

ANÁLISIS ESTRUCTURAL Y PRODUCCIÓN DE LA ESTABILIDAD DE LA LACASA

Leonardo David-Herrera Zuñiga
Departamento de Biotecnología UAM-I

Memorias para obtener el grado de Especialista en Biotecnología
Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa
Enero.2008

UAM Iztapalapa
Departamento de Biotecnología
Tel. 58.04.64.54
Departamento de Química
Área de Biofísicoquímica
Tel. 58.04.46.74

Vo. Bo.
Directores de Tesis

Dr. Arturo Rojo Domínguez

Dr. Gustavo Viniegra González

a mi Esposa, Chuchito, Carmelita,
y amigos.

Herrera - Leonardo David. **ANÁLISIS ESTRUCTURAL Y PRODUCCIÓN DE LA ESTABILIDAD DE LA LACASA**. 2008
Publicación del Departamento de Biotecnología No.pag. 41

Palabras Clave. Bioinformática, Caracterización, Energía, Estructura, *in silico*, Lacasa, Mutación, Proteína, Servidor.

Resumen

La lacasa (EC: 1.10.3.2) es una enzima oxidoreductasa, capaz de catalizar la oxidación de compuestos fenólicos, aminas aromáticas e incluso compuestos orgánicos, usando oxígeno molecular como aceptor de electrones. La versatilidad de ésta para degradar éste tipo de sustratos hace que el estudio de sus aplicaciones sea de interés en varios tipos de aplicaciones como son: el blanqueado de telas, pulpa de papel, frutas y biorremediación. Se ha comprobado experimentalmente que la catálisis enzimática estimulada por esta enzima puede ser la mejor alternativa industrial a los procesos químicos corrientemente utilizados. No obstante, la mayor parte de los estudios se encuentran enfocados en mejorar la catálisis, dejando de lado aquellos estudios para mejorar la estabilidad de esta enzima en condiciones extremas. Siendo ésta la razón del porque de esté trabajo se encuentra centrado en identificar y caracterizar una nueva lacasa *in silico* que eficiente su potencial en aplicaciones industriales que conllevan procesos a temperaturas altas.

La lacasa de *Melanocarpus albomyces* contiene átomos de cobre como cofactores enzimáticos usuales en las lacasas fúngicas. La estructura cristalina de la enzima de *Melanocarpus albomyces* cuenta con cuatro átomos de cobre sostenidos por 10 histidinas, la cartografía muestra que la lacasa de *M. albomyces* se constituye de 623 aminoácidos, los cuales generan tres dominios con un plegamiento β -sándwich. El nivel de homología mostrado por *M. albomyces* al ser comparada con otras lacasas de ascomycetos es de alrededor del 60%. Las mutaciones *in silico* propuestas son adecuadas para establecer interacciones iónicas (puente salino) en la superficie proteica, dando así lugar a una nueva lacasa de *M. albomyces*, la cual puede ser más resistente en estructura en comparación con la proteína nativa.

Contenido

Resumen	1
Contenido	2
Prefacio, prólogo ...	3
Introducción	4
<i>De las proteínas</i>	4
<i>Biología y computación</i>	4
<i>De la lacasa</i>	5
Justificación	7
Objetivos	8
Materiales y métodos	9
<i>La base de datos</i>	9
<i>Hacia el software de clasificación, predicción y comparación</i>	9
<i>Del apoyo de la bioinformática</i>	10
Análisis de resultados y discusiones	11
<i>Su composición</i>	11
<i>Un simil: BLAST</i>	12
<i>Muchos compañeros, pocos amigos: ClustalW</i>	13
<i>El más alto siempre es el mejor: WebLogo</i>	14
<i>Une lettre d'identité: Prosite</i>	14
<i>Aptitudes y mas: ProtScale.</i>	15
Porcentaje de accesibilidad	15
Hidrofobicidad / Kyte & Doolittle	16
Perfiles de tendencia a formar lámina beta.	16
Perfiles de propensión a formar hélice alfa.	16
Comparación entre parámetros.	17
<i>La adolescencia: Predict Protein</i>	18
Predicción de globularidad	18
<i>Más que mejores amigos, aliados</i>	18
<i>Su energía y el yo interno</i>	20
<i>Interacciones en el núcleo de mi corazón</i>	23
<i>Desnuda y frente al espejo</i>	24
<i>La ruptura: cuerpo, mente y a lMa</i>	26
<i>Para ser la mejor: la alternancia</i>	28
<i>Equilibrio y armonía</i>	30
Conclusiones	33
Anexos	36
<i>Visualización como herramienta</i>	36
<i>RasMol</i>	36
<i>Estructuras súper secundarias y dominios</i>	36
<i>Clasificación estructural de las proteínas</i>	36
<i>ANOLEA</i>	36
<i>ROBETTA</i>	37
<i>Sitio activo</i>	38
<i>Estructura secundaria</i>	39

Prefacio, prólogo...

El trabajo descrito en esta tesis se realizó conjuntamente en las áreas de Biofísicoquímica y de Biología Molecular, pertenecientes a los departamentos de Química y Biotecnología, respectivamente al periodo 2005 - 2006.

Agradeciendo las aportaciones realizadas a mi persona por dos grandes instituciones científicas, mis directores de tesis. Arturo Rojo y Gustavo Viniegra por darme y ofrecerme la oportunidad de trabajar a su lado, así como por apoyarme y aconsejarme durante mi trabajo.

De igual manera deseo agradecer a mis colegas, amigos y a todo el personal en el laboratorio por crear una placentera atmósfera de trabajo.

Mi más expresiva y calida gratitud a Chuchito y Carmelita que me dan alas para seguir adelante, y por su amor recordándome que ellos son lo más importante que he encontrado en mi vida fuera del laboratorio.

Liliana, gracias por...

Esperando no ser desagradable y en aras de hacerme entender, he descuidado muy probablemente los tecnicismos de la escritura así como formalidades, esperando hacer esta lectura un poco más ligera.

Introducción

"Averiguar la secuencia de nuestras proteínas podrá ser algún día una actividad tan cotidiana como es hoy obtener el grupo sanguíneo..."

De las proteínas

Durante los años cuarenta y para ser más preciso, en 1948, durante un viaje a Inglaterra, Linus Pauling del Instituto de Tecnología de California fue brevemente internado en Oxford; aburrido en su cama, dibujó en papel fórmulas de polipéptidos a escala, comenzando a jugar torció el papel para observar la forma tridimensional que éstas adquirirían en el espacio, conjeturando así la llamada estructura secundaria de las proteínas, y a partir de este momento nos empezamos a dar cuenta de la enorme complejidad de estas macromoléculas.

Se sabe que la proteína es una estructura de importancia vital para los organismos, por esta razón los investigadores se han preguntado el origen de una infinidad de cosas y la razón de otra infinidad, preguntas que siempre han quedado abiertas⁽¹⁷⁾. Como un ejemplo de esto es la síntesis proteica, misma que los químicos han tratado de desarrollar por diversos métodos para crear con gran simpleza solamente polipéptidos de laboratorio, pero estos métodos consumen mucho tiempo, son de difícil aplicación y tal vez no muy eficientes al fabricar una proteína constituida de varios cientos de aminoácidos. Por esto mismo, el estudio teórico y empírico de proteínas es hoy en día un campo de investigación atractivo, con una gran actividad⁽¹⁷⁾.

Biología y computación

Dada la importancia de la estructura de las proteínas, todavía no sabemos predecir con certeza sus conformaciones tridimensionales en el espacio partiendo de la secuencia de aminoácidos, siendo así la resolución de este problema un campo abierto en biología, química y física. Las primeras personas en tratar de reducir en tiempo y espacio este problema fueron biólogos y bioquímicos, quienes adoptan la tecnología computacional como un elemento fundamental de su trabajo diario, creando una nueva ciencia, la biocomputación, que ha sido la base para ayudar en las grandes investigaciones sobre la vida, aplicando el conocimiento molecular a la tecnología, proporcionando elementos teóricos así como las herramientas prácticas para que los científicos puedan solucionar problemas en un menor tiempo.

Con el crecimiento en complejidad y capacidad tanto de las computadoras como de las técnicas de investigación, se necesitan "puentes humanos" que puedan entender ambas disciplinas y sean capaces de comunicarse con los expertos de los dos campos.

Históricamente, el uso de las computadoras para resolver cuestiones biológicas comenzó con el desarrollo de algoritmos y su aplicación en el entendimiento de las interacciones de los procesos biológicos, así como de las relaciones filogenéticas entre diversos organismos⁽²⁶⁾. Esta disciplina emergente, la bioinformática utiliza la tecnología de la información para organizar, analizar y distribuir la información biológica con la finalidad de responder preguntas complejas en menor tiempo.

La bioinformática es un área de investigación multidisciplinaria, la cual puede ser definida como la interfase entre diferentes ciencias: biología, física, química y computación. Esta disciplina se encuentra impulsada por la promesa de una nueva era en la cual la investigación biológica pueda ayudar dramáticamente a mejorar la condición sobre la calidad de vida humana. Siendo así el fin último de la bioinformática facilitar el descubrimiento de nuevas ideas biológicas así como el de crear perspectivas globales a partir de las cuales se puedan discernir principios unificadores entre las ciencias básicas y aplicadas como pueden ser la biología o física a la biotecnología.

En estos últimos años las ciencias aplicadas como la biotecnología han tenido un desarrollo importante, partiendo de la manipulación de medios de cultivo, hasta llegar a los microorganismos genéticamente modificados de manera *in vivo*. Éste crecimiento es producto de una gran demanda por procesos industriales alternativos donde gobierne una atmósfera biológica, confiriéndoles así a éstos una mayor y mejor calidad, limpieza y rapidez.

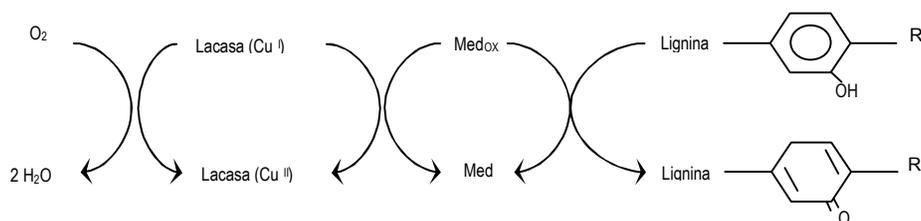
De la lacasa

El cobre es uno de los metales de transición biológica que prevalecen más, después del hierro. Su concentración en el hábitat biológico es bajo, sin embargo su acumulación en las células requiere de transporte activo. El Cu^{2+} es tóxico si se acumula y aún en concentraciones bajas. De aquí, que en los organismos el transporte sea en la forma de complejo metálico, usualmente en proteínas. Ejemplo de estas proteínas son las lacasas. Esta enzima tiene importancia biológica, ya que está involucrada en la esporulación, producción de pigmentos, formación de estructuras biológicas y degradación de lignina por los hongos⁽²³⁾.

Las enzimas lacasas son capaces de catalizar la reducción del oxígeno a agua, sustrayendo 4 electrones y análogamente oxidar una variedad de sustratos. Contienen cuatro tipos de cobre, uno llamado "azul" o tipo I (T_1), que absorbe a 600 nm y un acoplamiento con un cobre tipo II (T_2) o cobre "normal", indetectable por absorción óptica y un par tipo III (T_3) o acoplamiento "antiferromagnético", que tiene una banda de absorción a 330nm, acoplados binuclearmente a través de un puente hidróxido^(22, 23).

El análisis estructural por difracción de rayos X y de las secuencias, demuestran que existe similitud entre las lacasas provenientes de diversas especies y analogía con enzimas de otras familias que contienen sitios catalíticos metálicos como la ascorbato oxidasa, ceruloplasmina, bilirrubina oxidasa y ferroxazinona⁽²⁴⁾.

La enzima lacasa se encuentra constituida por tres dominios. El cobre T_1 mononuclear, se encuentra localizado en el dominio 3 quelado por dos histidinas y una cisterna. Los otros tres cobres están acoplados trinuclearmente junto con 8 residuos de histidina pertenecientes a los dominios 2 y 3. Comúnmente en las estructuras cristalográficas el cobre T_2 se encuentra ligado a dos histidinas y una molécula de agua o grupo dioxígeno, en cambio el sitio binuclear cobre T_3 contiene 3 histidinas ligadas al cada cobre. Un promedio de las estructuras cristalográficas para la lacasa muestra que los cobres (cobre II y cobre III) del acoplamiento trinuclear se encuentran ligados entre si con una distancia de aproximadamente 4 Å y que el cobre I se encuentra a 13 Å del sitio trinucleado. En las oxidoreductasas multicobre, el cobre I acepta electrones del sustrato y transfiere los electrones aproximadamente a 13 Å, al acoplamiento trinuclear T_2/T_3 , el cual une y activa al O_2 para la reducción a H_2O_2 , como se muestra en el esquema 1^(4, 5, 16).



Esquema 1. Ciclo catalítico del sistema oxidativo de la enzima lacasa.

Funcionalmente, todas las oxidasas multicupricas, acoplan 4 electrones, con oxidaciones del sustrato unielectrónicas, con los cuatro electrones reductores del di-oxígeno al agua. La reacción tetraelectrónica de la lacasa nativa, muestra que se produce una especie transitoria, la cual da como resultado la enzima enteramente oxidada. Esta especie enzimática es llamada N, en la cual se muestra que los sitios cobre T_1 y T_3 , están oxidados y de ahí que al menos 3 electrones han sido transferidos al oxígeno, utilizando a éste como último aceptor de electrones^(4, 5, 14, 22).

Koroleva y colaboradores⁽¹⁸⁾, han estudiado los cambios ópticos provocados por la temperatura, en el centro catalítico de las enzimas lacasas que son producidas en hongos del genero *Coriolus*, demostrando que un aumento de la temperatura induce la desintegración del acoplamiento trinuclear de los cobres, acompañado de la pérdida de uno de los iones cobre de este sitio y la desaparición del acoplamiento antiferromagnético en el cobre tipo 3 y también que al quitar el cobre tipo 2 del sitio trinuclear, la enzima lacasa muestra una baja en la termotolerancia, por lo cual este sitio es importante para estabilizar el efecto de la temperatura^(12, 14). De igual manera demostraron que existen varios cambios de transición durante el desplegamiento de la lacasa provocados por la temperatura. En hallazgos recientemente, se ha demostrado, por mutagénesis directa, que se puede modular la actividad redox de la lacasa.

Otros grupos de investigación han reportado que la desnaturalización térmica de proteínas que contiene cobre en su sitio activo es irreversible, por lo cual los cambios estructurales causan la pérdida en la actividad enzimática, que terminan en el desplegamiento total de la proteína^(8, 13).

Por otro lado, los estudios hechos sobre la estabilidad de las lacasas y la preocupación de mantener la actividad de esta ante los disolventes, ha sido investigada, probando diferentes ambientes de reacción no polares, como tolueno, isopropil eter, benceno, cloroformo, piridina, tetrahidrofurano, dimetoxifenol y dioxano para la oxidación de hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH) como el o-fenilen diamino. Así mismo se han tratado de obtener productos de la oxidación de PAH inmovilizando a las lacasas en polietilenglicol con resultados exitosos en lo que respecta a la estabilidad y oxidación^(5,9). La inquietud de las compañías, como la de la generación de gasolinas, de reducir los índices de azufre, han llevado a pensar que un sistema enzimático en ambiente orgánico e inmovilizado sería eficiente, ya que esta proteína puede ser estable en medios orgánicos y podría oxidar diversos compuestos como el dibenzotiofeno, que se encuentra en cantidades considerables en las gasolinas⁽⁷⁾.

Aunque la utilidad industrial de las lacasas se encuentra en aumento, todavía no se pueden desarrollar procesos que impliquen el uso de éstas, lo cual limita la utilidad de dichas enzimas a procesos que se llevan a cabo a temperatura ambiente o apenas unos grados por arriba de esta temperatura. Por otro lado, las pocas secuencias de enzimas termoestables son de propiedad industrial, lo que nulifica las oportunidades de industrias pequeñas para adquirir procesos más limpios y seguros⁽³⁾. Esto, aunado a la gran demanda tanto de investigadores como de la propia industria por obtener información y resultados de manera rápida y concisa nos ha conducido al camino de la biología computacional.

Es sabido que la industria, como por ejemplo la textil, alimenticia, del procesamiento de la madera, farmacéutica y química utiliza reacciones de oxidación química en sus procesos los cuales resultan ser económicamente y experimentalmente insatisfactorios, ya que las reacciones secundarias o las mismas oxidaciones resultan ser tóxicas.

Una alternativa potencial a los métodos químicos es la oxidación enzimática. Hoy por hoy se ha visto que la lacasa es importante para las industrias que utilizan reacciones de oxidación. En la actualidad se estudia la lacasa con gran intensidad por sus numerosas aplicaciones en la industria textil para blanquear el color índigo de la mezclilla o en las plantas tratadoras de efluentes para la decoloración del mismo. También se utiliza la lacasa para remover compuestos fenólicos en el pulpeo del papel, en la remoción de polifenoles que causan la llamada neblina de los jugos o bebidas, así como en la remoción de compuestos irritantes para industria de cosméticos⁽¹¹⁾. Una de las potenciales aplicaciones de la lacasa es la biorremediación de suelos, eliminando los contaminantes sólidos, hidrocarburos aromáticos y clorofenoles. Seguida de la generación de biocombustibles como el bioetanol mediante la degradación de gajardo de caña, fécula de maíz o yuca. Y aunque la enzima lacasa es una enzima cardinal y prometedora gracias a su variedad de aplicaciones industriales no es completamente estable en aplicaciones que conlleven temperaturas altas en su proceso.

Como una consecuencia del párrafo anterior se ha comprobado que un aumento en la temperatura reduce los tiempos de catálisis para los procesos industriales. Como un ejemplo se encuentra la deslignificación de pulpa de papel donde un aumento en la temperatura contribuye de manera favorable en la catálisis pero que a su vez restringe la vida útil de la enzima, siendo así una clara necesidad el aumentar la estabilidad térmica de esta enzima y poder con esto ser utilizada en una gama más amplia de procesos y aplicaciones industriales.

El fin último para éste trabajo se encuentra dirigido a entender algunos de los factores capaces de conferir resistencia térmica a la lacasa proveniente del microorganismo *Melanocarpus albomyces* (IMa)^(15,19,20), mediante un aumento en su resistencia estructural con la inserción de mutaciones *in silico*.

Justificación

El conocimiento sobre biología experimental y molecular en proteínas ha aumentado de manera significativa en los últimos años, haciendo que la comprensión e interpretación de estas disciplinas, así como de otras cercanas a ellas, sea cada vez más complicada⁽¹⁷⁾. Siendo así y por esta razón que emergen herramientas computacionales capaces de originar una interpretación de datos veloz y ágil, disminuir tiempos de experimentación, formular algoritmos de comprensión física y dinámica idóneos de ser utilizado para el modelado de condiciones extremas.

En México el análisis biocomputacional se encuentra rezagado; por lo mismo, pocas personas se dedican a su desarrollo, comprensión y/o manufacturación siendo ésta la principal razón por la que es importante capacitar y fundamentar conocimientos del análisis biocomputacional sobre personas interesadas en estos temas.

Para aplicar los métodos computacionales se eligió como sujeto de trabajo a la enzima lacasa de los hongos *Myceliophthera thermophila* (IMt)⁽²¹⁾ y *Melanocarpus albomyces* por las siguientes razones:

- La enzima lacasa posee características estructurales interesantes (metaloproteína) para la explotación de herramientas bioinformáticas, así como la exploración límite de algunas de éstas.
- Enzima estudiada experimentalmente en nuestra Universidad aportando la posibilidad de realizar los ensayos o comprobaciones experimentales.

Importancia biotecnológica, en la remoción de contaminantes por oxidación y la generación de biocombustibles.

Objetivos

1. Aprender a utilizar las herramientas de análisis y minería de datos para el estudio de las características geométricas en proteínas de interés biotecnológico.
 2. Determinar los posibles aminoácidos que contribuyan significativamente a la estabilidad estructural de la lacasa
 3. Proponer y realizar mutaciones *in silico* de aquellos aminoácidos encontrados en la superficie de la proteína,
 4. Favorecer las interacciones iónicas,
 5. Aumentar la diferencia energética entre la proteína nativa y la mutada, mediante la formación de puentes salinos,
- Obtener una lacasa de *Melanocarpus. albomyces* con resistencia estructural a temperaturas altas.

Materiales y métodos

La base de datos

El estudio de la secuencia de aminoácidos, así como de la estructura secundaria y terciaria es de importancia para el análisis, comprensión y predicción de las características conformacionales de cualquier proteína⁽¹⁷⁾. El sistema donde se realizó el estudio de las estructuras básicas antes nombradas, se compone de un conjunto de proteínas acotado en un banco de datos, llamado Protein Data Bank, PDB⁽³⁵⁾ por sus siglas, en este banco se encuentran todas las proteínas cristalizadas, de las cuales se conoce su configuración espacial, es decir, las coordenadas cartesianas de cada uno de sus átomos, ya sea por técnicas de difracción de rayos X o bien por el uso de resonancia magnética nuclear. El número de estructuras incluidas en este banco es de casi 40,000. La búsqueda de lacasas se realizó cuidadosamente, ya que comúnmente este tipo de búsqueda conlleva alteraciones en los resultados debidas a la elevada redundancia de algunas estructuras. De este modo, se utilizaron dos criterios que nos permitieron evitar dicha redundancia.

1. La exclusión de proteínas con homología menor al 50%
2. Y el descarte de proteínas que no tuvieran actividad de oxidoreductasas.

Los dos criterios anteriormente mencionados nos ofrecen garantía de no perder información estructural necesaria para la consecución de nuestros objetivos.

Hacia el software de clasificación, predicción y comparación

La visualización en el espacio (3D), las regiones interfaciales, el análisis geométrico, entre otros, se obtuvieron con la ayuda de dos programas computacionales: Rasmol 3.3.1.1 y Viewerlite 5.0, estos programas permiten la manipulación de una o varias proteínas, siendo capaces de leer como entrada una lista de coordenadas cartesianas y proporcionar como salida una imagen tridimensional ya sea como proteína, ADN, plasmado, entre otros.

El análisis, caracterización y comparación de las estructuras pertenecientes a las enzimas IMt y IMA (estructura cristalográfica) se realizó al efectuar una serie de pasos:

1. Exploración y análisis de la secuencia de aminoácidos para IMt,
2. Búsqueda de homólogos de IMt en secuencia, determinada por el servidor Blast,
3. Alineamiento múltiple de las secuencias homologas encontradas en ClustalW⁽³²⁾,
4. Localscan de la secuencia de IMt para detectar las regiones con función y características conocidas,
5. determinación de propiedades fisicoquímicas para IMt en Proscale,
6. Propensión de la secuencia de a formar algún tipo de estructura secundaria en Predict Protein
7. Predicción de estructura tridimensional para IMt en base a IMA en SWISSmodel,
8. Interpretación de las conservaciones e invariantes evolutivas para la familia de oxidoreductasas mediante un análisis visual en WebLogo⁽³¹⁾,
9. Localización de aminoácidos estructurales del sitio activo en PDBsum⁽³⁵⁾,
10. Estudio y conocimiento del fold para IMt y IMA, así como del andamiaje entre estructuras súpersecundarias en SCOP⁽²⁹⁾,
11. Identificación de regiones interfaciales,
12. Estimación de energías de contacto entre regiones interfaciales para diferentes dominios,
13. Localización de los aminoácidos responsables de la estabilización o inestabilización de la proteína, realizado con ayuda de los servidores Robetta⁽²⁸⁾ y Anolea⁽³⁶⁾.

De la siguiente manera, una vez identificados y analizados todos los puntos anteriores se procedería a realizar las mutaciones *in silico* o *in machina* de los aminoácidos con características energéticas desfavorables para la conservación estructural o empaquetamiento de IMA al ser sometida a temperaturas altas. Una vez conocida la distribución espacial de aminoácidos para la enzima IMA se trocearía en sus dominios y a su vez se fragmentarían éstos con la finalidad de estimar la energía de interacción dominio-dominio.

El conocimiento de esta interacción junto con el mapeo de la superficie proteica tendrá como resultado el hallar aquellos aminoácidos ya mencionados, cercanos en el espacio pero distantes en secuencia, que sugieren un sitio de mutaciones puntuales que permitan formar una interacción iónica entre él y algún otro aminoácido.

Las mutaciones y el cálculo energético de los dos puntos arriba citados se realizaron con Hyperchem, que es una paquetería computacional de uso químico y biológico que dentro de sus funciones más importantes es contar con un campo de fuerza capaz de dirigir una proteína a un estadio de mínima energía. Y finalmente realizadas las mutaciones, se efectuó un análisis del potencial electro estático y energético de cada mutación propuesta en Hyperchem, así como una evaluación de su calidad estereoquímica en Molprobit.

Del apoyo a la bioinformática

Todos los programas, servidores y bancos descritos forman parte de las herramientas utilizadas para realizar el trabajo propuesto en los objetivos anteriormente fijados. Mismos que han sido instalados, ejecutados o accedidos utilizando una computadora personal.

Análisis de resultados y discusiones

Determinar la secuencia de aminoácidos para la lacasa de *Myceliophthera termophila* es fundamental para nuestro análisis, ya que como en todas las proteínas ésta guarda la información para la conformación tridimensional y funcional ⁽²⁾. Como en casi todas las proteínas, LMt se encuentra constituida de los 20 aminoácidos elementales existentes en la naturaleza, siendo así el número de estructuras posibles para LMt coasi-infinita, pero con una única conformación estructural con actividad específica.

Al realizar el estudio y búsqueda de la estructura primaria para la lacasa de *M. termophila* en Banco de Datos Cristalográficos de Proteínas (Protein Data Bank, PDB) ⁽³⁵⁾ se encontró que no hay proteína alguna cristalizada de LMt de la cual se conozca su estructura, por lo que se prosiguió con la búsqueda en otro tipo de fuentes externas al PDB.

La estructura primaria de la LMt, figura 1, fue provista por el Dr. Javier López Cruz quien la obtuvo por donación de los Laboratorios Novo.

MKSFISAASSTLLVGILTPSVAASAPPSTPEQRDLLVPITEREEAASVKARQQSCNTPSNRACWTDGYDI
 NTDYEVDSPDTGVVVRPYTLTLTEVDNWTGPDGVVKEKVMLVNNSIIGPTIFADWGDTIQVTVINNLETN
 GTSIHWHLHQKGTNLHDGANGITECPIPPKGGGRKVYRFKAQQYGTSWYHSHFSAQYGNVVGAIQING
 PASLPYDSDLGVFPISDYYYSSADELVELTYNSGAPFSDNVLFNGTAKHPETGEGEYANVTLTPGRRHR
 LRLIMTSVENHFQVSLVNHTMTIIAASDMVPVNAMTVDSLFLGVGQRYDVVIEASRTPGNYWFNVTFGG
 GLLCGSRNPYPAAISFHYAGAPGGPPTDEGKAPVDHNCCLDLPNLKPVVARDVPLSGFAKRPDNTLDVT
 LDTTGTPLFVWVNGSAINIDWGRPVVDYVLTQNTSFPPGYNIVEVNGADQWSYWLIENDPGAPFTLPH
 PMHLHGHDYFVLRSPDESPASNERHVFDPARDAGLLSGANPVRDVTMLPAFGWVLAFRADNPGAWL
 FHCHIAWHVSGGLGVVYLDRADDLARGAVSDADADDLDRLCDWRRYWPNTNPKSDSGLKHRWVGGQGW
 LVKA

Figura 1. Secuencia primaria de aminoácidos para LMt, esta secuencia se muestra como una cadena constituida por 20 letras, donde cada letra corresponde a un aminoácido. La proteína monómerica de LMt se encuentra conformada por 620 aminoácidos.

Su composición

El porcentaje de aminoácidos que conforman una proteína es importante ya que son los aminoácidos quienes dictan la conformación secundaria, por ejemplo, una proteína siendo rica en triptofanos, histidinas o tirosinas tendrá una menor probabilidad de conformar estructuras del tipo alfa hélice, y de igual manera una proteína que sea rica en aminoácidos no polares tendrá una superficie menor expuesta al solvente en comparación con una que tenga demasiados residuos cargados.

A continuación se muestra la tabla número 1, en esta se puede apreciar el porcentaje de cada uno de los aminoácidos pertenecientes a LMt

%A: 7.7	%C: 1.1	%D: 7.4	%E: 3.4	%F: 3.4
%G: 9.3	%H: 3.4	%I: 4.0	%K: 2.6	%L: 7.7
%M: 1.3	%N: 5.8	%P: 7.7	%Q: 2.3	%R: 4.7
%S: 5.7	%T: 6.9	%V: 8.9	%W: 2.7	%Y: 3.9

Al analizar la tabla correspondiente al porcentaje de aminoácidos se ve claramente que los aminoácidos predominantes son aquellos del tipo pequeños, alifáticos y polares (como la glicina, alanina y leucina), lo cual daría como consecuencia que la proteína de LMt tenga un área pequeña expuesta al solvente, lo cual fue consistente con los perfiles de hidrofobicidad y de exposición al solvente mostrados más adelante.

Un simil: BLAST

El programa BLAST es una herramienta extensamente usada para analizar bases de datos, nos permite realizar búsquedas y encontrar semejanza de datos entre secuencias primarias tanto de proteínas como de ADN. BLAST utiliza para realizar las comparaciones entre secuencias una variedad de refinamientos que se encuentran definidos por algoritmos estadísticos, mismos que permiten disminuir substancialmente el tiempo de ejecución.

En conjunto este algoritmo permite identificar semejanzas débiles entre proteínas distantes evolutivamente pero que a su vez son biológicamente relevantes, mediante la introducción de un método heurístico el cual combina de manera automática y estadística los alineamientos significativos, producidos de manera paralela en una matriz de localización específica la cual se genera de manera iterativa y sensible a éste tipo de semejanzas o conservaciones biológicas.

La búsqueda de homólogos para secuencia primaria fue realizada en Position Specific Iterative BLAST (PSI-BLAST: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>), de la cual se obtuvieron 1100 secuencias no redundantes⁽³⁹⁾.

En la figura 2 se aprecia un fragmento de la salida de BLAST, correspondiente al análisis efectuado sobre la secuencia de IMt, con este fragmento se logró detectar y corroborar que esta proteína pertenece a la familia de "oxidases del cobre" o "Cobre-oxidases". La figura 2 nos permite ver una aproximación de la secuencia de aminoácidos para IMt. En ésta figura se aprecia la ubicación del núcleo de átomos de cobre (color rojo), de manera relativa esta fracción se encuentra acotada entre los aminoácidos 213 a 362, como se puede apreciar en la figura 2



Figura 2. Apreciación de la secuencia primaria de aminoácidos perteneciente a IMt, esta secuencia se muestra como un listón a lo largo de una dimensión (1D), en la parte baja de color rojo se puede apreciar la sección de aminoácidos que envuelven los átomos de cobre, distintivo de las proteínas de familia Cobre-oxidasa

La estampa abajo mostrada permite observar la correspondencia que hay entre un fragmento de LMt y una secuencia representativa de las oxidases de cobre. Como se puede apreciar BLAST realizó inserciones a la secuencia de LMt para obtener el mejor alineamiento posible, es decir, el mejor puntaje; esto se puede apreciar de manera visual por el gran número de identidades (rojo), y similitudes (azul) que dan lugar a un puntaje bajo de expectación al azar ($E = 3^{-31}$). Lo cual muestra la imposibilidad de encontrar probabilísticamente una secuencia no significativa y homóloga a IMt de manera fortuita con el puntaje logrado entre estados secuenciales. La importancia de encontrar una secuencia con un grado de homología alto a IMt nos permite obtener información sobre biológica y física para el futuro modelo de IMt.

```
Query: 213 DLGVFPI SDY YSSA DELVELTYNSGA-----PFS DNVL FNGTAKHPETGEGEYANVTL 266
Sbjct: 111 EDYVITLSDWYHKDAKELYKELLASGKAPTDFPVPDAVLINGKGGFLGNPGASLPTLTV 170
```

```
Query: 267 TPGRRHRLRLIMTSVENHFQVSLVNHTMTI I AMINOÁCIDOSDMVPVNAMTVDSLFLGVG 326
Sbjct: 171 TPGKTYRLRI INVALDDSLNFRIEGHKMTVVEVDGVVYVNPFTVDSLDFPGQRYSVLVTA 180
```

```
Query : 327 SRTPGNYWFNVTFGGGLLCGSRNPYPAMINOÁCIDOSIFHYAGA 363
Sbjct : 181 NQPPGNYWIVASPRFG-LIEAFDNGTAMINOÁCIDOSAILRYSGA 217
```

Figura 3. Fragmento representativo del alineamiento realizado por BLAST para encontrar aquella secuencia consenso con mayor homología a IMt. La primera línea muestra una sección de la secuencia de la proteína con mejor alineamiento de las 1100 censadas. Los aminoácidos de color rojo denotan aminoácidos idénticos entre las dos secuencias, de color azul se presentan los aminoácidos con un alto grado de similitud en tamaño, forma o carga, y por último los aminoácidos de color negro son mutaciones que conllevan un cambio en tamaño, forma o carga. En este alineamiento query se refiere a la secuencia usada para la búsqueda, es decir, IMt y Sbjct a la secuencia más cercana según E de las enzimas oxidases de cobre.

El más alto siempre es el mejor: WebLogo

WebLogo es un programa que está diseñado para facilitar la comprensión de alineamientos múltiples generando secuencias de insignias (letras correspondientes a uno de los 20 aminoácidos), mediante una representación gráfica⁽³¹⁾. Aquí cada columna consiste en el apilamiento de insignias donde un apilado corresponde a una posición en la secuencia primaria y la altura representa el grado de conservación de las aminoácidos. La altura de cada insignia dentro del apilado indica la frecuencia de la conservación relativa para cada uno de los aminoácidos.

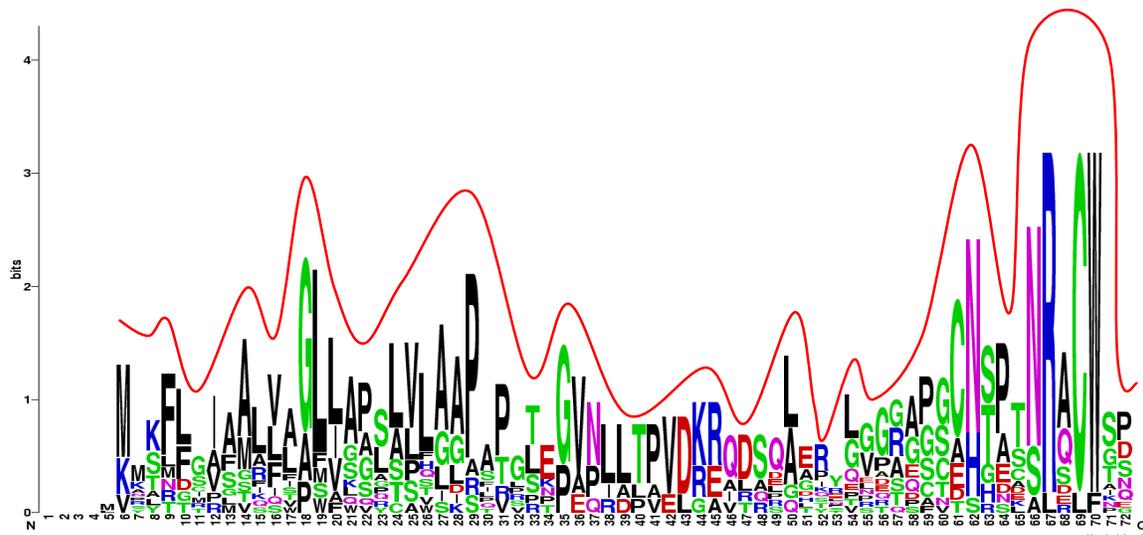


Figura 6. Perfil de conservación para aminoácidos (Residuos del 1 al 72). Las insignias de cada aminoácido pueden ser de color azul y rojo, es decir, cargados eléctricamente de manera positiva o negativa, respectivamente. Adicionalmente, los colores negro, verde y magenta corresponden a residuos hidrofóbicos, pequeños y polares. La línea roja muestra el perfil de conservación sobre el alineamiento múltiple.

Así, la comparación sobre una estructura primaria de la misma clase de proteínas tiene un enorme interés desde el punto de vista funcional y filogenético, es decir, cuanto más alejadas estén las especies analizadas en el árbol filogenético, más diferencias habrá en estructura primaria de proteínas homólogas. Sin embargo, a menudo se encuentra que un mismo aminoácido aparece siempre en una idéntica posición en todas las especies, por lo tanto, estos aminoácidos reciben el nombre de aminoácidos invariantes o aminoácidos conservados, y suelen ser indispensables para la función y estructura correcta de la proteína.

Puede observarse en la figura 6 que en el segmento de aminoácidos que va de la posición 1 a la 31 hay gran cantidad de residuos hidrofóbicos, coloreados de color negro, que tienen propensión a estar ocultos al solvente. La glicina en la posición 18 parece ser fundamental o crítica para la formación de la estructura secundaria de estas proteínas por su alta concurrencia. Las posiciones 31 a 60 parecerían pertenecer a una conformación de cadena irregular ya que las insignias en este intervalo son muy variables. Las insignias de la posición 62, 66, 67, 69 y 70 proporcionan 5 aminoácidos evolutivamente conservados, probablemente fundamentales para la estabilidad o función. Del análisis realizado al péptido se encontró una conservación absoluta de 13 histidinas en las posiciones 93, 95, 138, 140, 431, 434, 436, 502, 504, 508 y un a cisterna en la posición 503.

Une lettre d'identité: prosite

PROSITE es una base de datos que resguarda familias y dominios de proteínas, identifica perfiles, patrones o sitios con significado biológico (motifs) basado en la observación y el agrupamiento de familias de proteínas con semejanza en su secuencia, dicho agrupamiento se da mediante el conocimiento proteínas o dominios de proteínas que pertenecen a una familia que en particular comparten cualidades funcionales, es decir, que provienen de un ancestro común.

Estas regiones (motifs) en su mayoría son arreglos de aminoácidos potenciales para determinar la función o estructura tridimensional de una proteína. Al analizar dichas características para grupos de secuencias similares, es posible derivar una firma o motivo particular de una familia o dominio de la proteína, la cual nos permite distinguir una secuencia en particular de todo el conjunto de secuencias estudiadas, es decir, de la misma manera que una huella digital es generalmente suficiente para identificar a un ser humano, un motivo es característico de una función o estructura.

Siendo así, un conjunto de motifs muestra suficiente para asignar a una proteína, una familia específica, y formular con ésto una hipótesis sobre su función.

En la salida mostrada abajo se presenta los motivos funcionales para la proteína LMt, encontrados por PROSITE. En esta secuencia se indican los probables sitios biológicos con mayor importancia; enmarcado en amarillo y rojo encontramos un sitio de unión para uno de los átomos de cobre.

```
MKSFISAASTLLVGILTPSVAASAPPSTPEQRDLLVPI TEREAAASVKARQQSCNTPSNRACWTDGYDINTDYEV
DSPDTGVVVRPYTLTLTEVDNWTGPDGVVKEKVMLVNNSI IGPTIFADWGD TIQVTVINNLETNGT SIHWHGLHQK
GTNLHDGANGITECPIPPKGGKRVYRFAKQQYGT SWYHSHFSAQYGNVGVGAIQINGPASLPYD TDLGVFPI SDY
YYSSADELVELTYNSGAPFSDNVLFNGTAKHPETGEGEYANVT LTPGRRHRLRLIMTSVENHFQVSLVNHTMTII
AASDMVPVNAMTVDSLFLGVGQRYDVVIEASRTPGNYWFNVTFGGGLLCGGSRNYPYPAASI FHYAGAPGGPPTDE
GKAPVDHNC LDLPNLKPVVARDVPLSGFAKRPDNTLDVTLDTTGTPLFVWKVNGSAINIDWGRPVVDYVLTQNTS
FPPGYNIVEVNGADQWSYWLIENDPGAPFTLPHPHLHGHD FYVLGRSPDESPASNERHVFDPARDAGLLSGANP
VRRDVTMLPAFGWVLAFRADNP GAWLFHCHIAWHVSGGLGVVY LDRADDLRGAVSDADADDLDRLCADWRRYWP
TNPYPKSDSGLKHRWVGGQGLVKA
```



Figura 7. En la parte superior se muestra la secuencia de aminoácidos perteneciente a LMt, en color amarillo se resalta fragmento del motivo estructural para la familia de multicobre-oxidasa. En la parte inferior izquierda se apresia un esquema de la estructura para los motivos del complejo multicobre oxidasa. donde la secuencia de aminoácidos se muestra como un listón y los cuadros de color cobre y verde son una representación esquemática de la localización del motivo funcional para LMt. Del lado inferior derecho se encuentra resaltado el motivo estructural para la familia de multicobre-oxidasa

En la figura 7 se muestra la secuencia completa para la la enzima de LMt así una asignación probable del motivo que correspondería al complejo multicobre oxidasa (color amarillo y verde), es de llamar la atención que estos dos motivos se encuentran traslapados, tal vez como resultado de las fuerzas de interacción entre los cobres que son átomos con orbitales vacíos y los aminoácidos conjuntos a ellos, que en su mayoría son no polares. En la tabla de la parte inferior derecha se da la ubicación exacta, número y tipo de aminoácidos que se encuentran ligados al motivo.

Aptitudes y más: ProtScale.

La salida de ProtScale permite analizar los parámetros fisicoquímicos o estructurales, donde cada una de éstas se representa mediante un perfil, formado de valores promedio aplicados a un pequeño segmento de la secuencia (ventana). Los parámetros usados con mayor frecuencia son: escala de hidrofobicidad y propensión a formar diferentes tipos de estructuras secundarias.

Porcentaje de accesibilidad

Para el gráfico 1-a, se observa en la parte superior las regiones de aquellos residuos que se encuentran expuestos al solvente, donde el porcentaje de accesibilidad es función del propio solvente en el que se encuentre la proteína y en realidad del valor asignado de hidrofobicidad asignado a cada aminoácido. La proposición del grafico 1-a sobre los sitios para los residuos hidrofobicos nos permite pensar que éstos se acumulan en el interior de la estructura, y que en la superficie aparecen diversos grupos con carga eléctrica.

Hidrofobicidad / Kyte & Doolittle

Quizá una de las interacciones que crean más confusión entre quienes desean aprender bioquímica, son las llamadas interacciones hidrofóbicas que en realidad no se basan en la atracción de grupos apolares sino en la exclusión del agua de la interfase con esos grupos. Se aprecia en el gráfico 1-b la disposición de los aminoácidos apolares, apreciándose las secciones con mayor potencial de presentar efecto hidrofóbico, siendo ellas quizás las fuerzas de mayor influencia en la estabilidad de la estructura para la lacasa. En el perfil representado se aprecia que esta enzima tiene extensas regiones sin exposición al solvente, ya que la gráfica se encuentra por debajo de la media, es decir, la mayor parte de los aminoácidos está colocada por debajo del cero en la escala de Kyte & Doolittle lo cual indica que una gran parte de ellos son hidrofóbicos.

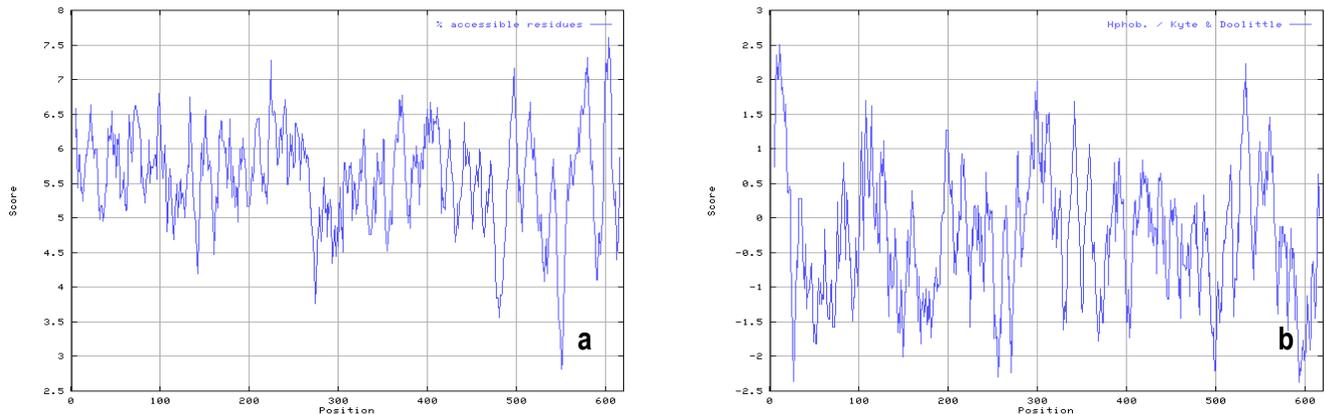


Gráfico 1. Elemento a) perfil del porcentaje de accesibilidad o hidrofobicidad. En él se aprecian los principales aminoácidos cargados, la escala guarda una cierta relación entre carga y exposición, es decir, entre más cargado sea el aminoácido más alto será el puntaje.

Dentro del elemento b) vemos el perfil de hidrofobicidad de Kyte & Doolittle en el que se aprecian los principales aminoácidos no cargados o apolares, la escala se encuentra relacionada con el ocultamiento de los aminoácidos al solvente y la polaridad de estos mismos, es decir, entre más apolar es el aminoácido más bajo será el puntaje

Perfiles de tendencia a formar lámina beta.

El gráfico 2-a muestra la capacidad de algunos aminoácidos de IMt de formar láminas beta. Este perfil muestra que la lacasa posee una gran cantidad de este tipo de estructura secundaria, con un 97%, siendo la asparagina y la glicina los aminoácidos con mayor tendencia a adoptar esta conformación con un puntaje de 1.56. Con este dato la aseveración de que IMt está conformada en gran parte por láminas beta se respalda.

Perfiles de propensión a formar hélice alfa.

En el gráfico 2-b los aminoácidos con una alta afinidad a formar hélices alfa son la metionina con puntaje de 1.45, el de menor afinidad es la prolina con puntaje de 0.57 típico en lacasa, el conjunto de aminoácidos capaces de formar este tipo de estructura secundaria es reducido y ello indica que LMt carece de estructura alfa hélice.

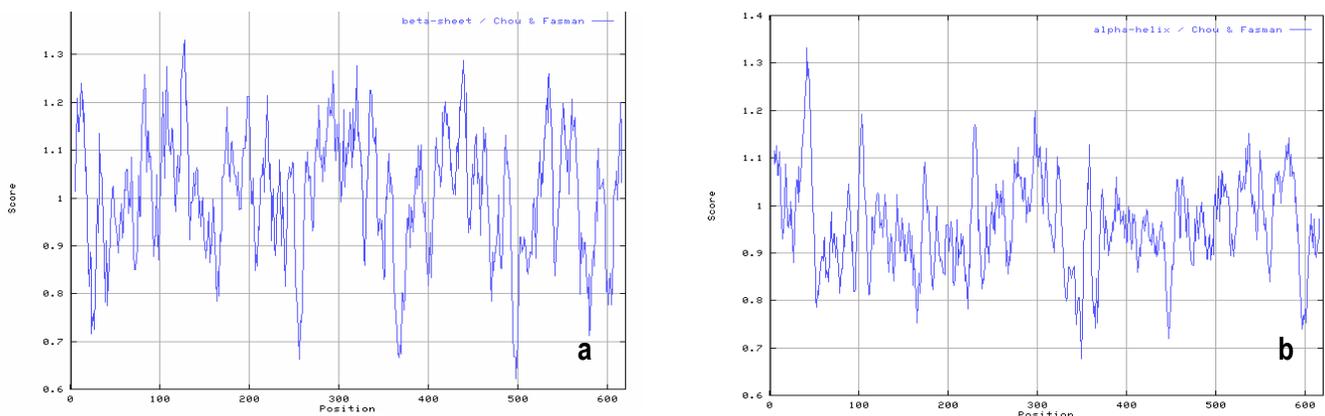


Gráfico 2. Elemento a) perfil de conformación para lámina beta a partir de los datos de Chou & Fasman en él se aprecian las principales secciones, capaces de formar esta estructura secundaria: beta. En el elemento b) observamos el perfil de conformación para hélice alfa de Chou & Fasman, en donde se aprecian las principales secciones, capaces de formar hélices.

Comparación entre parámetros.

En el gráfico 3 se aprecia la paridad entre hidrofobicidad de Kyte & Doolittle y porcentaje de accesibilidad, mientras que en el gráfico 4 se comparan los perfiles de propensión a formar dos tipos de estructura secundaria. Para realizar el gráfico 3 se superpusieron las escalas del perfil de hidrofobicidad y el de exposición al solvente. Dado que estas dos características fisicoquímicas son opuestas, se aprecia el arreglo de aminoácidos el cual pasa de manera regular de hidrofobicidad (cresta) → accesibilidad (valle), es decir, si se construyera una función tal que su dominio fuera la hidrofobicidad de Kyte & Doolittle se hablaría de que la inversa de esta función sería el porcentaje de accesibilidad de los residuos al solvente. En la segunda comparación (gráfico 4) apreciamos el perfil que muestra la tendencia local de la secuencia de aminoácidos para LMT de adoptar estructuras del tipo hojas beta o hélices alfa la acumulación de valores en el centro indica una baja tendencia para adquirir estructura secundaria helicoidal y beta, lo que muy probablemente denotaría que esta proteína tiene secciones que forman estructuras irregulares o de tipo loop. De esta comparación se puede determinar que IMt no es en su totalidad beta o alfa, sino que posee una baja combinación de estas dos estructuras secundarias, con mayor tendencia a formar láminas beta

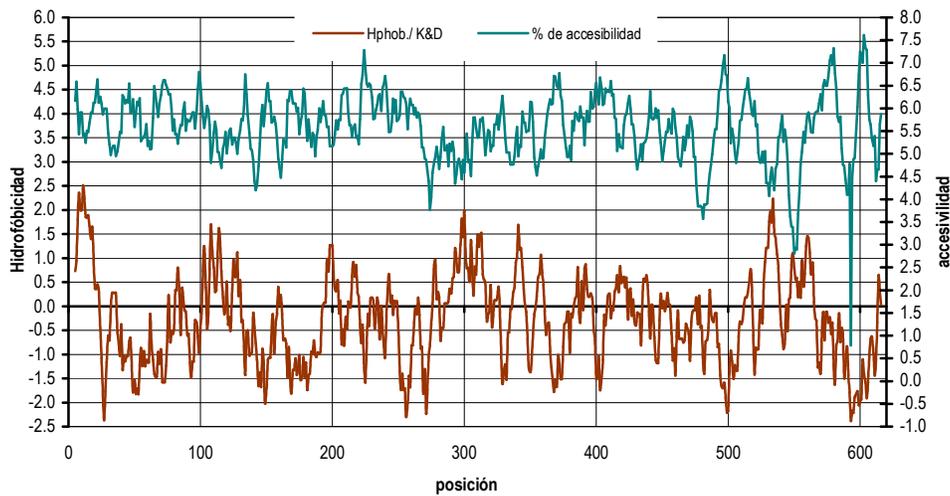


Gráfico 3. Sobreposición de los perfiles de hidrofobicidad y porcentaje de aminoácidos expuestos al solvente.

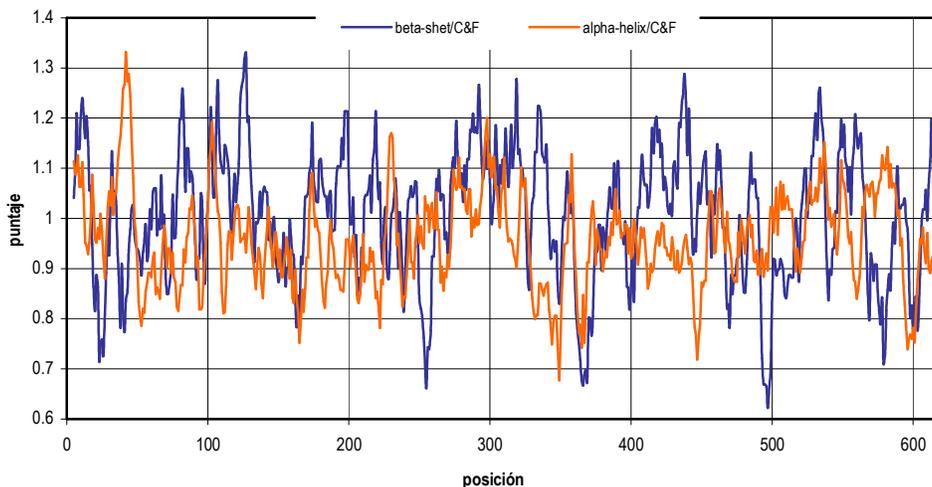


Gráfico 4. Sobreposición de los perfiles para la conformación de estructura secundaria, alfa hélice (---) y laminilla beta (---), apreciándose las secciones de aminoácidos capaces de estructurar laminilla beta (crestas de la función de color azul), en contraposición con las secciones de baja probabilidad de formar hélices alfa (línea de color naranja)

Las graficas 2 a 4 nos permiten definir una idea clara de la conformación espacial para la estructura secundaria de IMt. En conjunto estas graficas nos permiten acercarnos a la conformación desplegada de IMt mediante la ponderación de secciones de nuestra proteína, abriéndonos así un hueco lucido para generar un modelo fiable y seguro de IMt.

La adolescencia: Predict Protein

Químicamente, el esqueleto central de la cadena de aminoácidos es semejante en todas las proteínas y, por tanto, el problema de determinar o de modelar su conformación queda sujeto a determinar el acomodo espacial de cada una de las cadenas laterales para cada aminoácido. Este problema puede abordarse con énfasis si logramos vislumbrar la manera en que un residuo se plisa a sus vecinos cercanos, con lo cual se obtendría una idea de los acomodos locales de todos sus átomos. Por eso, para este análisis nos ocuparemos de como un residuo dado queda orientado respecto a sus vecinos.

Los rangos convencionales para determinar la clase estructural en función del contenido de elementos de estructura secundaria en las proteínas es:

Toda alfa:	%H > 45% y %E < 5%
Toda beta:	%H < 5% y %E > 45%
Alfa combinada con beta:	%H > 30% y %E > 20%
Mixta:	cualquier otra combinación

Donde: %H es el porcentaje de Hélice alfa en la proteína y %E porcentaje de lamina beta

La tabla No. 2 muestra que hay una cantidad pequeña de hélices y un alto contenido de estructura irregular. Con estos resultados puede decirse que IMt es una proteína de clase estructural mixta con gran contenido de hojas beta.

Tabla 2. Porcentaje de estructura secundaria predicha para la lacasa.			
Tipo de estructura	H	E	L
% de estructura	6.13	34.03	59.84

Predicción de globularidad

Una proteína de 620 residuos de aminoácidos, como lo es IMt se considera globular cuando tiene alrededor de 229 residuos expuestos. El número de residuos estimados por Predict Protein como expuestos es de 279, por lo tanto se tienen 47 residuos por encima del mínimo requerido, entonces se le agrupa a IMt como una enzima compacta, es decir, globular.

Más que mejores amigos, aliados

Buscar homólogos en el banco de datos del PDB detectó 13 secuencias que tienen un ancestro común a LMt.

Tabla 3. Secuencias homólogas encontradas en el PDB para IMa.	
1A65	1GSK
1GW0	1GYC
1HFU	1HKZ
1HL0	1HL1
1KYA	1OF0
1OGR	1UVW
1V10	

Con el estudio realizado a la exploración computacional conocimos en profundidad la estructura para la enzima lacasa de *Melanocarpus albomyces*, IMa por sus siglas (1GW0 nombre corto otorgado por la Protein Data Bank, PDB), es esta estructura la que muestra mayor homología con la molécula de LMt, el análisis se realizó con ayuda de la figura 8-a (diagrama de la estructura y otros contactos relevantes de 1GW0).

El análisis en dos dimensiones realizado a IMA se muestra en la figura 8-b, en este se aprecia la secuencia de aminoácidos, estructura secundaria, así como los principales contactos internos que existen en la molécula. La figura 8-c define una porción para la configuración espacial de IMA, este arreglo tridimensional se obtuvo mediante RasMol, aquí se aprecia la configuración secundaria que adopta nuestra proteína.

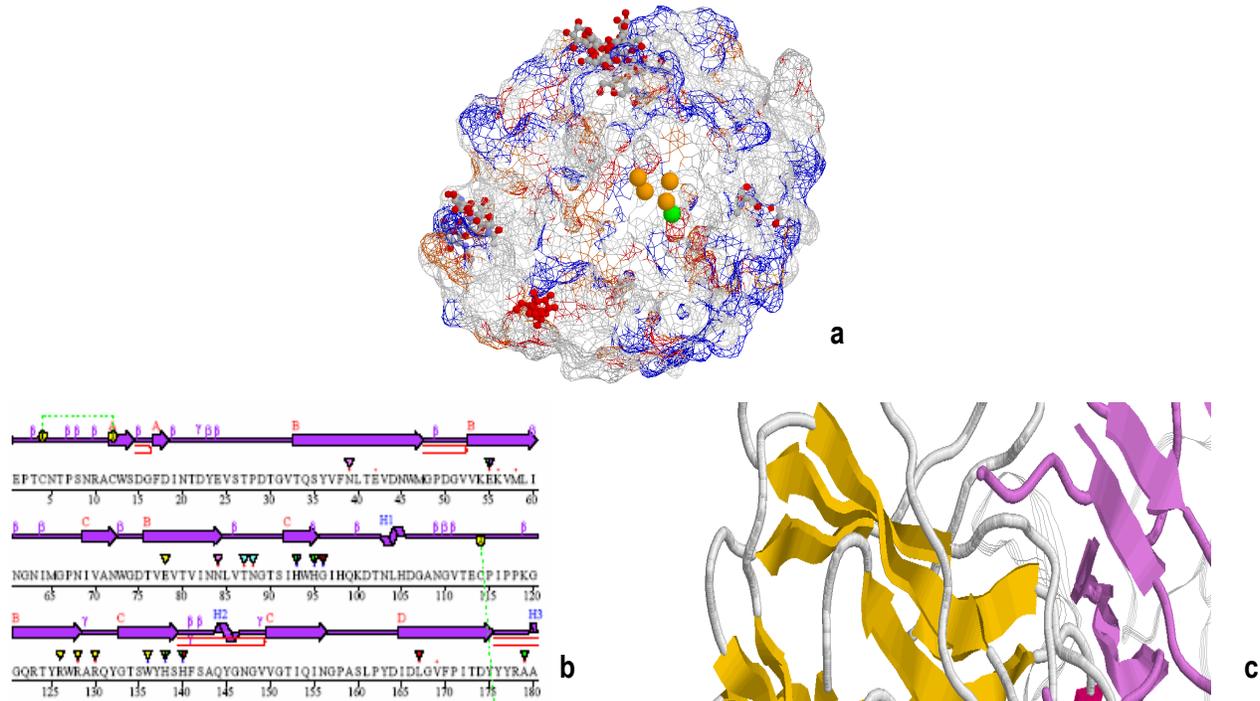


Figura 8. Elemento a) representación esquemática de la geométrica de lacasa 1GW0 obtenida con RasMol. Se aprecia un corte transversal que permite conocer el interior, sin perdemos de vista la parte exterior, así como algunos de sus ligandos. Elemento b) estructura secundaria de 1GW0, obtenida en PDBsum se aprecia: secuencia, número de aminoácidos, conformación de estructura secundaria, marcación de sitios potenciales, puentes disulfuro, entre otros. Dentro del elemento c) en color amarillo, magenta y rosa se presenta un dominio de los tres que dan forma a 1GW0, este dominio se encuentra conformado de 6 hojas beta y una alfa hélice.

El estudio de 1GW0 se complemento al fragmentar la enzima en sus dominios estructurales obtenidos por SCOP⁽²⁹⁾, dicha fragmentación se puede apreciar en la tabla numero 4. La figura 9-a presenta el monómero de IMA y la figura 9-b muestra un monómero en el cual se puede apreciar la definición de los tres dominios citados en la tabla No. 4.

	Dominio 1	Dominio 2	Dominio 3
Secuencia de aminoácidos	1-162	163-343	344-559

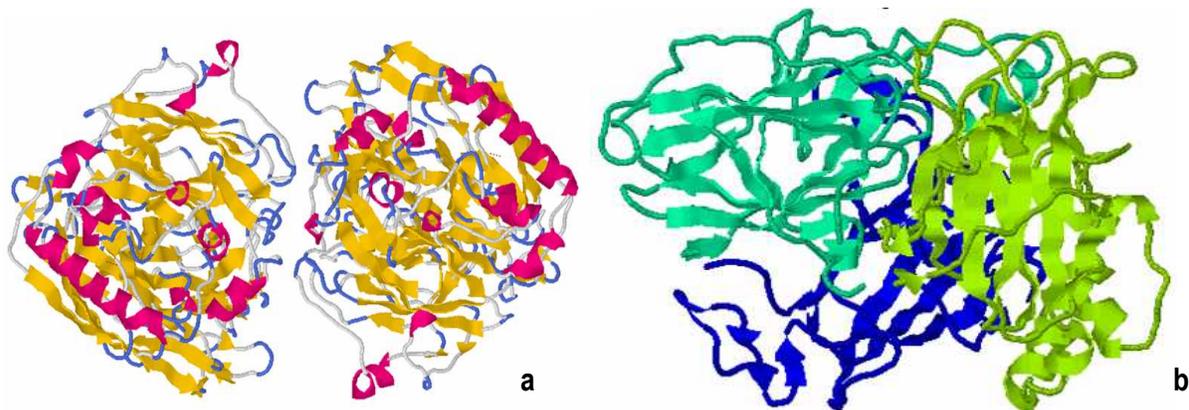


Figura 9. Elemento a) enzima dimerica para la lacasa 1GW0 vista en 3D, los colores muestran el tipo de estructura secundaria: azul loops, gris irregular, mostaza hoja beta y magenta alfa hélice. En el elemento b) se representan los tres dominios para el monómero α (Cadena A) de la enzima 1GW0, cada color simboliza un dominio distinto

Estos dominios son similares en su forma de plegarse, cada dominio se encuentra formado por lo menos de seis hojas beta y tres o cuatro hélices alfa pequeñas, con una excepción en el dominio tres, que contiene una hélice de 25 aminoácidos. Cada una de estas tres secciones se pliega formando un tipo sandwich entre sus seis hojas beta, donde se puede apreciar que una hoja es antiparalela a la otra.

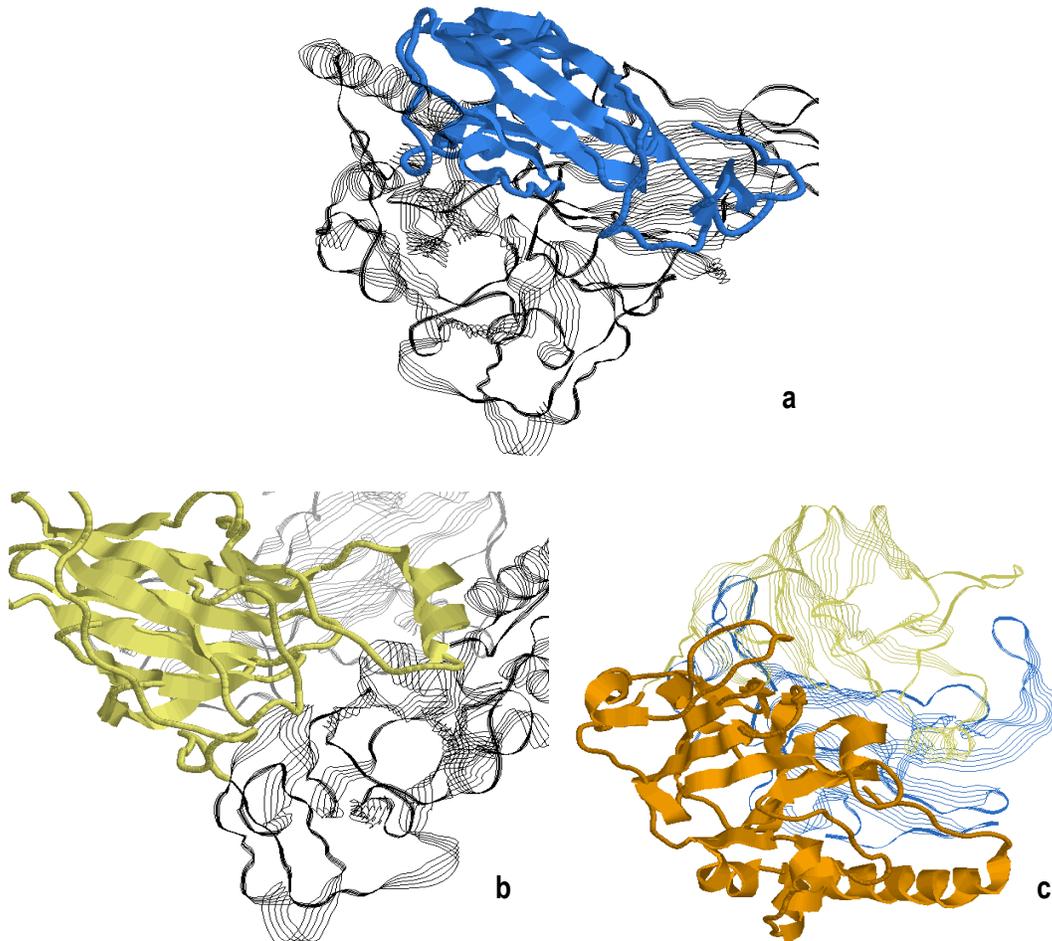


Figura 10. Vista del monómero α de la enzima lacasa de 1GW0. En a) de color azul se presenta el dominio 1: aminoácido 1 al 162 (162 aminoácidos). Dentro del elemento b) en color oro se observa el dominio 2: aminoácidos: 163-343 (181 aminoácidos). Para c) se observa en color naranja los aminoácidos 344-559 (216 aminoácidos) correspondientes al tercer dominio.

Su energía y el yo interno

Una vez determinados los bloques mediante los cuales se estructura IMA y la interfaz entre sus monómeros, se procedió a determinar la energía de ensamblaje para esta conformación, así como de su región interfacial.

La correlación de energía existente en la interfaz Dominio-Dominio de cada uno de los monómeros fue medida mediante un barrido *in silico* de alaninas en Robetta^(6, 25, 28). En este barrido se determinaron aquellos aminoácidos que contribuyen a la asociación entre dominios, es decir, se encontraron los aminoácidos que estabilizan el complejo. Para realizar una correcta clasificación de estos aminoácidos se realizó un estudio con cuatro barridos de estas alaninas quedando las regiones interfaciales como continuación se muestran:

- ✓ Monómero-Monómero (Cadena A vs Cadena B)
- ✓ Dominio 1 vs resto de la enzima
- ✓ Dominio 2 vs resto de la enzima
- ✓ Dominio 3 vs resto de la enzima

La tabla numero cinco muestra la energía de interfacial así como el número de aminoácido que interviene en dicha interacción par cada barrido hecho sobre la enzima de LMa. La frase resto de la enzima indexa el conjunto que se encuentra constituido por uno de los dos monómero del dímero, más los dos dominios restantes del segundo monómero. Dentro de esta tabla se resalta que la interacción mas fuerte se encuentra dada por el barrido numero 1, Dominio1 vs resto de la enzima.

Barrido	$\Sigma\Delta\Delta G$	Aminoácidos en contacto
	kcal/mol	Número
Monómero-Monómero	11.82	22
Dominio 1 vs resto de la enzima	147.25	148
Dominio 2 vs resto de la enzima	77.02	72
Dominio 3 vs resto de la enzima	83.91	93

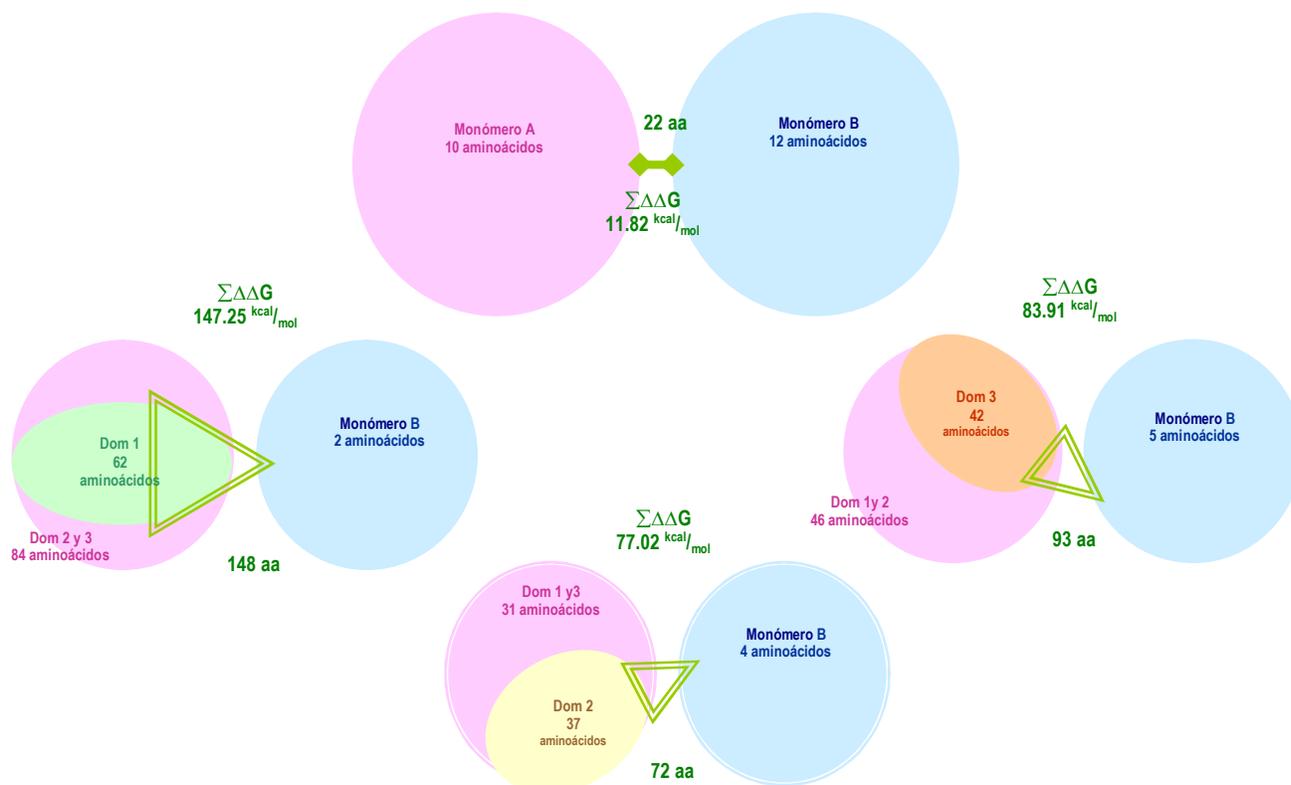


Figura 11. Resultado del barrido de alaninas, aquí se muestran las diferencias energéticas entre cada barrido. La imagen anterior muestra en número los aminoácidos que estabilizan y desestabilizan la interfaz entre dominios y monómeros, estos resultados son importantes ya que determinan los sitios potenciales para realizar cambios estructurales a la enzima, de igual manera en esta imagen se aprecia la contribución energética total del barrido *in silico* de alaninas.

Al comparar la suma de $\Delta\Delta G$ (total de energía libre) entre conglomerados se precisa que la estabilidad entre dominios sea mayor en comparación con la resultante entre monómeros, mostrándose así de igual manera el complejo más estable: Dominio1 vs resto de la enzima. Para obtener un mejor análisis se determinaron los aminoácidos que tuvieron variaciones importantes en su $\Delta\Delta G$, regresando a reanalizar el alineamiento múltiple construido con las 1100 secuencias homólogas reportadas en las bases de datos, determinando ahora aquellos aminoácidos invariantes que estuvieran contenidos en el conjunto mostrado por la figura 11 y además que poseyeran variaciones significativas en su $\Delta\Delta G$. Con el resultado obtenido por el nuevo análisis encontramos escasos aminoácidos invariantes a lo largo de la evolución para la interfaz monómero-monómero, con lo cual se puede decir que es reducido el número de aminoácidos conservados capaces de resguardar la estabilidad entre una y otra interfaz.

La varianza o conservación evolutiva de los aminoácidos con mayor importancia para nuestro estudio se puede apreciar en la tabla 6, en esta tabla se incluyen aquellos aminoácidos con una mediana % total conservación.

Tabla 6. Aminoácidos con $\Delta\Delta G$ alto que se han conservado a lo largo de la evolución.

Dominio 2-Resto de la enzima				Dominio 1-Resto de la enzima			
# pdb	Dominio	Cod	Conservación	# pdb	Dominio	Cod	Conservación
163	Dom 2	TYR	Media	23	Dom 1	TYR	Media
228	Dom 2	ARG	Alta	50	Dom 1	ASP	Media
272	Dom 2	ARG	Media	95	Dom 1	HIS	Alta
50	Dom 1	ASP	Media	106	Dom 1	ASP	Alta
134	Dom 1	THR	Media	131	Dom 1	GLN	Media
136	Dom 1	TRP	Media	134	Dom 1	THR	Media
				136	Dom 1	TRP	Media
Dominio3-Resto de la enzima				145	Dom 1	TYR	Media
# pdb	Dominio	Cod	Conservación	163	Dom 2	TYR	Media
436	Dom 3	HIS	Alta	228	Dom 2	ARG	Alta
504	Dom 3	HIS	Alta	272	Dom 2	ARG	Media
507	Dom 3	TRP	Alta	436	Dom 3	HIS	Alta
106	Dom 1	ASP	Alta	475	Dom 3	ARG	Alta
113	Dom 1	GLU	Media	504	Dom 3	HIS	Alta
140	Dom 1	HIS	Alta				

Del análisis correspondiente a la tabla 6 se desprenden una serie de aseveraciones como son: sería equivocado una modificación de alguno de los aminoácidos mostrados por la tabla 6 ya que los aminoácidos contenidos en esta tabla representan conservaciones importantes en la evolución de IMA y de igual manera sería acertado realizar cambios o modificaciones de cualquier aminoácido que no se encuentre en esta lista, es decir, que tengan una conservación baja o nula, para ser anclados *in machina* de manera más eficaz a sus vecinos, donde la hipótesis de unir con mayor energía estos aminoácidos, daría como resultado una mejor resistencia estructural de los fragmentos (dominios), la cual reflejaría una mayor estabilidad para 1GW0. Cumpliéndose así nuestro principal objetivo.

Las conservaciones mostradas en la figura 17 arrojan que el sitio activo (ver anexos) es un invariante evolutivo y que una fracción de éste es un poderoso estabilizante intrafacial como se aprecia en la tabla 5. En particular las histidinas 434, 436 y 504 así como la asparagina 477 y 106.

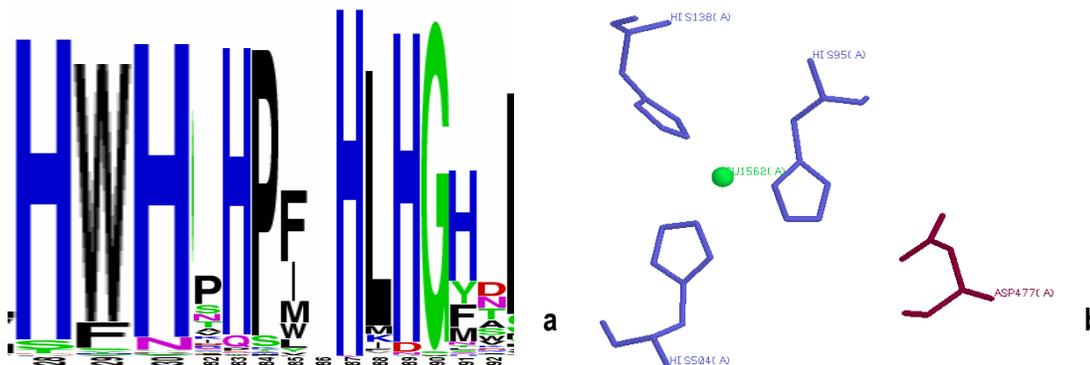


Figura 12. Elemento a) fragmento del alineamiento y conservación de las histidinas 95 y 504 (con número 300 y 1089 respectivamente, esta doble numeración se debe a las inserciones realizadas al momento de realizar el alineamiento múltiple). En b) se aprecia una sección del sitio activo. En este se pueden ver las histidinas conservadas en la figura A.

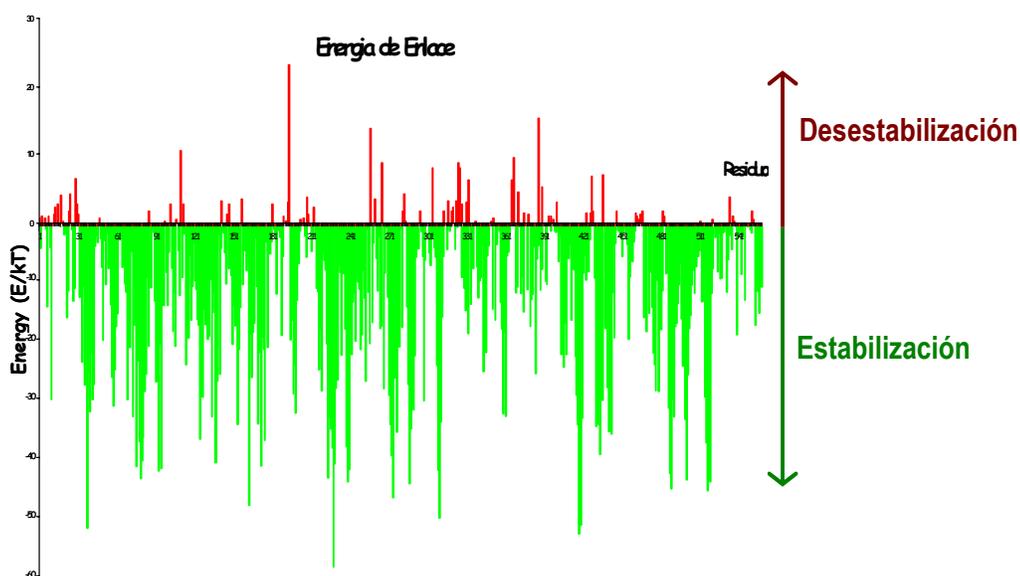
Al comprender la importancia de este análisis se buscó la integración de nuevos resultados a los ya obtenidos hasta éste momento, esta búsqueda requirió el uso de una nueva herramienta computacional: Anolea⁽³⁶⁾. Esta nueva incorporación resultó de la idea de corroborar los datos obtenidos, así como de refinar y encontrar los aminoácidos variables a lo largo de la evolución con importancia sobre la estabilidad de 1GW0.

Interacciones en el núcleo de mi corazón

Al utilizar Anolea, algoritmo computacional que permite calcular estabilidad energética entre aminoácidos vecinos (ver anexos), nos permite corroborar el análisis realizado en la sección anterior. En dicho análisis sólo se consideró la interacción entre la proteína y solvente, con la finalidad de obtener una lista de aminoácidos energéticamente inestables, la cual posteriormente fue analizada de manera gráfica. En la tabla 7 se presenta la fracción con mayor relevancia. Para la tabla 7 se define un aminoácido con energía mayor a cero como un aminoácido inestable, y con energía menor de cero como un aminoácido estabilizante de la estructura.

Tabla 7 Aminoácidos con mayor relevancia para la conservación estructural según Anolea		
pdb#.	Tipo de residuo	Energía (E_{KT})
38	PHE	-51,885
110	GLY	10,526
163	TYR	-47,994
194	PHE	23,271
228	ARG	-58,438
257	VAL	13,945
310	PHE	-50,189
387	PRO	15,335
418	LEU	-52,856
489	LEU	-45,286
517	PHE	-45,542

Como una consecuencia de la tabla anterior se puede generar un gráfico que muestre el perfil acorde a la estabilidad de cada aminoácido; en otras palabras, las interacciones netas favorables o desfavorables de cada residuo.



Gráfica 5. Perfil de energía para la interacción aminoácido-resto de la enzima obtenido en Anolea, donde el área de color rojo representa los aminoácidos con energías más altas o desestabilizantes y el área verde de color aminoácidos con capacidad para estabilizar la estructura de 1GW0. Donde E_{KT} representa a la energía en unidades de KT ($1 \text{ KT} = 0.6 \text{ kcal/mol}$ a 300°C)

Al determinar el tipo aminoácido que ejerce una energía desestabilizante sobre aquel que se encuentra cerca de su vecindad se consiguió discernir al único aminoácido con relación sobre los dos modelos energéticos: *fenilalanina 194*. Una vez encontrado este aminoácido, se analizó su energía de interacción en los dos modelos y a manera de resumen se presenta este en la tabla 8:

Tabla 8. Relación energética para el único aminoácido encontrado en de tratamiento de la información energética.

$\Delta\Delta G$ es la energía de interfaz y E_{kT} de estabilidad para la cadena primaria.

pdb#	cadena	int_id	Cod.	$\Delta\Delta G(\text{complejo})$	Energía (E_{kT})	Conservación
194	A	1	PHE	2,25	23,271	Ninguna

Redundando los análisis realizados hasta el momento y conjuntando la información que se aprecia en la tabla 8 podemos realizar la hipótesis de que el aminoácido *Fenilalanina 194* es un aminoácido que ha sido cambiado evolutivamente para la lacasa de *Melanocarpus albomyces*. Nuestra hipótesis puede verse sustentada en los resultados arrojados al revisar el alineamiento múltiple para todas las fenol-oxidasas (figura 5), ya que no se encontró conservación alguna de éste en dicho alineamiento. Otro resultado relevante que hemos podido extraer de los dos últimos cálculos realizados en Robetta y Asolea, implica el soporte que ejerce el aminoácido *Fenilalanina 194* en la estabilidad del dímero encontrándose en la cara interfacial para el monómero–monómero. Éste aminoácido presenta energías positivas en los dos cálculos, lo cual implica una interacción favorable entre subunidades; en pocas palabras podemos asumir que el perfeccionamiento hereditario a favorecido la estabilidad global e integral para la enzima de IMA.

Desnuda y frente al espejo

Una vez explorada y analizada la energética de 1GW0, habría que completar el análisis concerniente a la cartografía de la enzima. ¿Cómo? buscando homología interna, es decir, encontrar semejanza entre las secciones de aminoácidos conformantes de los tres dominios; auxiliándonos de algunas herramientas computacionales como son: Radar⁽³³⁾, Dotlet⁽³⁴⁾ o ClustalW. Al estudiar los resultados obtenidos de cada uno de los tres diferentes servidores se obtuvieron los siguientes resultados. La finalidad de encontrar secciones con repetibilidad interna nos permitirían diseñar mejor el modelo de la enzima IMt, ya que encontrar secciones internas repetidas a lo largo de la secuencia de aminoácidos revelaría que IMt se puede diseñar partiendo de una molécula pequeña, como sería un dominio de IMA.

El primer análisis para la homología interna se realizó en Radar, para éste la proteína se fragmenta en sus dominios estructurales con la finalidad de realizar un alineamiento entre éstos. Dentro de la salida de Radar se observó el siguiente patrón:

```

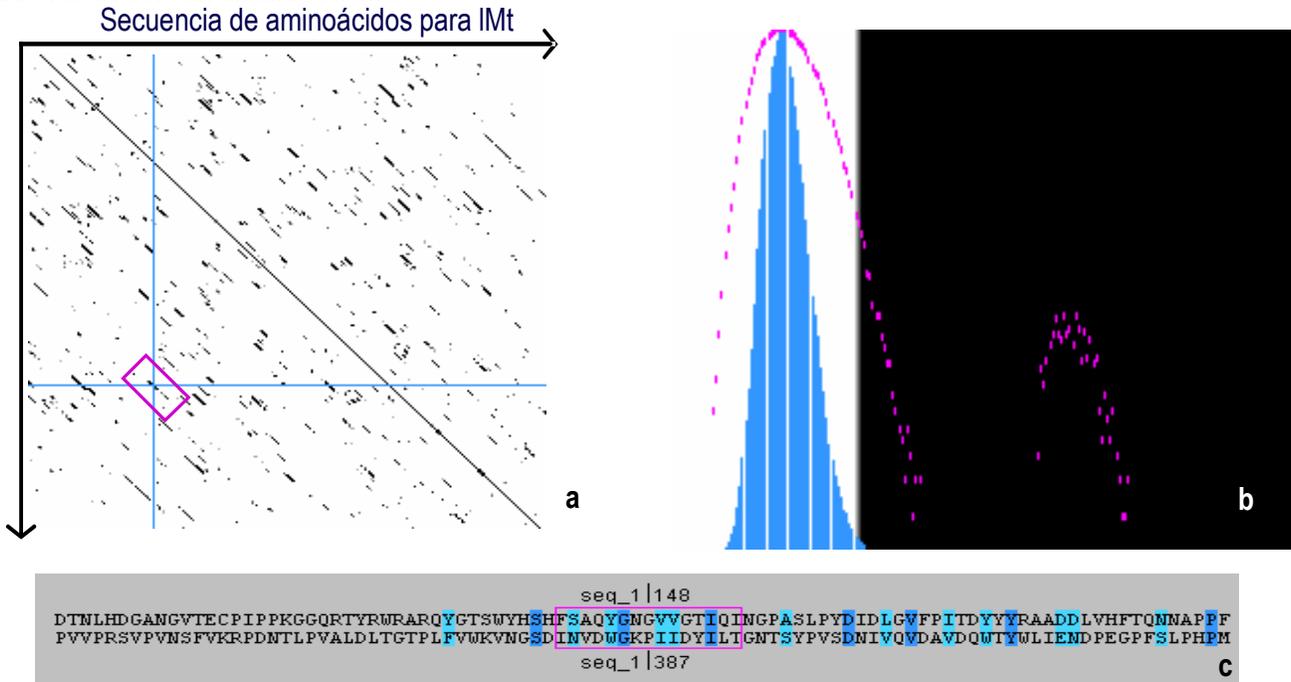
YWFNVTFGGQAACGGSLNPFPAAI-----FHYAGAPGGLPTDEG-----TPPVD-----
YWL---IENDPEGPFSL.PFPMHLHGHDFLVLGRSPDVPAASQQRVFDPAVD-----LARLNGDNPPRRDTTML
GWLLLAFF--RTDNPGAWLFFCHIA----WHVS---GGLSVDFL-----ERPADLRQRISQEDEDDFNRCDEWRA

```

En el anterior alineamiento se presentan en orden descendente las tres secciones de aminoácidos para los tres dominios estructurales, dicho alineamiento se interpreta de manera sencilla y rápida ya que éste se encuentra falto de similitud para las tres secciones de aminoácidos. Con lo anterior se puede decir al momento que carecemos de evidencia suficiente para desarrollar un modelo para IMt partiendo de una solo dominio, ya que el alineamiento muestra un exceso de inserciones y escasez de residuos conservados entre dominios, por ejemplo los aminoácidos marcados en colores, son aminoácidos base o ancla para desplegar alineamiento, siendo estos a su vez los únicos aminoácidos con una alta conservación entre los tres dominios.

En segundo lugar graficamos la secuencia de IMA contra ella misma en Dotlet con la finalidad de obtener un grado de similitud interno el cual nos permitiera discernir las secciones internas de aminoácidos que guardan homología entre sí. El gráfico de semejanza obtenido en Dotlet se aprecia en la grafica 6; en el cual líneas gruesa, alargadas y visibles paralelas y alegadas a la línea que parte el gráfico en dos indicaría homología entre segmentos internos, como se observa en la correspondencia existente entre el grafico 6 - a y 6 - b encerrada en color magenta.

Traducido a lo que se pretende encontrar, serian similitudes que nos llevarían a confirmar una evolución convergente entre dominios estructurales, con lo cual se podría afirmar la idea de generar un modelo para IMt partiendo de solo un dominio de IMA



Gráfica 6. Dentro del elemento a) prestamos pequeñas manchas que muestran los lugares donde coinciden segmentos de aminoácidos para una misma cadena o proteína. Los dos ejes representan en toda su extensión a la cadena principal de aminoácidos para IMA, donde la línea de color gris a 45° representa la confrontación de un aminoácido contra el mismo a lo largo de la proteína. Las pequeñas líneas que se aprecian con pendiente negativa en la gráfica muestran la reducida semejanza interna con la que cuenta IMA, b) Muestra la dispersión más probable. Este gráfico se compone de dos campanas, la de mayor altitud representa a todas aquellas singularidades entre una misma proteína, y la más pequeña, la probabilidad de aminoácidos para existir en el mismo lugar y en la misma cadena, c) Fragmento del alineamiento que forma el perfil de la elemento a, la región en cerrada en color magenta se encuentra representada en el cruce de ejes secundarios en color azul de la elemento a. Conjuntamente esta grafica representa la similitud que existe de manera interna para la enzima IMA (1GW0). La línea encerrada en color magenta en la elemento a es el empalme correspondiente a la sección del alineamiento mostrado en la elemento c.

Por último con el alineamiento múltiple realizado en ClustalW, mostrado en la parte baja se determinará el grado de identidad interna con la que cuenta la enzima IMt, donde: un punto (.) indica una conservación baja, dos puntos (:) expresan conservación media o similitud y un asterisco (*) es una conservación del aminoácido indicado. Éste alineamiento se conforma por el empalme de los tres dominios estructurales de IMt.

Dominio 1	-----EPTCNTPSN-----RACWSGDGFDINTDYEVSTPDTGVTQSYVFNLTE	42
Dominio 3	RSVPVNSFVKRPDNTLPVALDLTGTPLFVWKVNGSDINVDWGKPIIDYILITGNTSYPVS-	59
Dominio 2	--YDIDLGVFPITD-----YYYRAADDLVHFTQNNAPPFSDNVLINGTAVNPNT	47
	: : : : . : . *	
Dominio 1	VDNWMG---PDGVVKEKVMLINGNIMGNIVAN----WGDTVEVTVINNLTNGTSIHWH	95
Dominio 3	-DNIVQ---VDAVDQWTYWLIENDPEGPFSLPHPMHLHGDFLVLGRSPDVPAASQQRQFV	115
Dominio 2	GEGQYANVTLTTPGKRHRLRILNTSTENHFQVSLVN--HTMTVIAASDMVFNAMTVDSLFL	105
	: . : : : :	
Dominio 1	GIHQKDTNLHDGANG-VTECPIPPKGGQRTYRWRARQYGTSWYHSHFSAQYGNQVVGVTIQ	154
Dominio 3	FDPAVDLARLNGDNPPRRDITMLPAGGWLLLLAFRTDNPAGAWLFHCHIAWHVSGGLS-VDF	174
Dominio 2	AVGQRYDVVIDASRAPDNYWFNVTFGGQAACGGSLNPHPAAIIFYAGAPGGLPTDEGTPP	165
	: . . . ** : : * : .	
Dominio 1	INGPASLP-----	162
Dominio 3	LERPADLRQRISQEDDDFNRCDEWRAYWPTNPYPKIDSGL	216
Dominio 2	VDHQCLDTLDVRPVVP-----	181
	: : .	

Una vez sabiendo que cierto número de aminoácidos se encontraban conservados, se especuló si éstos tienen importancia conformacional, es decir, que formaban estructuras secundarias idénticas en una misma zona, pero en dominios diferentes. Al momento de analizar la estructura secundaria (figura del PDBsum, ver Anexos) la respuesta fue contraria a lo supuesto ya que los aminoácidos conservados de mayor importancia como I, D, H no se encontraban formando la supuesta estructura equivalente, expresando así claramente que no hay semejanzas ni conservaciones, intraestructurales ya que cualquier identidad se puede promulgar como casual y no relacionadas a la estructura.

La ruptura: cuerpo, mente y alma

La muestra cristalográfica para IMA depositada en el PDB se encuentra constituida por dos subunidades (dímero), donde cada monómero se encuentra compuesto de tres dominios con plegamiento similar tipo beta sándwich. Es de primordial importancia decir que la forma activa biológicamente para IMA es como monómero y no como un acoplamiento de éstos (interrelación dimerica como se mostró en las figuras 9 y 10). Dicho resultado fue proporcionado por el Dr. Andrés Hernández Arana el cual al realizar experimentos de actividad sobre IMA encontró que los 68 KDa de peso molecular obtenidos para IMA soportaban de manera exacta sus 620 aminoácidos.

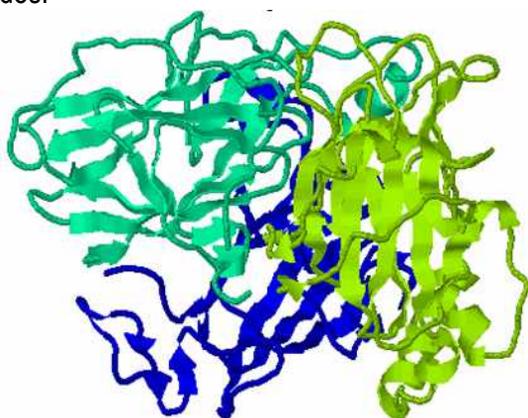


Figura 13. Nueva visualización de IMA en la cual se aprecia el monómero biológicamente activo de IMA (1GW0). En tres colores distintos se presentan los dominios estructurales de IMA. En color azul se presenta el dominio 1 constituido de 162 aminoácidos, en color verde -agua el dominio 2 de 180 aminoácidos y por último de color olivá el tercer dominio estructurado por 215 aminoácidos. La fragmentación hecha con anterioridad en SCOP y presentada en las figuras 9 y 10 para la proteína dimerica se decidió conservar ya que la partición de dominios estructurales no afecta la actividad biológica de IMA

Una vez acoplado el resultado del Dr. Arana a nuestra investigación decidimos realizar nuevamente la búsqueda de aminoácidos estructuralmente claves para las interacciones dominio-dominio. Reiterando de nuevo la conformación de los bloques de la interfaz entre dominios, se procedió a determinar las energías de interacción para el ensamblaje de éstos en IMA. La correlación de energías entre la interfaz para dominios fue medida mediante un barrido *in silico* de alaninas en Robetta como se realizó con la estructura dimerica inactiva de IMA. Del barrido para la interfaz de cada dominio se determinaron aquellos aminoácidos con mayor contribución a la asociación entre dominios, la fragmentación de las diferentes regiones interfaciales se realizó como se presenta en el cuadro mostrado a continuación, exceptuando la sección Monómero-Monómero por las razones antes mencionadas:

- ✓ Dominio 1 vs resto de la enzima
- ✓ Dominio 2 vs resto de la enzima
- ✓ Dominio 3 vs resto de la enzima

En la tabla 9 se muestran las energías interfaciales obtenidas del escaneo *in silico* de alaninas para la enzima funcional de IMA.

Tabla 9. Muestra la energía de asociación al estudiar la interfaz de un dominio en contacto con la enzima.		
Interfaz	Num de aminoácidos	$\sum \Delta \Delta G_{\text{Interfacial}}$
Dominio 1 vs resto de la enzima	133	191.62
Dominio 2 vs resto de la enzima	115	192.54
Dominio 3 vs resto de la enzima	120	162.93

La figura 14 representa relativamente el escaneo de alaninas efectuado por Robetta, en esta figura se aprecian el número de aminoácidos así como la energía total de asociación para cada barrido.

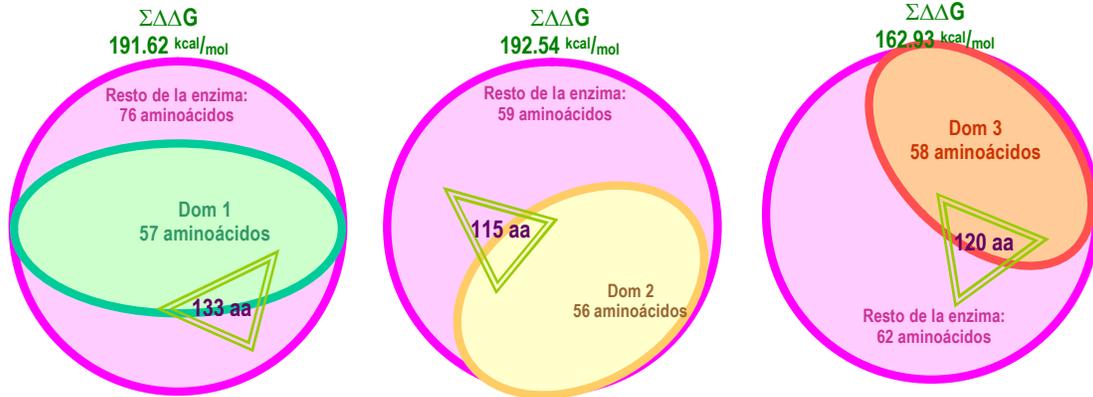


Figura 14. Muestra la interacción energética y el número de aminoácidos que forman cada interfaz para cada barrido. En color magenta se encuentra representada la enzima de LMa, en colores verde café y naranja respectivamente los dominios de esta enzima.

Al comparar la suma de $\Delta\Delta G$ (energía libre total) entre conglomerados se precisa que la estabilidad entre dominios uno y dos es semejante y ligeramente menor la correspondiente al dominio 3, por lo tanto éste es el dominio con menor contribución energética para la estabilidad de LMa. Después de estudiar las interacciones existentes en la interfaz dominio-dominio y la energía de adherencia entre éstas, habría que realizar un mapeo de la superficie proteica para encontrar aminoácidos en dominios vecinos que muestren un potencial energético negativo a la asociación entre dominios y conjuntamente puedan ser permutados estableciendo una nueva interacción iónica. Bajo los puntos anteriormente platicados tomaremos como metodología para aumentar la resistencia estructural el modificar estructuralmente a la proteína problema.

Primero mediante la generación de nuevas interacciones iónicas (puente salino) generadas en la superficie proteica mediante la sustitución *in silico* de cadenas laterales, esto en el estado plegado, las cuales repercutirán estabilizando la estructura nativa de la proteína e incrementando el pozo termodinámico de dicho estado. Segundo, al disminuir la movilidad de la cadena principal mediante el intercambio de cadenas laterales de glicina por aminoácidos con cadenas lateral que disminuyan los grados de libertad o movilidad del estado desplegado de la proteína, teniendo sumo cuidado en conservar la prolinas ya existentes, con éste se espera desestabilizar el estado desplegado, abatiendo la barrera termodinámica que se presenta entre los estados desplegado (D) y nativo (N). Dentro de la búsqueda de pares iónicos, obtuvimos de la observación realizada sobre la superficie protéica, (figura 15) se tomó una serie de pares iónicos con potencial de formar un puente salino interdominio al ser mutados.

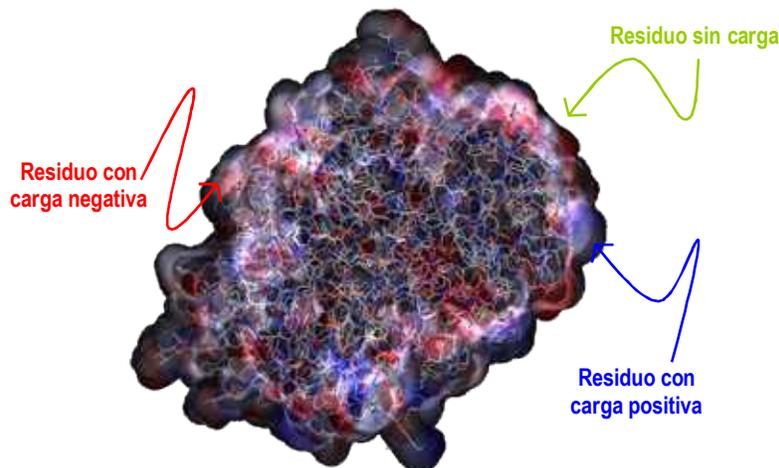
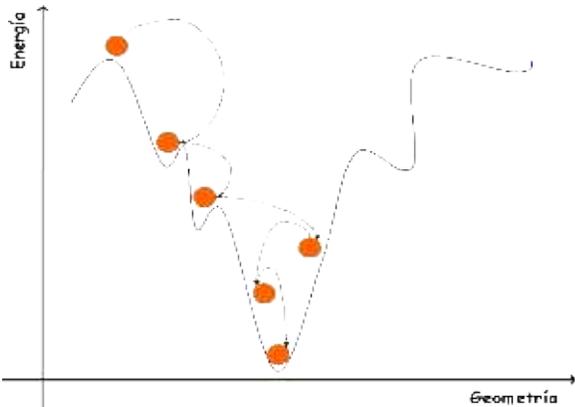


Figura 15. En la cual se aprecia la superficie de la proteína modelo de LMa. Las secciones en azules son residuos cargados positivamente, en rojo aquellos con cargas negativas y en blanco se representa el conjunto de residuos sin carga o neutros.

Los aminoácidos seleccionados susceptibles de ser mutado de manera *in silico* por un aminoácido cargado y formar un puente salino fueron: Ácido aspártico 181, ácido aspártico 494, asparagina 495, triptofano 547 y prolina 551. Las mutaciones de estos aminoácidos se realizaron con HyperChem, herramienta computacional capaz de realizar mutaciones de manera *in silico* y de encontrar el mínimo de energía mediante mecánica molecular y campos de fuerzas.



Gráfica 7. Muestra cómo una proteína es dirigida a su mínimo de energía debido a la pendiente: la fuerza

$$E_{(x,y,z)} = \sum_{\text{distancia}} w(l_i - l_0)^2 + \sum_{\text{ángulo}} t(\theta_i - \theta_0)^2 + \sum_{\text{diedro}} k(1 + \cos(n\omega - \gamma)) + \sum_{i=1}^N s \left[\left(\frac{\sigma_i}{r_i} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_i}{r_i} \right)^6 \right] + \sum_{j=1}^N \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}}$$

Ecuación 1. Función de energía potencial donde se muestra la dependencia a: la elongación de los enlaces covalentes ya sea C-C, C-H, N-H o C-N, distorsión de ángulos sencillos, la torsión de ángulos diedros, y de interacciones no enlazadas como son Vander Waals y Culombicas.

El gráfico 7 ejemplifica de manera esquemática el perfil de energía creado por la función de potencial descrita en la ecuación 1 que sufriría IMA al ser tratada con HyperChem, esta función de potencial actúa calculando el mejor arreglo tridimensional para una proteína dirigiéndola hacia su mínimo energético. La suma de interacciones descritas por la ecuación 1 representan un punto en el gráfico 10, y donde cada uno de estos punto constituye miles de cálculos, tantos como átomos tenga una proteína, donde las fuerzas que pueden medirse por átomo son una función su posición en el espacio y la disminución de la energía representa un acercamiento a la conformación espacial óptima de una proteína. Las mutaciones se realizaron mediante sistematización de la mecánica molecular, utilizando el campo de fuerzas descrito como AMBER contenido en HyperChem, algoritmo matemático capaz de calcular la energía puntual de una mutación, así como de una molécula completa.

Para ser la mejor: la alternancia

Para corroborar el método *in silico* se montó la técnica sobre dos proteínas, una β -glucosidasa nativa y otra β -glucosidasa con un puente salino construido a base de evolución dirigida de manera *in vitro* por Julio Polaina^(1,10).

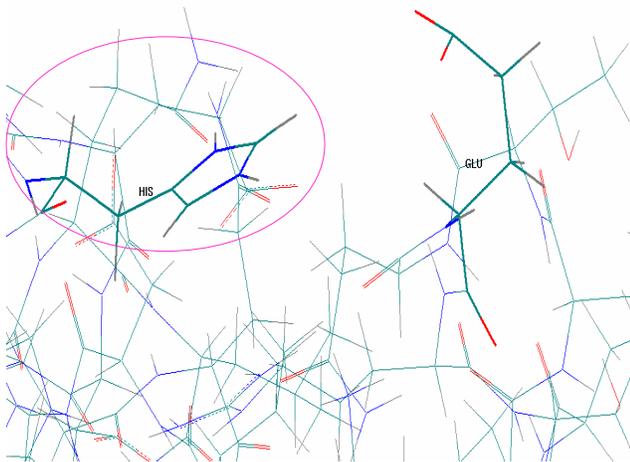


Figura 16. Enzima β -glucosidasa nativa. Se muestra la sección de la enzima en la cual se encuentra el aminoácido original, la histidina 62. El cálculo de energía para la enzima β -glucosidasa nativa permite calcular un valor de -4718 Kcal/mol .

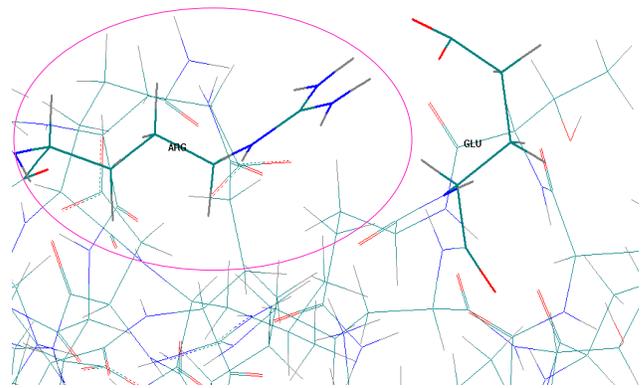


Figura 17. Enzima β -glucosidasa mutada mediante la técnica de evolución dirigida realizada por Julio Polaina permutando la histidiana 62 por arginina 62. Obteniendo un contacto iónico entre esta mutación y un ácido glutámico cercano en el espacio. La energía computada para la enzima β -glucosidasa mutada siguiendo el protocolo de Julio Polaina de manera *in silico* es de -4832 Kcal/mol .

La mutación realizada en el trabajo de Juan Polaina (figura 16 y17) que obtuvo una diferencia en la energía de 114 kcal/mol favoreciendo la enzima mutada, fue considerada la mutación con mayor eficacia, ya que gracias a ésta la enzima β -glucosidasa trabajada por el Dr. Polaina registro un aumento en t_m de aproximadamente 10.9 min en comparación con la enzima nativa a una temperatura de 55°C . Siendo así este un método valido para los fines que se desean alcanzar.

El resultado de nuestras mutaciones puntuales realizadas de manera *in silico* a IMa se encuentran registradas en la tabla 10.

Mutación	<i>pro551his</i>	<i>pro551 (LMa Nativa)</i>	<i>asp494glu</i>	<i>asn495glu</i>	<i>asp181glu</i>	<i>trp547asp</i>	<i>pro551glu</i>
Energía kcal/mol	-9709	-9738	-9767	-9780	-9781	-9795	-9826
Contacto Numero de residuo	lys119	-lys119	lys 56	lys 100	lys 100	lys 119	lys 119

En la tabla arriba mostrada, se aprecian los resultados de las mutaciones realizadas *in machina* sobre IMa, en ordenados de izquierda a derecha se observa una disminución en la energía (aumento en la resistencia estructural).

En la tabla se aprecia la mayor contribución energética proveniente del cambio: prolina 551 \rightarrow ácido glutámico (*pro551glu*), con este cambio de residuos se determinaron 88 kcal/mol por debajo de la enzima nativa. Probablemente la perdida de energía lograda con la sustitución *pro551glu* sea debida a un grupo de acciones concertadas como lo son, la ganancia de: un grupo cargado en la cadena lateral del aminoácido, mayor longitud en dicha cadena lateral, menor área expuesta al solvente debida a la interacción, y por supuesto a la ganancia de una interacción iónica.

Como validación del método propuesto se indica una mutación negativa (primera columna) para la cual se favorecen las repulsiones mutando *pro551his*, con lo cual se obtiene un aumento relativo en la energía de aproximadamente de 29 kcal/mol .

En la figura 18 se aprecia la conformación espacial de IMa antes de ser tratada (a) y en (b) posterior a la mutación *pro551glu*. La interacción se encuentra establecida con la lisina 119 y claramente en estos diagramas aprecia una reducción en la distancia que existía entre los aminoácidos nativos

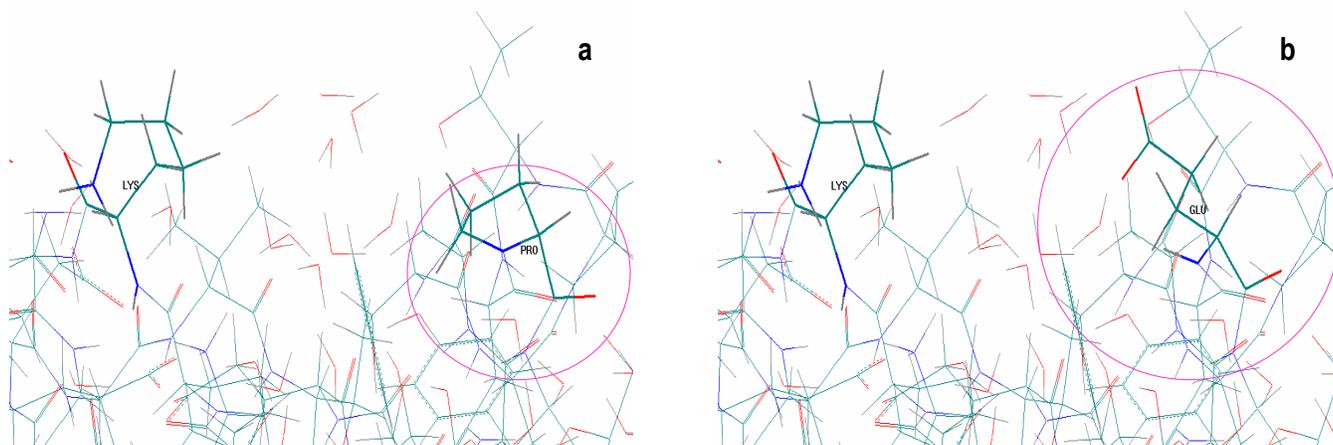


Figura 18. Fragmento tratado de IMa. El elemento a) exhibe un diagrama 3D de la interacción entre la lisina (lys) 119 y la prolina (pro) 551 cercanas en el espacio, esta interacción contribuye a que IMa tenga una energía de aproximadamente -9738 kcal/mol . En b) se aprecia la imagen para IMa mutada muestra el mejor cambio de aminoácidos: *pro551glu*, mutación que permite el mejor anclaje entre dominios, favoreciendo la energía de plegamiento para la proteína. Siendo la energía calculada para la enzima mutada de -9826 kcal/mol se logra percibir una disminución de 88 kcal/mol en comparación con la enzima nativa.

El análisis energético ya descrito se reforzó al realizar un barrido *in silico* de alaninas sobre el conjunto de proteínas mutadas, este barrido se realizó de manera semejante al descrito en anteriores secciones, es decir, se analizan las interacciones de la enzima al momento de barrer la capa externa de un dominio. El análisis del estudio para el resultado del reconocimiento interfacial se aprecia en la tabla 11. En la tabla 11 sólo se considera el mejor contacto de cada barrido en una mutación. Recordando de igual manera que en esta tabla se encuentra incluido el resultado del cálculo realizado a la mutación negativa y a la enzima nativa.

Tabla 10. Contribución energética de las mutaciones a la interfaz de la proteína, y cambio en el número total de contactos existentes entre dominios.

Mutación	Interfaz	Num. de contactos	$\Sigma\Delta\Delta G$
pro551his	Dominio 1 - Resto de la enzima	123	168.43
	Dominio 2 - Resto de la enzima	116	192.54
	Dominio 3 - Resto de la enzima	124	160.74
LMa (Enzima nativa)	Dominio 1 - Resto de la enzima	133	191.62
	Dominio 2 - Resto de la enzima	115	192.54
	Dominio 3 - Resto de la enzima	120	162.93
asp181glu	Dominio 1 - Resto de la enzima	137	196.62
	Dominio 2 - Resto de la enzima	117	190.40
	Dominio 3 - Resto de la enzima	124	163.59
asp494glu	Dominio 1 - Resto de la enzima	136	197.08
	Dominio 2 - Resto de la enzima	115	193.05
	Dominio 3 - Resto de la enzima	122	165.02
asn495glu	Dominio 1 - Resto de la enzima	136	203.89
	Dominio 2 - Resto de la enzima	115	197.05
	Dominio 3 - Resto de la enzima	125	171.52
trp547asp	Dominio 1 - Resto de la enzima	137	199.25
	Dominio 2 - Resto de la enzima	115	189.13
	Dominio 3 - Resto de la enzima	136	193.58
pro551glu	Dominio 1 - Resto de la enzima	140	200.48
	Dominio 2 - Resto de la enzima	118	190.68
	Dominio 3 - Resto de la enzima	125	161.25

Nota. La tabla 11 se encuentra acotada a mostrar solamente la suma de las contribuciones energéticas de cada contacto en la interfaz de cada dominio, se omiten las contribuciones individuales por razones de espacio.

La tabla arriba establecida muestra el aumento en el número residuos involucrados para la asociación de dominios, de igual manera permite apreciar la contribución a la energía de asociación para cada una de estas mutaciones. Es destacable observar que la mejor contribución se encontró al realizar el cambio de la prolina 551 por ácido glutámico 551. Como el mejor cambio realizado involucra la interfaz del dominio 1-3, se muestra claro el aumento de 7 aminoácidos para el dominio 1 y de 5 para el dominio 3 que logran establecer nuevos contactos, exponiendo que la mutación no contribuye de manera aislada generando un ambiente local termodinámico más estable, favoreciendo así un acomodamiento espacial.

Equilibrio y armonía

Una vez demostrada la mejor mutación (LMa-pro551glu) se procedió a realizar un estudio de su calidad estereoquímica, cotejándolo con la estequiometría de la enzima nativa. El examen estereoquímico realizado sobre la nueva lacasa se encuentra constituido por tres criterios: ángulos energéticamente permitidos, flexibilidad de sus carbonos beta y la posición espacial de los nitrógenos en asparaginas o glutaminas. El gráfico 8 (Mapa de Ramachandran) detecta ocho residuos de IMA-pro551glu fuera del área angular permitida. Estos ocho aminoácidos se encuentran estresados en sus ángulos Psi y Phi pero sólo contribuyendo para un 1.4% del total de los 559 aminoácidos, así entonces la enzima IMA-pro551glu guarda una gran estabilidad, manteniendo el equilibrio entre conformación y empaquetamiento. Para el gráfico 12 se muestra el análisis angular de la enzima nativa en éste se observan 6 aminoácidos fuera del área permitida, estos 6 aminoácidos representan el 1.07% de la proteína nativa.

De los 8 aminoácidos pertenecientes a IMa-pro551glu que contienen algún problema en sus ángulos solo 2 son diferentes a los encontrados para la enzima nativa, lo que representa el 0.36 % de diferencia para la proteína mutada en comparación con la enzima nativa. Con el anterior resultado se sabe la nueva enzima mutada para IMa, IMa-pro551glu por lo menos guarda un empacamiento similar al de la proteína nativa de IMa, con esto podemos proponer que nuestros experimentos *in silico* realizados son posibles y viables de ser escalados al laboratorio.

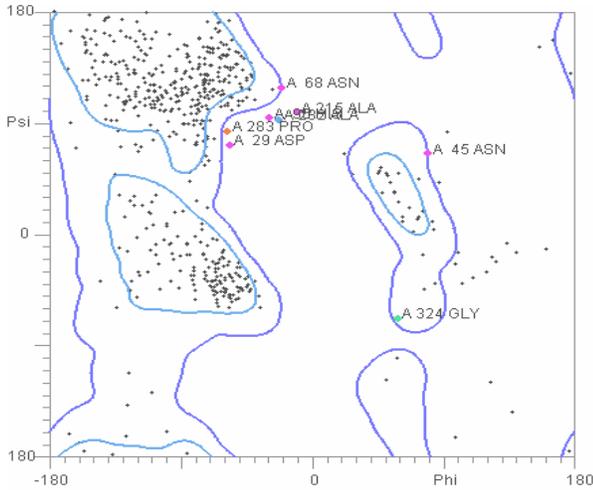


Gráfico 8. Mapa de Ramachandran, para los aminoácidos de IMa-pro551glu. Los aminoácidos fuera de contorno violeta, tienen tensiones en sus ángulos Psi o Phi.

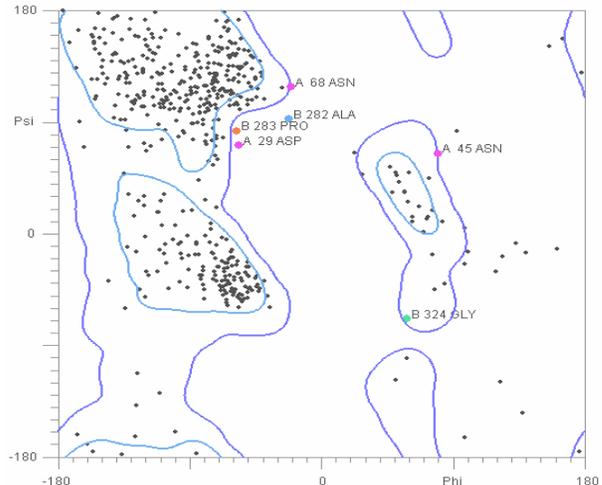


Gráfico 12. Mapa de Ramachandran determinado para la enzima nativa de *Melanocarpus albomyces*, aquí se muestran 6 aminoácidos fuera de la posición común.

En la figura 21y 19 se pretende modelan (puntos negros) las cadenas laterales que cuentan con carbón- β para IMa-pro551glu. En la figura 20 se aprecia la dispersión para la enzima nativa de IMa, con ésto se muestra que la máxima rotación posible de encontrar para cualquier carbón- β de IMa-pro551glu se encuentran acotadas por el círculo de color amarillo con diámetro de 0.25 Å. Como primera aproximación se valora en la figura 19 que la estabilidad del carbón- β para la enzima mutada es semejante a la de la enzima nativa ya que la aglomeración de cadenas laterales con carbono beta se aprecia dentro de la zona energética de 0.25 Å. En conjunto se aprecia en las figura 19 (enzimas mutada) y figura 20 (enzimas nativa) la gran similitud, ya que los carbón- β de las dos estructuras se evalúan aproximadamente dentro de la mínimas región rotacional, adoptando una equivalente dispersión y proporción dentro del círculo amarillo de 0.25 Å. Con lo cual la equivalencia estructural que hemos encontrado hasta el momento nos permite reafirmar que el modelo para enzima IMa-pro551glu adquiere contundencia para ser escalado a nivel laboratorio.

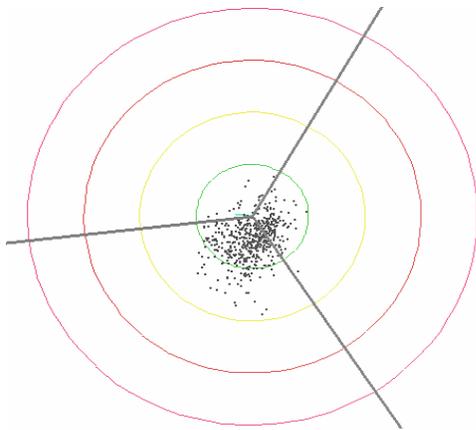


Figura 19. Acotamiento de los carbón- β , para la enzima mutada IMa-pro551glu. Se observa que los 559 aminoácidos se encuentran dentro del círculo con diámetro de 0.25Å, (área mínima permitida)

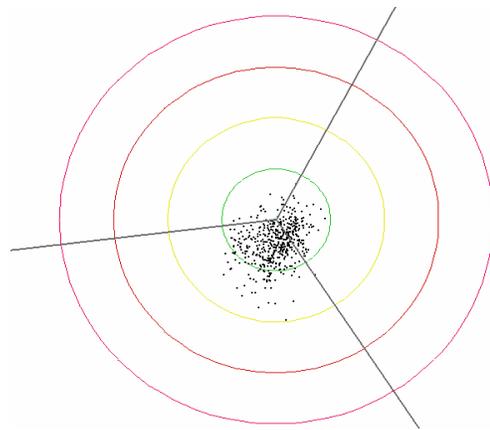


Figura 20. Expresión del carbón- β para la enzima nativa de IMa. Se aprecia que ningún aminoácido se encuentra fuera de la región permitida.

El análisis para la enzima mutada que se muestra en la figura 21-a del carbón- β permite ver que la dispersión de las cadenas laterales se encuentran con baja tensión energética; sabiendo que la tensión es función tanto del acomodo atómico como de la capacidad rotativa intrínseca de cada aminoácido observamos que la aglomeración de puntos se encuentra dentro del rango permitido (circulo amarillo).

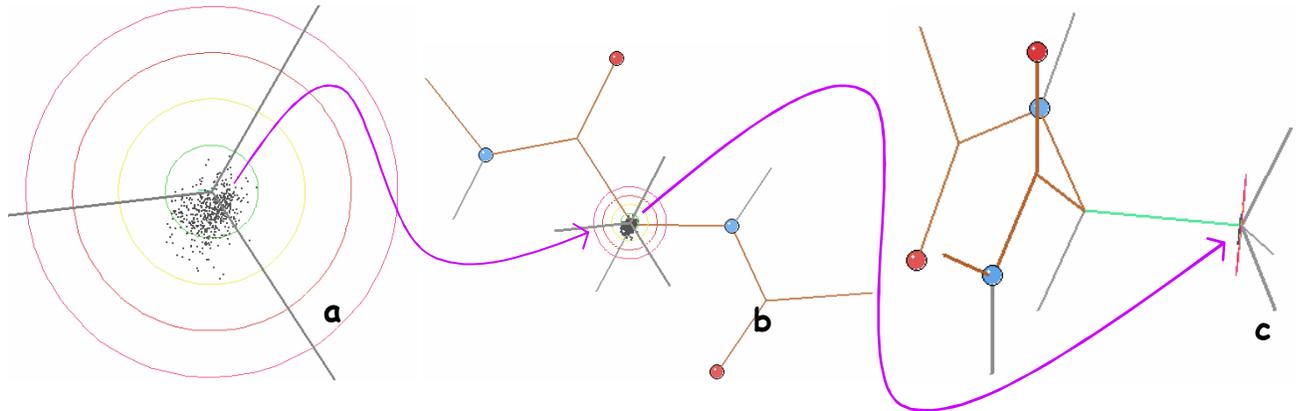


Figura 21. Banda de rotación para los del C- β . En a) se aprecia el diámetro permitido para la rotación de un C- β , en b) se aprecia al residuo en su totalidad así como la secuencia del enlace peptídico, c) muestra una vista lateral del enlace peptídico como del C- β .

Por último mostramos en la figura 22 y 23 la importancia de orientar de manera adecuada los nitrógenos para los aminoácidos histidina, ácido asparático y ácido glutámico al momento de generar el modelo computacional para la proteína de IMt. De manera fundamental la correcta orientación espacial para los nitrógenos de éste tipo de aminoácidos (switcho o flip) se encuentra directamente ligada al idóneo empaquetamiento, lo cual delimita así la obtención de un resultado prudente, razonable, sustentado y confiable capaz de ser escalado dentro del laboratorio.

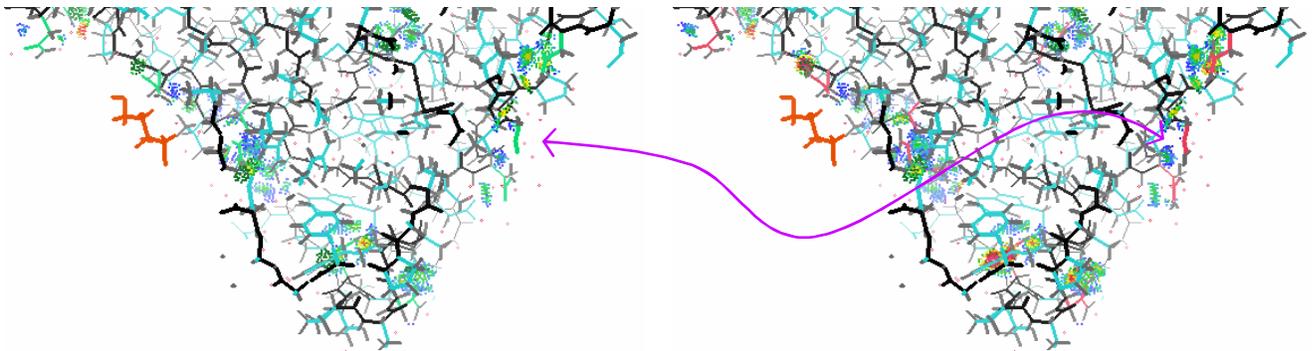


Figura 22. Segmento de IMA-pro551glu. Sección se encuentra enriquecida de asparaginas, glutaminas e histidinas, el cambio de colores de verde a rojo entre figuras muestra la correcta orientación espacial asignada para los nitrógenos de estos aminoácidos para el modelo de IMt.

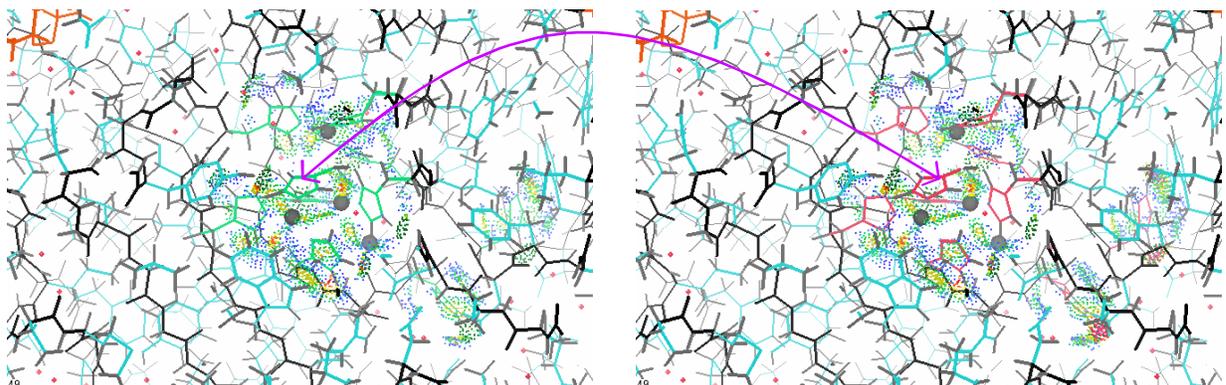


Figura 23 Fragmento que modela el sitio activo de IMA-pro551glu, en este segmento se aprecian en su totalidad el conjunto de histidinas para esta área, el cambio de color de verde a rojo en que existe entre cuadros es debido al flip intrínseco para las histidinas.

Conclusiones

El principal resultado del análisis mostrado por el estudio de homología interna para la enzima IMA muestra que los dominios no guardan homología en su secuencia, lo que sugiere una especialización de manera independiente para cada uno de estos, mostrando así que muy probablemente la lacasa se integro mediante la adición de fragmentos evolutivamente independientes, con lo cual percibimos que la generación de resistencia térmica debe de estar dada por un cambio concertado de acciones físicas, químicas y biológicas. De igual manera corroboramos que el sitio activo se encuentra delimitado entre los dominios 1 y 3, donde el primer dominio aporta al sostén de los cobres con 3 aminoácidos y el tercer dominio con 10, así como se detectaron sitios potenciales para la estabilidad de la estructura, a los cuales llamamos sitios de anclaje.

Los aminoácidos que se encuentran formando la interfaz entre monómeros se muestra baja, de tan solo de 22 aminoácidos, ésto en comparación a los aminoácidos que forman la interfaz entre subunidades o dominios con más de 70 aminoácidos en la interfaz.

Los resultados obtenidos al calcular la energía necesaria para romper la interfaz entre monómeros para el dímero de IMA mostro que era 60 kcal/mol mayor que la calculada para fragmentar la estructura monomérica en sus dominios estructurales con 72 kcal/mol ; y aunque la energía del dímero fue pequeña (12 kcal/mol) en comparación con calculada para la interfaz entre dominios, no nos fue de gran aportación para el fin último, pero si para el conocimiento básico de nuestra proteína problema, ya que la funcionalidad biológica de la enzima lacasa de *Melanocarpus albomyces* existe sólo como monómero y no como dímero, en otras palabras la enzima reportada por PDB sólo es un artefacto cristalográfico. Bajo la anterior deducción se procedió a escudriñar el monómero de la enzima realizando un estudio evolutivo de sus dominios, mediante el cual corroboro que los dominios no guardan homología entre, indicando con esto muy probablemente una evolución divergente.

El estudio de la energía interfacial para los dominios mostró que la interacción más débil se encuentra situada entre la interfaz de los Dominio 1 y 3, con esto se procedió a realizar mutaciones *in silico* con las cuales se favoreciera el anclaje estructural. La mejor mutación realizada pro551glu, arrojó un cambio de 88 kcal/mol por debajo del calculado para enzima nativa, acortando con esto la distancia espacial que existía entre la lisina y la prolina nativas, logrando un enzima con mayor resistencia en su estructura capaz de ser sometida a temperaturas altas y no fragmentarse. La nueva enzima fue sometida a un estudio esterequímico que mostró la consistencia estructural de la proteína IMA-pro551glu ya que esta tiene una diferencia mínima en comparación con la enzima nativa, presentando un 0.36% de más en el número de aminoácidos fuera del área permitida para los enlaces phi y psi, lo cual equivalente lo mínimo para los fines buscados.

Es innegable que la Bioinformática es una de las disciplinas que más atractivo ofrece hoy para los investigadores jóvenes, que encuentran en ella una nueva manera de ver la biología, tanto así que algunos ya vislumbran una ciencia sin tubos de ensayo y al mismo tiempo se configura como una herramienta clave para el futuro de áreas como la biomedicina, la industrial y la biotecnología e impulsando el desarrollo de la genómica y proteómica.

Bibliografía

1. Arrizubieta MJ, Polaina J. **Increased thermal resistance and modification of the catalytic properties of a beta-glucosidase by random mutagenesis and in vitro recombination.** Journal of Biological Chemistry 275 (37): 28843-28848 SEP 15 2000.
2. Berka,R.Michael, Brown,S.H, Xu,F, Schneider,P, Oxenb.O, Slashed.II,K.M. and Aaslyng D.A **Purified *Myceliophthora laccases and nucleic acids encoding same Patent:*** US 5795760-A 1 18-AUG-1998.
3. Kristine Vogel, Matthew Bashoton, Nicola D Kerrison, Cyrus Chothia and Sarah A Teichmann. **Structure, function and evolution of multidomain proteins.** Current Opinion in Structural Biology, 2004, 14:208. 216
4. Crestini C, Jurasek L, Argyropoulos DS. **On the mechanism of the laccase-mediator system in the oxidation of lignin.** Chemistry. 2003 Nov 7;9(21):5371-8.
5. D'Acunzo F, Galli C, Masci B. **Oxidation of phenols by laccase and laccase-mediator systems - Solubility and steric issues.** European Journal of Biochemistry 269 (21): 5330-5335 Nov 2002
6. David E. Kim, Dylan Chivian and David. **Baker Protein structure prediction and analysis using the Robetta server.** Nucleic Acids Research, 2004, Vol. 32.
7. Elder T. **Ab initio calculations on the laccase T1 active site and its interactions with mediators.** Abstracts of papers of the american chemical society 219: u282-u282 160-cell part 1, mar 26 2000.
8. Francisco J. Enguita, Ligia O. Martins¶, Adriano O. Henriques, and Maria Armenia Larrondo. **Crystal structure of a Bacterial Endospore Coat Component a laccase with enhanced thermostability properties.** The journal of biological chemistry Vol. 278, No. 21, Issue of May 23, pp. 19416–19425, 2003.
9. Gazaryan IG, Morozova OV, Yaropolov AI, Shleev SV, Khan IG. **Novel laccase redox mediators: spectral, electrochemical and kinetic properties.** Appl Biochem Biotechnol. 2003 Dec;111(3):167-84.
10. Gonzalez-Blasco G, Sanz-Aparicio J, Gonzalez B, et al. **Directed evolution of beta - glucosidase A from *Paenibacillus polymyxa* to thermal resistance.** Journal of Biological Chemistry 275 (18): 13708-13712 MAY 5 2000
11. Gottfried Kandioller and Lew Christov. **Catalyst potential of laccase-mediator systems and transition metal polyoxometalates in oxygen bleaching of pulp.** Internacional convention center, Durban October 2002.
12. Gou SH, Qian M, Yu Z, Duan CY, Sun XF, Huang W. **Synthesis, molecular structure and magnetic properties of tetranuclear copper(II) complexes with pendant-arm macrocyclic ligands .**Journal of the chemical society-dalton transactions (21): 3232-3237 2001
13. H. X. Wanga and T. B. Ngb. **A novel laccase with fair thermostability from the edible wild mushroom (*Albatrella dispansus*).** Biochemical and Biophysical Research Communications 319 (2004) 381–3.
14. Huang HW, Sakurai T, Monjushiro H, Takeda S. **Magnetic studies of the trinuclear center in laccase and ascorbate oxidase approached by EPR spectroscopy and magnetic susceptibility measurements.** Biochimica et biophysica acta-protein structure and molecular enzymology 1384 (1): 160-170 apr 23 1998
15. Laura-Leena Kiiskinen. **Characterization and heterologous producción of a novel lacase from *Melanocarpus albomyces*.** Tesis doctoral Helsinki University of technology 28 of january 2005-03-30.
16. Lee SK, George SD, Antholine WE, Hedman B, Hodgson KO, Solomon E. I. **Nature of the intermediate formed in the reduction of O-2 to H2O at the trinuclear copper cluster active site in native laccase.** Journal of the american chemical society 124 (21): 6180-6193 May 29 2002

17. Lesk, Arthur M. **Introduction to protein science — architecture, function, and genomics**. Oxford University Press, Oxford, United Kingdom, capítulo 5
18. Koroleva O. V., Stepanova E. V., Binukov V. I., Tomofeev V. P. y Pfeil W. **Temperature-induced changes in copper center and protein conformation of two fungal laccases from *Coriolus hirsutus* and *Coriolus zonatus***. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1547: 397-407 2001.
19. Nina Hakuliner, Laura-Leena Kiiskinen, Kristiina Cruz, Markku Saloheimo Arja Paananen, Anu Koivula and Juha Rouvinen. **Crystal structure of a laccase from *Melanocarpus albomyces* with an intact trinuclear copper site**. *Nature structural biology* vol. 9 num.8, 2002
20. Nina Hakuliner, Laura-Leena Kiiskinen, Kristiina Cruz, Markku Saloheimo Arja Paananen, Anu Koivula and Juha Rouvinen. **Crystal structure of a laccase from *Melanocarpus albomyces* with an intact trinuclear copper site**. *Nature structural biology* vol. 9 num. 8, 2002
21. Rendy M Berka, Palle schneider, Elizabeth J. Golightly, Stephen H. Brown, Mark Madden, Kimberly M. Brown Torben Halkier, Kristine Mondorf, and FENA Xu. **Randy characterization of the gene encoding an extracellular laccase of *Myceliophthora thermophila* and análisis of the recombinant enzyme expressed in *Aspergillus oryzae***. *Applied and Environmental Microbiology*. 1997 63(8) p. 3151-3157
22. Santagostini L, Gullotti M, De Gioia L, Fantucci P, Franzini E, Marchesini A, Monzani E, Casella L. **Probing the location of the substrate binding site of ascorbate oxidase near type 1 copper: an investigation through spectroscopic, inhibition and docking studies**. *International journal of biochemistry & cell biology* 36 (5): 881-892 May 2004
23. Solomon E, Sundaram U, Machonkin T. **Multicopper oxidases and oxygenases**. *Chemical reviews* 96 (7): 2563-2605 nov 1996
24. Sundaram UM, Zhang HH, Hedman B, Hodgson KO, Solomon. **Spectroscopic investigation of peroxide binding to the trinuclear copper cluster site in laccase: Correlation with the peroxy-level intermediate and relevance to catalysis**. *Journal of the american chemical society* 119 (51): 12525-12540 Dec 24 1997
25. Tanja Kortemme, David E. Kim, and David Baker. **Computational alanine scanning of protein-protein interfaces**. *Science's stke* February 2004.
26. <http://genes.mit.edu/GENSCAN.html>
27. <http://kinemage.biochem.duke.edu/molprobity/>
28. <http://robeta.bakerlab.org/>
29. <http://scop.mrc-lmb.cam.ac.uk/scop/>
30. <http://us.expasy.org/tools/redundancy/>
31. <http://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi>
32. <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>
33. <http://www.ebi.ac.uk/Radar/>
34. <http://www.isrec.isb-sib.ch/java/dotlet/Dotlet.html>
35. <http://www.rcsb.org/pdb/>
36. <http://www.swissmodel.unibas.ch/anolea/>
37. <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>
38. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Anexos.*Visualización como herramienta*

La visualización de moléculas en tres dimensiones es muy conveniente cuando se estén estudiando estructuras y funciones de las proteínas así como el papel que juegan los aminoácidos que las integran. Los métodos de visualización tridimensionales nos ofrecen ventajas sobre los métodos de enseñanza convencionales (moléculas planas). Por lo tanto la visualización molecular ofrece así una imagen más rica, llamativa e interactiva, que se puede recordar más fácilmente.

Rasmol

RasMol es un programa para la representación gráfica de moléculas que permite visualizar cualquier tipo de estructura molecular definida (proteínas, los ácidos nucleicos y las moléculas pequeñas), una molécula definida es aquella de la cual se conocen coordenadas en tres dimensiones de cada uno de sus átomos. RasMol es un programa de gran versatilidad que permite no sólo obtener diferentes modelos de representación para una molécula, sino que también permite colorear, resaltar y seleccionar átomos o regiones particulares, por lo que facilita el aprendizaje de los fenómenos estructurales y de su relación con la actividad biológica. RasMol es una herramienta educativa poderosa para mostrar las estructuras del ADN y proteínas. El programa está diseñado para presentar, enseñar y generar imágenes que se pudieran publicar. El programa lee archivos de moléculas definidas mostrando interactivamente la molécula en la pantalla con una serie de esquemas y colores que representan a cada átomo de esta molécula. Estos ficheros de entrada incluyen, específicamente, los formatos Protein Databank (PDB), y como plus: la información sobre conectividad entre moléculas no está contenida en el archivo, RasMol la calcula automáticamente. Ésta herramienta se utilizó para producir las figuras 8-a, 8-c, 9, 10, 12-b 13 y 15.

Estructuras súper secundarias y dominios

Se define una estructura súper secundaria como la determinada combinación de varias estructuras secundarias y un dominio como una combinación de dos o más estructuras supersecundarias, las superestructuras pueden tener una determinada función o simplemente pertenecer a una unidad funcional mayor (dominio), por estas razón el mismo tipo de estructura (súper secundaria o dominio) puede tener diferente función en proteínas diferentes ⁽³⁾. Comprender la relación entre la estructura de un dominio y su función es complejo. A veces una determinada función es realizada por un dominio individual, mientras que en otras ocasiones la función requiere la existencia de más de un dominio, por ejemplo, los sitios de unión para pequeñas moléculas o los sitios activos de determinadas enzimas se forman en la región interfacial de dos dominios, por lo que se requiere la participación de residuos de ambos dominios.

Clasificación estructural de las proteínas

Actualmente se clasifican las proteínas desde el punto estructural en cuatro grupos principales (todo α , todo β , α/β y $\alpha+\beta$). Esta clasificación es editada en el banco de datos SCOP ("Structural Classification of Proteins"). En éste barrido cual prácticamente todas las proteínas presentan similitudes estructurales con otras proteínas y en algunos o en muchos de los casos esta similitud va acompañada de un origen evolutivo común, la base de datos SCOP proporciona una descripción detallada de las relaciones estructurales y evolutivas entre las estructuras proteicas conocidas. La clasificación utilizada por SCOP es jerárquica, es decir, las proteínas se clasifican en familias cuando presentan similitudes demostrables en su secuencia primaria, estructura o función, al momento de que dos o más familias con poca similitud en estructura primaria presentan similitud en estructura y función se agrupan en una superfamilia. Los dos grupos más altos: plegamiento (folding) y clase, se basan exclusivamente en aspectos estructurales.

Anolea

ANOLEA (Atomic Non-Local Environment Assessment) es un servidor que permite determinar la energía sobre una cadena proteica, evaluando el "ambiente no-local" (NLE) de cada átomo en la molécula. El NLE de un átomo se define como, las interacciones que sienten estos átomos a no más de 7Å.

Robetta

Robetta es un servidor que proporciona herramientas automatizadas para la predicción y análisis de estructura proteica, una de las cualidades de este servidor es la predicción de los efectos energéticos que conllevan las mutaciones, mediante la exploración computacional de alaninas en alguna región interfacial ^(6,28).

Brevemente: la exploración de las alaninas de la interfaz utiliza un modelo físico, capaz de reemplazar uno a uno cualquier aminoácido por una alanina, el cual después se realiza un escaneo o cálculo de la energía de enlace resultante sobre el cambio. La exploración e intercambio de alaninas es un método de gran alcance analizando interacciones importantes en una interfaz, mediante la ecuación del efecto energético de la sustitución de un aminoácido → alanina en la interfaz, generando un mapa energético mediante el cual se pueden determinar aminoácidos dañinos a la estructura de una proteína ^(6,28).

Algoritmo de Robetta para el escaneo de alaninas.

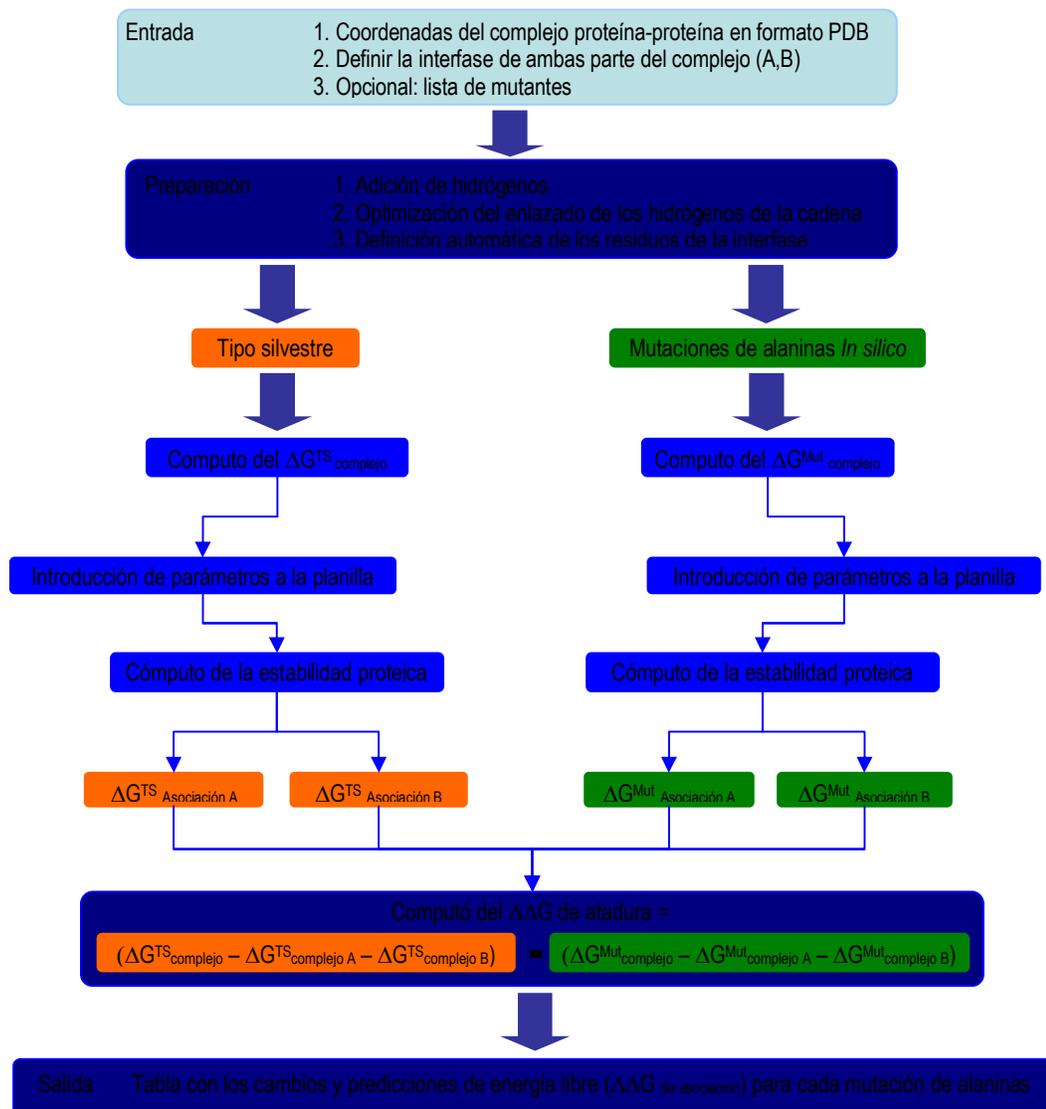


Figura 24 Algoritmo de cálculo utilizado por Robetta para determinar la energía libre a causa de la mutación *in silico* de alaninas

Un aminoácido de interfaz es definido como aquel residuo que tenga a lo menos un átomo dentro de una esfera con radio de 4 Å. Los átomos adicionales que se encuentran dentro de una esfera con radio de 8 Å son átomos que pertenece a otras asociaciones, pero que inquietan energéticamente la interfaz ^(6,28).

Sitio activo

Localización espacial para los átomos de cobre que integra el sitio activo. Estos esquemas permiten visualizar de manera cualitativa el conjunto de interacciones en cada átomo metálico.

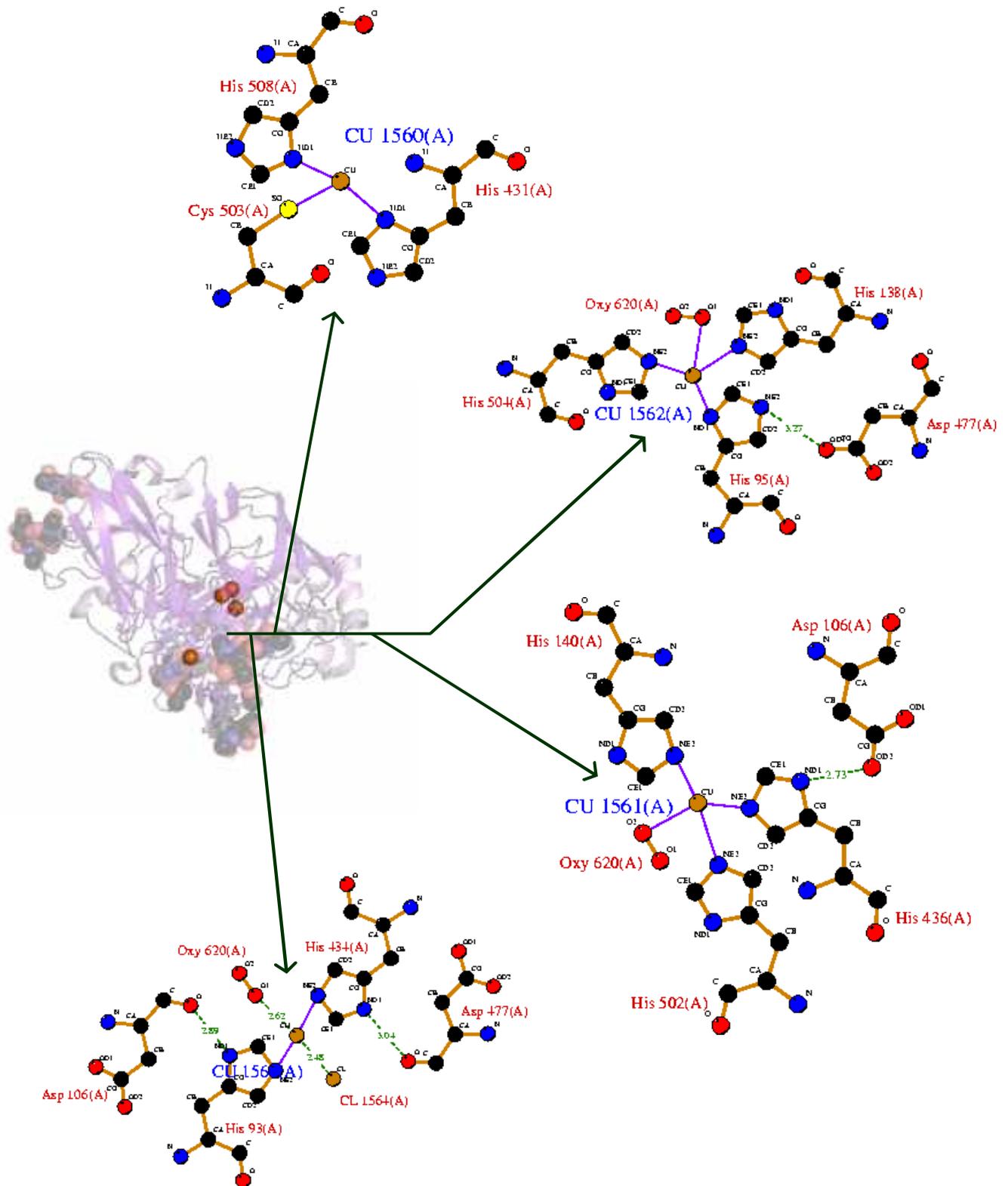
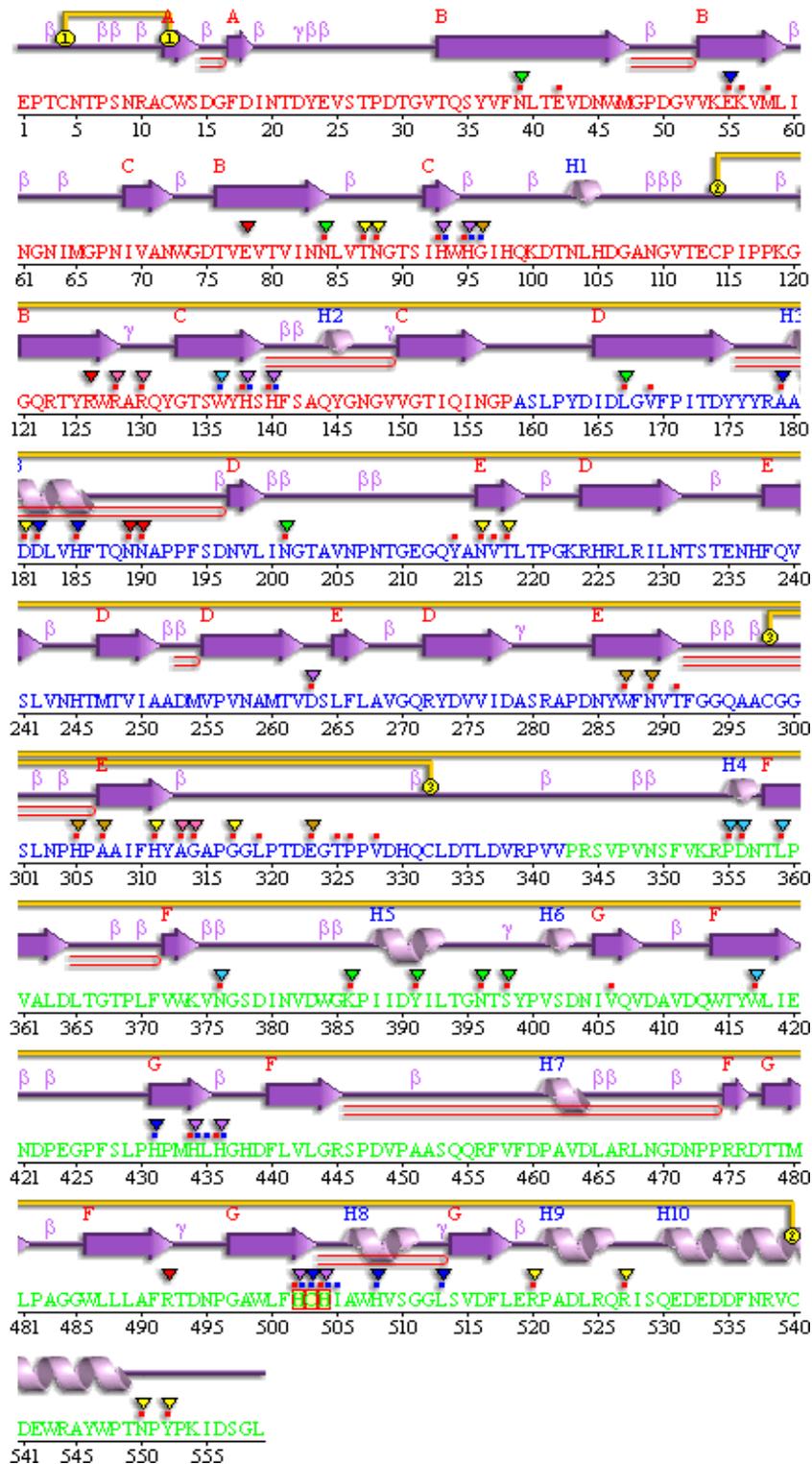


Figura 25. Representación de los aminoácidos que encasillan cada uno de los átomos de cobre, en donde se localiza el sitio activo, aquí mismo se percibe en número y tipo de éstos aminoácidos.

Estructura secundaria

Esta conformación representa en forma plana a la proteína lacasa de *Melanocarpus albomyces*, aquí se distingue la secuencia de aminoácido, indicando los aminoácidos que forman puentes disulfuro, secciones con potencial biológico las cuales se denotan con un triángulo de color en su parte superior. Entre otros se logra apreciar que un mismo aminoácido puede compartir cualidades como se aparecía en los puentes disulfuro y capacidades biológicas con los triángulos multicolor. Indexado de manera continua y en letras color rojo se presentan las hojas beta que dan lugar a una estructura súpersecundaria como lo son las laminas beta.



Simbología

Motivos estructurales

- Beta turn β
- Gamma turn γ
- Beta hairpin \equiv

Disulfuros

- Puente disulfuro

Sitio catalítico

- Catalytic residue

Residuos de contacto

- a ligando
- a metal

Sitios con actividad biológica potencial

- AC7, ∇ AC9, ∇ DC9, ∇ AC8
- AC1, ∇ AC6, ∇ DC1, ∇ AC4
- CC9, ∇ BC3, ∇ BC5, ∇ BC6
- GC4, ∇ BC9, ∇ BC7, ∇ CC5
- CC7, ∇ AC2, ∇ GC9, ∇ DC2

Figura 26. Estructura de la proteína lacasa de *Melanocarpus albomyces*,



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE IDÓNEA COMUNICACIÓN DE RESULTADOS

No. 00030

ANÁLISIS ESTRUCTURAL Y BASES MOLECULARES DE LA ESTABILIDAD PARA LA ENZIMA LACASA

En México, D.F., se presentaron a las 15:00 horas del día 9 del mes de mayo del año 2008 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. GUSTAVO VINIEGRA GONZALEZ

DR. ARTURO ROJO DOMINGUEZ

siendo el primero asesor del alumno y lector el segundo, de la Idónea Comunicación de Resultados, se reunieron a evaluar la presentación cuya denominación aparece al margen, para la obtención del diploma de:

ESPECIALIZACION EN BIOTECNOLOGIA

DE: LEONARDO DAVID HERRERA ZUÑIGA

De acuerdo con el artículo 79 fracción II del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

Acto continuo, se comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



[Handwritten signature]

LEONARDO DAVID HERRERA ZUÑIGA
FIRMA DEL ALUMNO

REVISÓ

[Handwritten signature]

LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISION DE CBS

[Handwritten signature]

DR. JOSE FRANCISCO FLORES PEDROCHE

ASESOR

[Handwritten signature]

DR. GUSTAVO VINIEGRA GONZALEZ

LECTOR

[Handwritten signature]

DR. ARTURO ROJO DOMINGUEZ