

“Estudio Por Homología De La Enzima Uricasa Obtenida Del Hongo Candida”

Eduardo R. Jiemenez Hernandez, Leonardo D. Herrera Zuñiga

Tecnológico de Estudios Superiores Oriente del Estado de México, Ixtapaluca centro

Resumen— En el presente trabajo se muestra el estudio in-silico de la enzima úricas mediante un modelo por homología construido apartir de una secuencia concenso de la base cristalográficas PDB. Al termino del modelado se válido para verificar si el modelo fue construido con éxito. La validación se realiza por medio de servidores web especializados. El estudio de esta enzima es de gran importancia para las ramas Ambiental y Nefrología, ya que la uricasa es usada como un detector tanto en aguas como en seres humanos y para metabolizar ácido úrico y así comprender su estructura para su mejor estudio y aplicación.

Palabras clave—Enzima, Uricasa, Candida, -Modelo 3D, Homología.

I. INTRODUCCIÓN

Hoy en día, la moderna biotecnología es frecuentemente asociada con el uso de microorganismos alterados genéticamente como el E.coli o levaduras para producir sustancias como la insuina o algunos antibióticos.

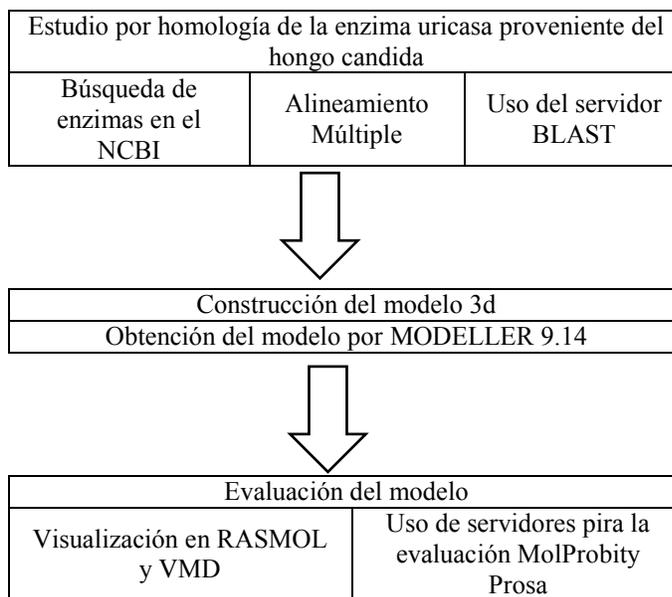
En el campo actual de la medicina se está empleando el uso de la enzima URICASA la cual ha sido producida biológicamente en un laboratorio, esta fue adquirida a partir del hongo *candida sp*, de la cual se desconoce hasta el día de hoy su estructura. La metabolización del ácido úrico en humanos es casi nula ya que carecemos de esta enzima. La acumulación de ácido úrico desemboca en enfermedades crónicas nefrológicas y articulares. Se sabe que un método de tratamiento es la aplicación de “uricasa obtenida del hongo candida” de la cual no hay un estudio que detalle las partes estructurales de esta enzima. Debido a que hay diversas sepas de candida y diversos métodos de obtención se plantea un modelo homólogo de dicha enzima. Conocer con exactitud la estructura de la enzima es uno de los principales objetivos del estudio in silico mediante la homología. La obtención de un modelo 3D se fundamenta en la construcción de un modelo a partir de enzimas ya estructuradas en un banco de datos como base.

II. METODOLOGÍA

Para la creación del modelo de la enzima “Uricasa obtenida del hongo candida” por homología se toman en cuenta todas las estructuras coincidentes en el servidor NCBI “National Center for Biotechnology Information” (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/?term=uricase+from+candida>). Constituidas por 300 proteínas para que el estudio sea homologo. Luego se realiza un alineamiento múltiple con el fin de reducir al mínimo los espacios y maximizar las coincidencias entre las secuencias a comparar mediante el servidor CLUSTALW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) así como obtener la línea consenso proveniente del alineamiento la cual será nuestra

cadena problema. Al obtener la línea consenso se procede construir el modelo 3D mediante el programa MODELLER9.14 (<https://salilab.org/modeller/>), se generan 5 modelos de los cuales se toma el menor valor proporcional al DOPE. El modelo fue realizado exitosamente. La validación de este modelo se realizó en

el servidor MolProbity (<http://molprobity.biochem.duke.edu/>) así como en el servidor PROSA “Protein Sequence Analyzer”.



III. RESULTADOS

En el estudio in silico se aplicaron herramientas computacionales que permitieron obtener los datos de construcción y visualización así como de validación del modelo 3D.

Al realizar la búsqueda de estructuras para poder construir el modelo se obtuvieron 96 resultados en la base de datos del NCBI “National Center for Biotechnology Information”, de la cual solo se tomaron en cuenta las que estuvieran en un rango de 300 proteínas en su constitución. Se obtiene el FASTA de estas para ser usado posteriormente en BLAST “Basic Local Alignment Search Tool” en la sección *protein blast* del servidor web.

Para realizar el alineamiento múltiple se ocupó CLUSTALW2 el cual nos dio un alineamiento donde se observa que algunas enzimas aun presentan gaps.

Primera búsqueda homologa					Segunda búsqueda depurada homologa						
Archivo	Editar	Seleccionar	Ver	Formato	Color	Archivo	Editar	Seleccionar	Ver	Formato	Color
g 172316363 gb KHC37668.1 1-303						g 240134679 gb EER34233.1 1-303					
g 172316508 gb KHC39099.1 1-303						g 256723718 ref XP_002546788.1-303					
g 172317301 gb KHC46962.1 1-303						g 172319999 gb KHC73711.1 1-303					
g 172318531 gb KHC59155.1 1-303						g 1723173109 gb KHC47058.1 1-303					
g 172319263 gb KHC6421.1 1-303						g 1723173024 gb KGU12174.1 1-303					
g 172320744 gb KHC1095.1 1-303						g 1703972154 gb KGR01255.1 1-303					
g 172320874 gb KHC2379.1 1-303						g 170396354 gb KGC9850.1 1-303					
g 172321499 gb KHC8955.1 1-303						g 170396755 gb KGC96701.1 1-303					
g 146441382 gb EAL00680.1 1-303						g 170398411 gb KGR13101.1 1-303					
g 146441451 gb EAL00689.1 1-303						g 170398691 gb KGR19587.1 1-303					
g 16847233 ref XP_719685.1 1-303						g 170399301 gb KGR22051.1 1-303					
g 168472990 ref XP_719560.1 1-303						g 1712684004 gb KGT71023.1 1-303					
g 123888183 gb EEQ45470.1 1-303						g 1712686977 gb KGU15899.1 1-303					
g 172319999 gb KHC73711.1 1-303						g 1712687172 gb KGU16092.1 1-303					
g 1723173109 gb KHC47058.1 1-303						g 1712682446 gb KGU30187.1 1-303					
g 1712683204 gb KGU12174.1 1-303						g 1712685939 gb KGU33293.1 1-303					
g 1703972154 gb KGR01255.1 1-303						g 1712688134 gb KGU35511.1 1-303					
g 1223641334 ref CAX43294.1 1-303						g 1723163634 gb KHC37668.1 1-303					
g 1241950545 ref XP_002417995.1-303						g 1723173011 gb KHC46962.1 1-303					
g 1300351452 ref COC21676.1 1-302						g 1723185310 gb KHC59155.1 1-303					
g 146514452 ref XP_003867114.1-302						g 1723192633 gb KHC66421.1 1-303					
g 15545989 ref CCE43712.1 1-302						g 1723207444 gb KHC1095.1 1-303					
g 146444861 gb EJC43004.1 1-303						g 1723208742 gb KHC2379.1 1-303					
g 146389939 gb EJC37994.1 1-301						g 1723214997 gb KHC8955.1 1-303					
g 146420937 ref XP_001486421.1-301						g 146441382 gb EAL00680.1 1-303					
g 1388519117 gb EJC41381.1 1-302						g 146441451 gb EAL00689.1 1-303					
g 126094112 ref XP_002614731.1-302						g 135974955 ref CCE93078.1 1-307					
g 17418039 gb AA06034.1 1-303						g 136701580 ref XP_003682289.1-307					
g 12501644 gb J7809.1 KRC_C191-303						g 1695112027 gb KJK38576.1 1-302					
g 125076023 gb AD054648.1 1-303											
g 135974955 ref CCE93078.1 1-307											
g 136701580 ref XP_003682289.1-307											
g 1695112027 gb KJK38576.1 1-302											

Fig. 1 esquema resultante del uso de ClustalW2 mostrando las secuencias con gaps y la depuración para tener una mejor homología.

Finalizando con 34 proteínas como base del estudio homólogo. Del mismo estudio se obtiene la línea consenso la cual nos servirá para construir el modelo 3D.

Línea consenso
MQSELYSSTYGKGNVFKLVKKDPSNPTVQDVLEANVQVL
LRGKFDESYTKADNSSIVPTDVTNKNTILVEAKTTDVWPIERF
AAHLAKHFTTKYGHVDGIEVTIIQAKWSKIKLEGKEHAHSF
KHEGPEPTRRITLYNDKHTKQLSSSIKDLTVLKSTGSMFY
GYNVCDYTTLQPTKDRILSTDVDASWTFDPTQIATLDDLSQ
PKKGLFDTTYNTARDVLTLELFCCKENSPSVQSTMYNMSHKIL
ETVKQVGTVSIVLPNKHLYILFNLEWKGIKDNKDLFPAPDP
NGLIKSTVGRKGDKAKF

Realizar un BLAST se refiere a identificar la secuencia de nucleótidos o proteínas de un organismo o identificar el mismo organismo a través de esta herramienta. Esta búsqueda arroja 4 enzimas similares. Una vez terminado el BLAST nos muestra con que proteínas tiene mayor afinidad, para poder crear un modelo 3D es necesario que estas tengan una coincidencia mayor al 80%. De las proteínas mostradas se usaron las cuatro primeras para poder crear el modelo homólogo de estas mediante el uso de MODELLER. Usamos los cuatro primeros números en la sección de "Accession" para buscar la estructura en cristalizada en el banco de datos PDB y obtener un documento PDB text.

Tabla 1 Resultados obtenidos del servidor BLAST dando los resultados y la estructuras coincidentes.

Accession	Query cover	Total score	Max score
3BJP A	99%	247	247
2ZKA A	99%	247	247
4D12 A	99%	247	247
1R4S	98%	246	246

Ya obtenidos los archivos en formato .PDB se renombran sucesivamente [1-4] en el mismo orden como se descargó. Se necesita un archivo madre el cual lleva la línea consenso. El archivo se crea con las especificaciones que modeller proporciona. Se crean los script según las especificaciones de modeller y se corren en el programa obteniendo 5 modelos, de los cuales se usa el de menor valor directo al DOPE y es usado como un modelo teórico de la proteína. Se visualizó en VMD "Visual Molecular Dynamics" mostrando el siguiente resultado:

La evaluación de la calidad del modelo es un aspecto fundamental para verificar la veracidad del mismo. Por tal razón su evaluación se realizó en el servidor MolProbity.

Uno de los resultados es el diagrama de ramachandran el cual muestra el "estrés" de los ángulos diedros (psi) y contra (phi) en los aminoácidos que constituyen la estructura de dicha proteína por lo tanto nos permite aproximar la ubicación de los ángulos y de las torsiones fuera de lugar en el modelo.

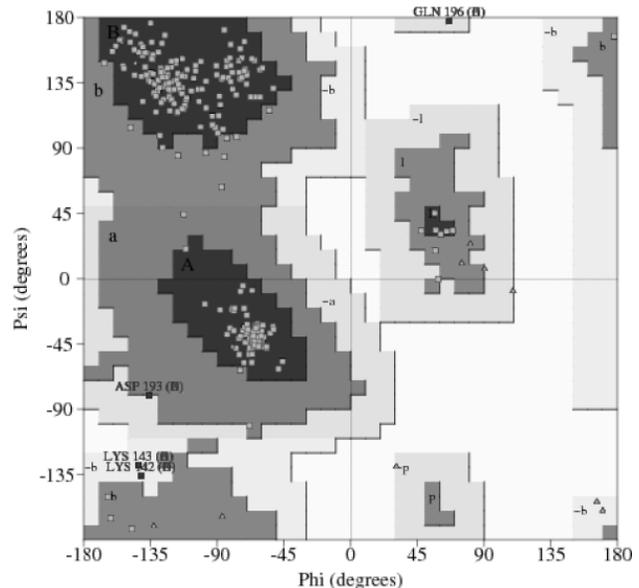


Fig. 2 diagrama de ramachandran mostrando los angulos Phi y Psi con estrés o angulo no permitido.

Análisis de la geometría		
Por rotamers	40	3.61%
Ramachandran outliers	12	0.99%
Name outliers	A 26 ASN (-163.7, -150.5) A 193 ASP (-135.7, -80.7) A 212 PHE (-68.3, -101.3) B 26 ASN (-163.7, -150.5) B 193 ASP (-135.7, -80.7) B 212 PHE (-68.3, -101.3) C 26 ASN (-163.7, -150.5) C 193 ASP (-135.7, -80.7) C 212 PHE (-68.3, -101.3) D 26 ASN (-163.7, -150.5) D 193 ASP (-135.7, -80.7) D 212 PHE (-68.3, -101.3)	
Ramachandrian favored	1156	95.38%
C β deviations >0.25 ^a	8	0.69%
Bad backbone bonds	0/9980	0.00%

Posición del carbón β es favorable y dentro de la rotación permitida. El estudio muestra que 8 átomos están fuera del rango permisible.

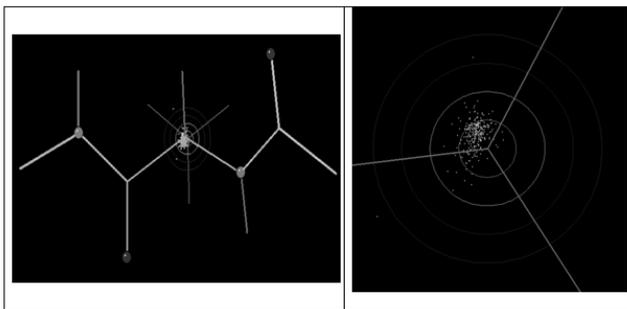


Fig. 3 carbón β mostrando el radio de van der Waals y la posición de los átomos

Otro método de evaluación del modelo es el uso del servidor PROSA, el cual mostró resultados favorables ya que a través del estudio por NMR (Nuclear magnetic resonance) los átomos caen en un rango de 300 como la estructura de aminoácidos conformante de la enzima uricasa.

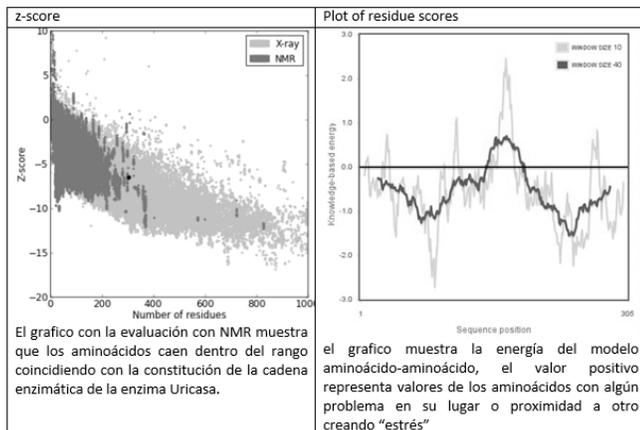


Fig. 4 graficas correspondientes al estudio en PROSA

así también se realizó un estudio para conocer el tamaño de la superficie por medio del servidor 3V.

Información	
Voxel size	1.0 A
volumen	207421 A ³
Surface area	33590 a ²
sphericity	0.50
Effective radius	18.53 A
Center of mass	(10.9-1.8, -15.9) A

Tabla del volumen interno

Volumen Interno	
Voxel size	1.0 A
volumen	16479 A ³
Surface area	5160 a ²
sphericity	0.61
Effective radius	9.58 A
Center of mass	(10.9-1.8, -15.9) A

Se realizó el estudio de la cavidad donde se aloja el ácido úrico en la estructura de la enzima uricasa.

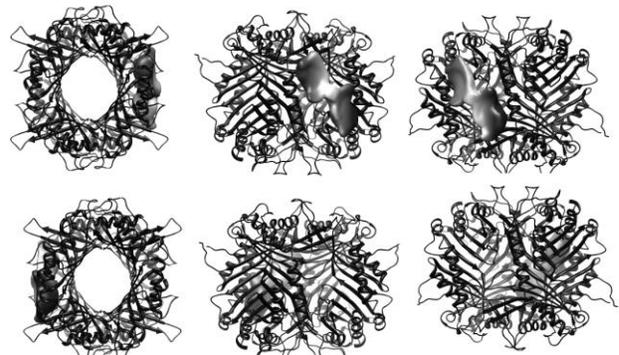


Fig. 5 representación 3D de la proteína mostrando el sitio donde se une el ácido úrico.

IV. DISCUSIÓN

El estudio por homología ofrece una base para los métodos que predicen las características estructurales de una nueva enzima sin estructura 3D, basando en su similitud con las ya conocidas. La similitud en las secuencias permite la predicción y modelización de todos los dominios estructurales. El modelo obtenido hasta donde se sabe es el primer reporte que se hace sobre un modelo por homología de la enzima *uricasa obtenida del hongo candida*.

Lo que permite proponer el modelo con validación para proporcionar un modelo confiable y realista a investigadores en la rama del estudio de la nefrología o interesados en el estudio de esta enzima ya que puede dar mayor estudio y entendimiento de la enzima estudiada en este trabajo para su investigación y aplicaciones en el tratamiento de la acumulación del ácido úrico en seres humanos.

La utilización de las biotecnologías reporta múltiples beneficios en la simplificación de procesos, mejoras en la calidad de los productos, menor impacto ambiental, y ahorro de costos. También han permitido el desarrollo de nuevos productos. Por ejemplo, las tecnologías de ADN recombinante han permitido la producción de proteínas terapéuticas, que serían económicamente inviables de obtener por métodos extractivos.

V. CONCLUSIÓN

Se creó un modelo 3D bajo un estudio in silico de la enzima *uricasa obtenida del hongo candida*, por medio del uso de software especializado tales como MODELLER y VMD. El modelo obtenido por homología de la enzima uricasa supero diversas estrategias de validación, lo que permite proponerlo como un modelo valido y ser usado dentro del campo de investigación como referencia estructural entendiendo a fondo sus características constituyentes.

RECONOCIMIENTOS

Agradezco al M en B Leonardo Herrera Zúñiga, el cual me ha brindado todo su apoyo, tiempo y confianza al asesorarme y guiarme a lo largo de esta investigación.

Agradezco a los directivos de la institución educativa a la que estoy adscrito por su apoyo incondicional.

BIBLIOGRAFÍA

- [1]. Diaz Caballero, Martinez Serrana (2012). *Modelacion Por Homologia De La Proteina Lux De Porphyromonas Gingivalis Cepa W83, Trabajo De Investigacion*
- [2]. Denis Noble(2005) *Biological Computation. Report University Laboratory Of Physiology, Oxford, Uk*
- [3]. David A Adler, Bioinformatics.(2005). *Secondary Article, Zymo Genetics Inc, And Department Of Pathology, Univrsity Of Washington Seattle, Washington, Usa.*
- [4]. Nirmal K. Prasad, Vaibhav Vindal.(2011). *In Silico Analysis Of Pyncoporus Cinnabarius Laccase Active Site With Toxic Industrial Dyes, Article Doi 10.1007/S00894-011-1215-0*
- [5]. Anton Lershov, Konstantin Odynets.(2010). *Homology Modeling Of 3d Structure Of Human Chitinase.Like Protein Chi312. Research Article. Doi: 10.2478/S11535-010-0039-8*
- [6]. Xiangwei Wu, Cheng Chi Lee.(1989). *Urate Oxidase: Primary Structure And Evolutionary Implications, Article Ec 1.7.3.3)*