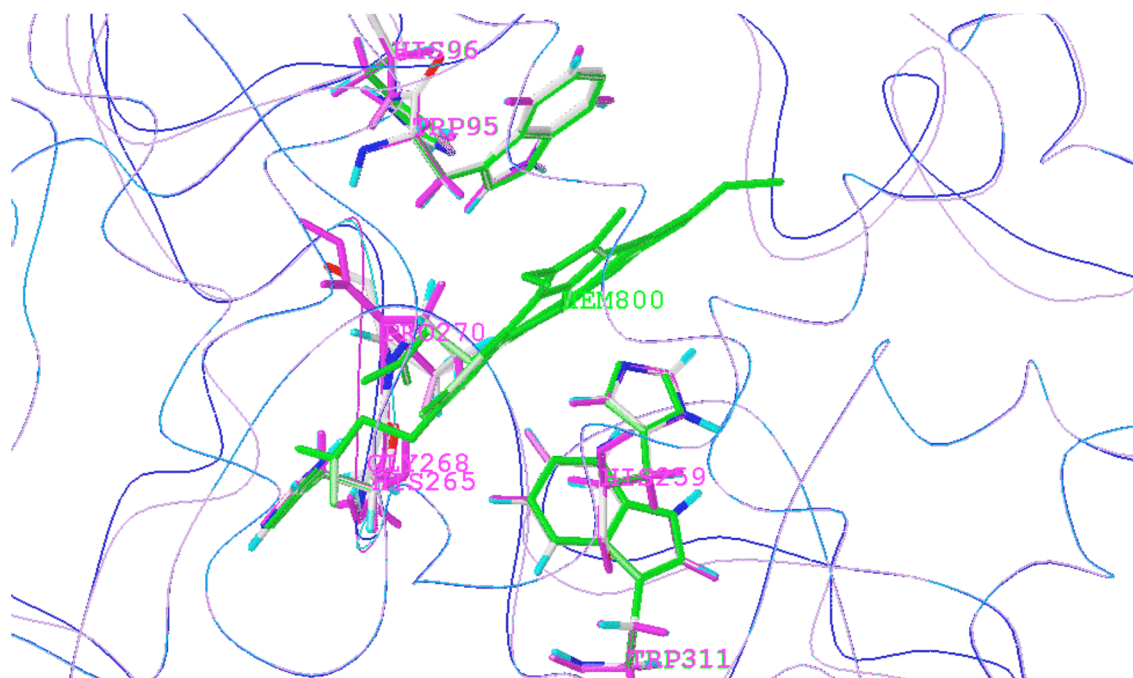


Figura 22. Amino ácidos del sitio activo según HmCP y el modelo manual de MtKatG. Misma nomenclatura que en la figura 14. Gly268 y Pro270 marcan el sitio de la segunda omisión.

Podemos ahora hacer la comparación con el sitio activo de SM-MtKatG (Figura 23). Encontramos nuevamente los residuos de la triada catalítica: la Arg104, Trp107, His108 en el lado distal del Fe. La His270 se encuentra como ligando proximal (confirmando lo propuesto por Lukat-Rodgers y colaboradores) y la His276 uniendo al grupo hemo. Puede observarse el Trp321, equivalente al Trp311 de HmCP.

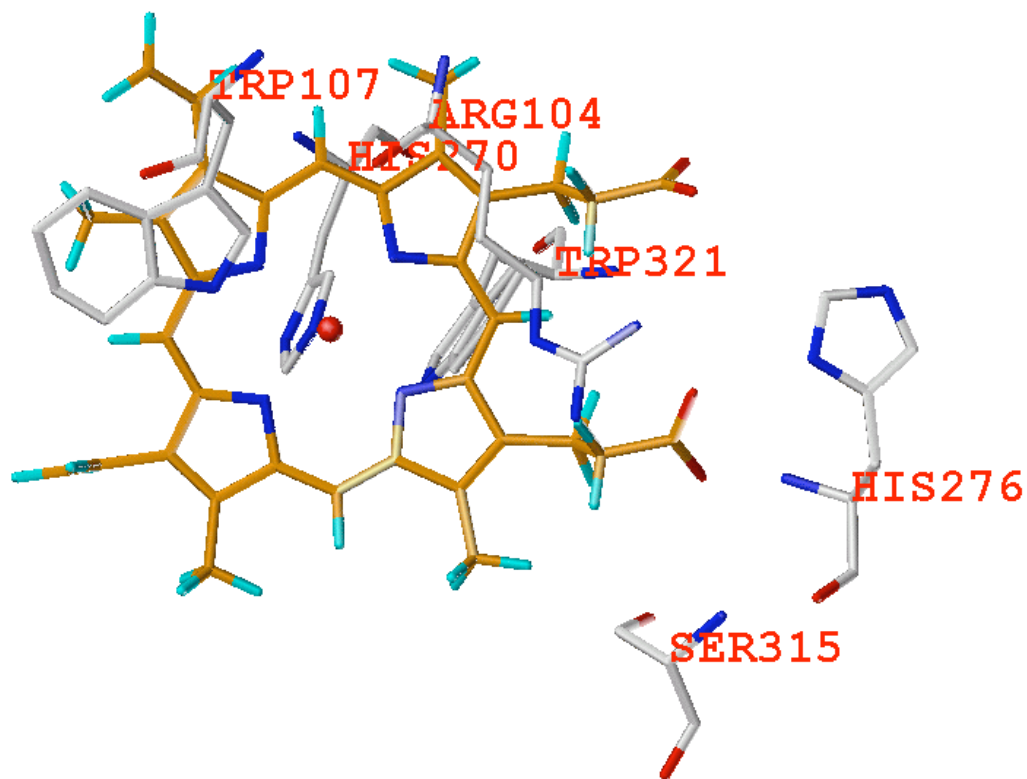


Figura 23. Amino ácidos del sitio activo en SM-MtKatG. El grupo hemo se muestra en naranja y el resto de los residuos por tipo de átomo.

Al analizar el modelo puede notarse que el residuo Ser315 (Figura 24) se encuentra cerca del carboxilato del grupo hemo formando un puente de hidrógeno con el mismo, como lo propusieron Saint-Joanis y colaboradores (1999). Pero también se encuentra en el canal de acceso al grupo hemo, por lo que no puede descartarse que la mutación S315T cause resistencia debido a un menor acceso al sitio activo. La Arg463 se encuentra en la superficie de la proteína, en el extremo de una hélice. Debido a su ubicación en el extremo C-terminal (alejado del sitio activo), la mutación de dicho residuo no debe tener consecuencias estructurales de gravedad.

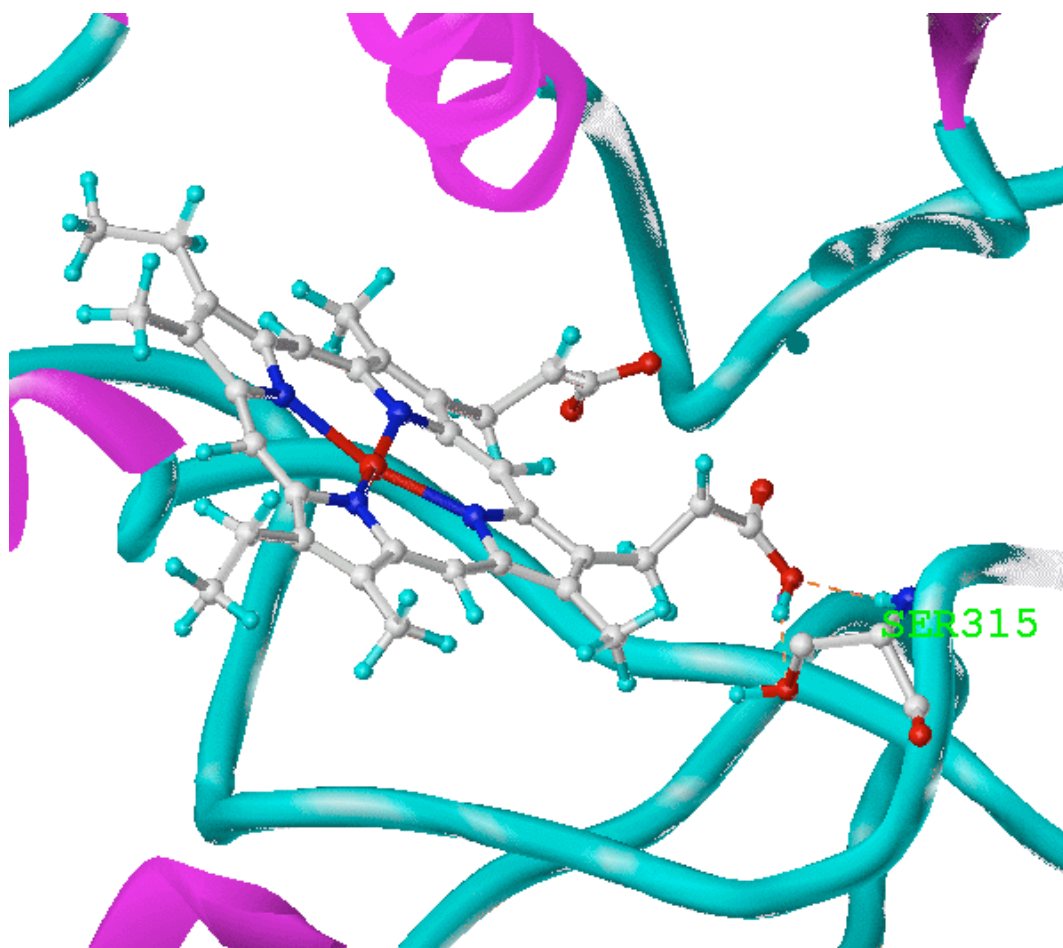


Figura 24. Formación de puentes de hidrógeno (en rojo) entre Ser315 y el grupo hemo. Los residuos del grupo hemo están coloreados de acuerdo al tipo de átomo: C en blanco, O en rojo, N azul oscuro, H en azul claro. Comparar con la interacción mostrada en la figura 21.