

Refinamiento de la mutación *W107R* de la enzima *KatG* de *Mycobacterium tuberculosis* y estudio de docking con Isoniazida.

María Rodríguez Merchán

Máster universitario en Bioinformática y bioestadística UOC-UB

Bioinformática y Bioestadística

Consultor: Emmanuel Fajardo

Profesor/a responsable: Emmanuel Fajardo

8 de junio de 2021



Esta obra está sujeta a una licencia de Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada [3.0 España de Creative Commons](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/es/)

FICHA DEL TRABAJO FINAL

Título del trabajo:	<i>Refinamiento de la mutación W107R de la enzima KatG de Mycobacterium tuberculosis y estudio de docking con Isoniazida.</i>
Nombre del autor:	<i>María Rodríguez Merchán</i>
Nombre del consultor/a:	<i>Emmanuel Fajardo</i>
Nombre del PRA:	<i>Emmanuel Fajardo</i>
Fecha de entrega (mm/aaaa):	06/2021
Titulación:	<i>Máster universitario en Bioinformática y bioestadística UOC-UB</i>
Área del Trabajo Final:	<i>Área 3, subárea 13: Biología molecular.</i>
Idioma del trabajo:	Castellano
Número de créditos:	15
Palabras clave	<i>Refinamiento, Molecular docking, M.tuberculosis</i>
Resumen del Trabajo (máximo 250 palabras): <i>Con la finalidad, contexto de aplicación, metodología, resultados i conclusiones del trabajo.</i>	
<p>La mutación W107R de la enzima <i>KatG</i> (catalasa-peroxidasa) de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>, el microorganismo que causa la enfermedad de la tuberculosis, es una enzima de la cual no se conoce la estructura tridimensional de sus mutaciones. Esta enzima es importante dentro del microorganismo, ya que es el responsable de activar el profármaco más utilizado para paliar la enfermedad, la Isoniazida, pero en la actualidad se están encontrando problemas de resistencias a este fármaco, provocados por</p>	

mutaciones en la enzima KatG. Además, estudiar y comprender la asociación que tienen los fármacos a las enzimas mediante estudios de *docking* puede ayudar a dilucidar los mecanismos para sintetizar nuevas moléculas capaces de controlar la enfermedad.

En este trabajo se realizan técnicas de modelado in silico para refinar la mutación *W107R* de la enzima KatG de *M.tuberculosis* y poder abrir camino a estudios de docking que aseguren la reducción de resistencia de la isoniazida a la enfermedad tuberculosis.

Mediante el programa de modelado biomolecular *FoldX* y los estudios de acoplamiento mediante *Autodock-Vina*, se han comprobado diferencias estructurales y de unión entre *W107R* y la proteína no mutada *KatG*, concluyendo posibles mecanismos de escape de la enzima mediante mutaciones que conllevan a una menor energía de unión y disminución de interacciones.

Abstract (in English, 250 words or less):

W107R mutation of *KatG* (catalase-peroxidase) enzyme from *Mycobacterium tuberculosis*, this microorganism causes tuberculosis disease. *KatG* is an enzyme whose three-dimensional structure of its mutation is unknown. This enzyme is important in the microorganism, because it is responsible for activating the most widely used prodrug to alleviate the disease, Isoniazid, but actually there are problems of resistance to this drug, caused by mutations in *KatG* enzyme. Furthermore, it is important to study and understand the association of the drug with the enzymes through docking studies. This will help to elucidate the mechanisms to synthesize new molecules capable of controlling the disease.

In this work, in silico techniques will be used for protein refinement (*W107R* mutation of *M.tuberculosis* *KatG* enzyme) This studies will be the first step to docking studies that ensure the reduction of resistance of isoniazid to tuberculosis disease. Through *FoldX* biomolecular modeling program and *Autodock-Vina* coupling studies, structural and binding differences between *W107R* and the non-mutated protein *KatG* have been verified, concluding possible escape mechanisms of the enzyme through mutations that lead to a lower energy of union and decrease of interactions.

Índice

Lista de figuras.....	6
Lista de tablas	8
1 Resumen	9
2 Introducción.....	10
2.1 Contexto y justificación del Trabajo	10
2.2 Objetivos del Trabajo.	11
2.3 Enfoque y método seguido	11
2.4 Planificación del Trabajo.....	12
2.4.1 Tareas:.....	12
2.4.2 Calendario:	13
2.4.3 Hitos:.....	15
2.4.4 Análisis de riesgos:	15
2.4.5 Breve resumen de contribuciones y productos obtenidos	16
2.4.6 Breve descripción de los otros capítulos de la memoria.....	17
3 Marco teórico.	18
3.1 <i>M.tuberculosis</i> y la enfermedad tuberculosis.....	18
3.1.1 Etimología.....	18
3.1.2 Microorganismo.....	18
3.1.3 Historia y epidemiología.....	19
3.1.4 Tratamiento farmacológico.....	20
3.1.5 Enzima <i>KatG</i>	20
3.1.6 Resistencia a antibióticos.....	22
3.1.7 Resistencia a antibióticos de <i>M.tuberculosis</i> : Isoniazida.	23
3.1.8 Refinamiento de proteínas con <i>FoldX</i>	24
3.1.9 Estudios de docking con <i>Autodock-vina</i>	26
4 Metodología.....	28
4.1 Programas y versiones utilizadas.	28
4.2 Métodos.....	29
4.2.1 Refinamiento de la mutación <i>W107R</i> de la enzima <i>KatG</i> de <i>M.tuberculosis</i>	29
4.2.2 Estudio de <i>docking</i> de las enzimas con el fármaco Isoniazida.	31
5 Resultados	39
5.1 Resultados del refinamiento de la mutación <i>W107R</i> de la enzima <i>KatG</i> de <i>M.tuberculosis</i>	39
5.2 Resultados del estudio de <i>docking</i> de las enzimas con el fármaco Isoniazida.	43
5.2.1 Docking de la mutación <i>W107R</i>	43
5.2.2 Docking de la enzima <i>KatG</i> sin mutar.....	45
6 Discusión.....	48
7 Conclusiones	53
7.1 Conclusiones	53
7.2 Líneas de futuro.....	53
7.3 Seguimiento de la planificación	54
8 Autoevaluación.....	56
9 Glosario	57
10 Bibliografía.....	58

Lista de figuras

Figura 1. Diagrama de Gantt febrero y marzo.....	14
Figura 2. Diagrama de Gantt abril y mayo.	14
Figura 3. Diagrama de Gantt mayo y junio.	15
Figura 4. Bacilo de Kock o M.tuberculosis. Fuente: ¹⁷	19
Figura 5. Enzima KatG de M.tuberculosis visualizada en PyMol.....	21
Figura 6. Mutación W107R de la enzima KatG de M.tuberculosis visualizada en PyMol.	22
Figura 7. Estructura del fármaco Isoniazida.	23
Figura 8. Aminoácidos involucrados en la unión con Isoniazida.	23
Figura 9. Fórmula de la energía de Gibbs de FoldX. Fuente: ⁵⁸	25
Figura 10. Visualización en PyMol de KatG (1sj2.pdb) sin residuos.	31
Figura 11. Visualización en PyMol de KatG (1sj2.pdb) con residuos.	31
Figura 12. Isoniazida tras optimización geométrica observada en Pymol.	32
Figura 13. Proteína KatG W107R visualizada en AutodockTools.....	32
Figura 14. Cargas de Kollman añadidas a KatG W107R.	33
Figura 15. Proteína KatG W107R y fármaco Isoniazida.....	33
Figura 16. Aminoácidos del centro de unión marcados.	34
Figura 17. Aminoácidos dentro de la caja para el docking.	34
Figura 18. Parámetros del ligando Isoniazida.	35
Figura 19. Parámetros de Vina.	35
Figura 20. Localización de archivos para la ejecución de Vina.	35
Figura 21. Resultado de docking de KatG W107R y mejor conformación de Isoniazida.	36
Figura 22. Aminoácidos del sitio de unión a Isoniazida de KatG.	36
Figura 23. Caja de docking para KatG.	37
Figura 24. Parámetros del ligando Isoniazida.	37
Figura 25. Parámetros para la salida de Vina.	37
Figura 26. Visualización del docking Isoniazida y KatG con la mejor conformación.	38
Figura 27. Visualización de la enzima W107R de KatG por Yasara (I).	39
Figura 28. Vista de la enzima W107R de KatG por Yasara (II).	40
Figura 29. Forma tridimensional de la enzima W107R de KatG tras el Repair Object.	40
Figura 30. Visualización del archivo Object2	41
Figura 31. Visualización de la enzima KatG en Yasara.	42
Figura 32. BLASTp entre W107R inicial y Object2.	42
Figura 33. BLASTp entre Object2 y KatG.....	43
Figura 34. Resultados de Vina para KatG W107R.....	43
Figura 35. Conformaciones obtenidas en el estudio de docking para W107R e Isoniazida (I).....	43

Figura 36. Conformaciones obtenidas en el estudio de docking para W107R e Isoniazida (II).	44
Figura 37. Mejor conformación obtenida en el estudio de docking para W107R e Isoniazida.....	44
Figura 38. Resultados obtenidos del programa PIPL para W107R (I).	44
Figura 39. Resultados del programa PILP de KatG W107R.	45
Figura 40. Resultados obtenidos del programa PIPL para W107R (II).....	45
Figura 41. Resultados de docking de KatG.	45
Figura 42. Conformaciones obtenidas en el estudio de docking para KatG e Isoniazida (I).	46
Figura 43. Conformaciones obtenidas en el estudio de docking para KatG e Isoniazida (II).....	46
Figura 44. Conformaciones obtenidas en el estudio de docking para KatG e Isoniazida (III).	46
Figura 45. Resultados obtenidos del programa PIPL para KatG.....	47
Figura 46. BLASTp W107 refinada y KatG.....	48
Figura 47. BLASTp W107 no refinada y KatG.....	48
Figura 48. Uniones de KatG y KatG W107R tras el docking	50
Figura 49. Tipos de uniones de KatG y KatG W107R tras el docking.	50
Figura 50. Puentes de hidrógeno de KatG W107R.	51
Figura 51. Puentes de hidrógeno de KatG.	51
Figura 52. Uniones hidrofóbicas de KatG W107R.....	51
Figura 53. Uniones hidrofóbicas de KatG.	51
Figura 54. Uniones pi-stacking de KatG W107R.....	52
Figura 55. Planificación inicial del trabajo.....	54
Figura 56. Planificación final del trabajo	54

Lista de tablas

Tabla 1. Planificación de tareas por tiempo.	12
Tabla 2. Hitos programados.....	15
Tabla 3. Términos del glosario.	57

1 Resumen

La mutación *W107R* de la enzima *KatG* (catalasa-peroxidasa) de *Mycobacterium tuberculosis*, el microorganismo que causa la enfermedad de la tuberculosis, es una enzima de la cual no se conoce su estructura tridimensional. Esta enzima es importante dentro del microorganismo, ya que es el responsable de activar el profármaco más utilizado para paliar la enfermedad, la Isoniazida, pero en la actualidad se están encontrando problemas de resistencias a este fármaco, provocados por mutaciones en la enzima *KatG*. Además, estudiar y comprender la asociación que tienen los fármacos a las enzimas mediante estudios de *docking* puede ayudar a dilucidar los mecanismos para sintetizar nuevas moléculas capaces de controlar la enfermedad.

En este trabajo se realizan técnicas de modelado in silico para refinar la mutación *W107R* de la enzima *KatG* de *M.tuberculosis* y poder abrir camino a estudios de docking que aseguren la reducción de resistencia de la isoniazida a la enfermedad tuberculosis.

Mediante el programa de modelado biomolecular *FoldX* y los estudios de acoplamiento mediante *Autodock-Vina*, se han comprobado diferencias estructurales y de unión entre *W107R* y la proteína no mutada *KatG*, concluyendo posibles mecanismos de escape de la enzima mediante mutaciones que conllevan a una menor energía de unión y disminución de interacciones.

2 Introducción

2.1 Contexto y justificación del Trabajo

Desde 1953, cuando Watson y Crick propusieron la estructura de doble hélice del ADN¹ y desde 1955, cuando Sanger secuenció la insulina bovina², siendo así la primera proteína secuenciada de la historia, se empezó a hablar de Bioinformática. La Bioinformática ha surgido de la unión entre la Informática y la Biología con el objetivo tratar un gran volumen de datos biológicos generados en los últimos años³. La Bioinformática es un campo que abarca numerosas ciencias: Biología molecular, genética, ciencias de la computación, matemáticas y estadística⁴. El gran auge de la Bioinformática ha puesto a disposición de investigadores y público aficionado una gran cantidad de datos que permiten el estudio científico de forma computacional con el objetivo de facilitar la globalización de datos, dar oportunidades a cualquier interesado en el campo y facilitar las investigaciones a los científicos. Un ejemplo es la base de datos *Protein Data Bank* ([PDB](#)), la cual cuenta con 175.508 estructuras de macromoléculas biológicas (a fecha de 7 de marzo de 2021) y contiene información sobre su estructura 3D, su secuencia, mapas de densidad, visores 3D, herramientas de análisis de alineación de estructura por pares, etc...

Toda esta digitalización global de estudios y resultados llega a cualquier área de la ciencia y puede ayudar a resolver grandes problemas encontrados en la sociedad actual, como es, en este caso, la resistencia a antibióticos. Los antibióticos son medicamentos que combaten las infecciones bacterianas y se presenta resistencia a ellos cuando las bacterias cambian en respuesta al uso de los fármacos⁵. La resistencia a los antibióticos está aumentando de forma peligrosa y rápida en todo el mundo⁶. Están surgiendo nuevos mecanismos de resistencia de las bacterias que se extienden por todo el mundo, lo que amenaza la capacidad de tratar enfermedades. Una lista cada vez mayor de infecciones, como neumonía, tuberculosis, intoxicación de la sangre, gonorrea y enfermedades transmitidas por los alimentos, se está volviendo más difícil, y a veces imposible, de tratar, ya que los fármacos conocidos para tratarlos están perdiendo efectividad y dejan de funcionar contra estas infecciones, lo que está suponiendo una de las mayores amenazas para la salud mundial y alimentaria en la actualidad⁷.

En este caso se conoce, que la resistencia al fármaco isoniazida se deben a mutaciones en la enzima *KatG* de *M.tuberculosis*, por lo que estudiar los cambios estructurales de esta enzima puede abrir las puertas al control de resistencias sobre esta enfermedad⁸.

Por tanto, la temática escogida en este TFM es utilizar técnicas de modelado in silico para refinar la enzima mutada de *KatG* de *M.tuberculosis* con el fin de refinar su estructura conocida mediante microscopia electrónica e impulsar estudios de docking que expliquen la resistencia al fármaco Isoniazida al comparar la estructura de la enzima mutada con la enzima sin mutar, que sí es efectiva contra la Isoniazida.

2.2 Objetivos del Trabajo.

En este TFM se plantean dos objetivos generales:

- Refinar la estructura 3D de la enzima catalasa-peroxidasa (*KatG*) de la mutante *K107R* de *M.tuberculosis* a partir de los programas *FoldX* y *ModelX*.
- Realizar estudios de docking del fármaco Isoniazida con la enzima *KatG* (variante *W107*) de *M.tuberculosis* y con la enzima *KatG* sin mutar .

Además, se plantean unos objetivos específicos:

- Comprender y manejar los programas de modelado biomolecular *FoldX* y *ModelX*.
- Describir la estructura 3D de la enzima catalasa-peroxidasa (*KatG*) de *M.tuberculosis* (Mutante *W107R*).
- Comprender y manejar el programa Autodock-vina, para el estudio de docking.
- Realizar una comparación de los estudios de docking de ambas enzimas.
- Observar las diferencias entre la enzima mutada y sin mutar y su relación con la resistencia presentada por el fármaco.

2.3 Enfoque y método seguido

En este trabajo se espera conseguir una respuesta a la pregunta: ¿Se observan diferencias estructurales en la unión del fármaco Isoniazida a las enzimas *KatG*, mutada y sin mutar (*W107R*) de *M.tuberculosis*, que expliquen la actual resistencia al fármaco que se está encontrando en muchas personas que combaten la enfermedad? Consultando la bibliografía, se encuentra que la resistencia se debe a una mutación en el gen que codifica la proteína *KatG*, que causa un cambio de una Serina por una Treonina⁹. Por tanto, se espera encontrar diferencias visibles en la unión con la Isoniazida al realizar los estudios de docking. Para poder realizar este paso, anteriormente se espera refinar sin dificultad la enzima mutada (*W107R*) de *KatG* mediante *ModelX* y *FoldX*, la cual no tiene

estructura conocida mediante cristalización y solo se ha obtenido mediante técnicas de microscopía electrónica.

Por otro lado, se espera una correcta entrega de cada uno de los hitos en los que se ha estructurado el trabajo, encontrado en la PEC 2 la estructura refinada de la enzima mutada, en la PEC 3 comenzar a ver los resultados de los estudios de docking que generen la redacción de la memoria para la PEC 4. Se espera conseguir la información y las imágenes de las enzimas para cada una de su temporalización propuesta y una presentación final con la que exponer este trabajo que recoja de forma clara y organizada los pasos y los resultados obtenidos.

Con este trabajo, finalmente, se espera poder conocer nueva información sobre la resistencia a antibióticos y conocer el camino por el que *M.tuberculosis* está luchando contra los fármacos que controlaban una enfermedad que ha devastado tanto al mundo unas décadas atrás y, que, hoy en día, vuelve a aumentar el número de casos.

2.4 Planificación del Trabajo

2.4.1 Tareas:

En la tabla 1 se presentan las tareas planificadas inicialmente junto a la duración que se estima para cada una de ellas. Se planea seguir estos pasos con la duración mostrada, pero se corregirá la tabla según el tiempo real que lleven dichas tareas.

Tabla 1. Planificación de tareas por tiempo.

TAREAS	DURACIÓN
1. DOCUMENTACIÓN INICIAL	39 h
1.1. Búsqueda de enzimas	15 h
1.2. Elaboración de proyecto	5 h
1.3. Redacción PEC 0	4 h
1.4. Documentación programas a utilizar	4 h
1.5. Descarga de programas	2 h
1.6. Redacción PEC 1	9 h
2. REFINAMIENTO ENZIMA MUTADA	100 h

2.1. Instalación y comprensión de programas	30 h
2.2. Descarga de secuencia y archivo .pdb de PDB	1 h
2.3. Visualización de la secuencia en PyMol	1h
2.4. Ajuste de estructura en el programa	50 h
2.5. Comparación de enzimas según estructura	3 h
2.6. Redacción PEC 2	15 h
3. ESTUDIO DE DOCKING CON FÁRMACO ISONIAZIDA	98 h
3.1. Instalación y comprensión de programas	20 h
3.2. Obtención de Isoniazida y optimización geométrica	3 h
3.3. Estudio de Docking de Isoniazida con enzima mutada	30 h
3.4. Estudio de Docking de Isoniazida con enzima sin mutar	20 h
3.5. Comparación de enzimas según docking	5 h
3.6. Redacción PEC 3	20 h
4. ELABORACIÓN DE LA MEMORIA (PEC 4)	50 h
5. ELABORACIÓN DE LA PRESENTACIÓN (PEC 5ª)	35 h
6. DEFENSA PÚBLICA Y PREPARACIÓN (PEC 5b)	20h
7. AUTOEVALUACIÓN FINAL	1h
TOTAL	343 h

2.4.2 Calendario:

Se expone un diagrama de Gantt (Figura 1, Figura 2 y Figura 3) elaborado con Microsoft Excel, donde se puede ver la planificación del proyecto, teniendo en cuenta la duración de las tareas y los hitos.

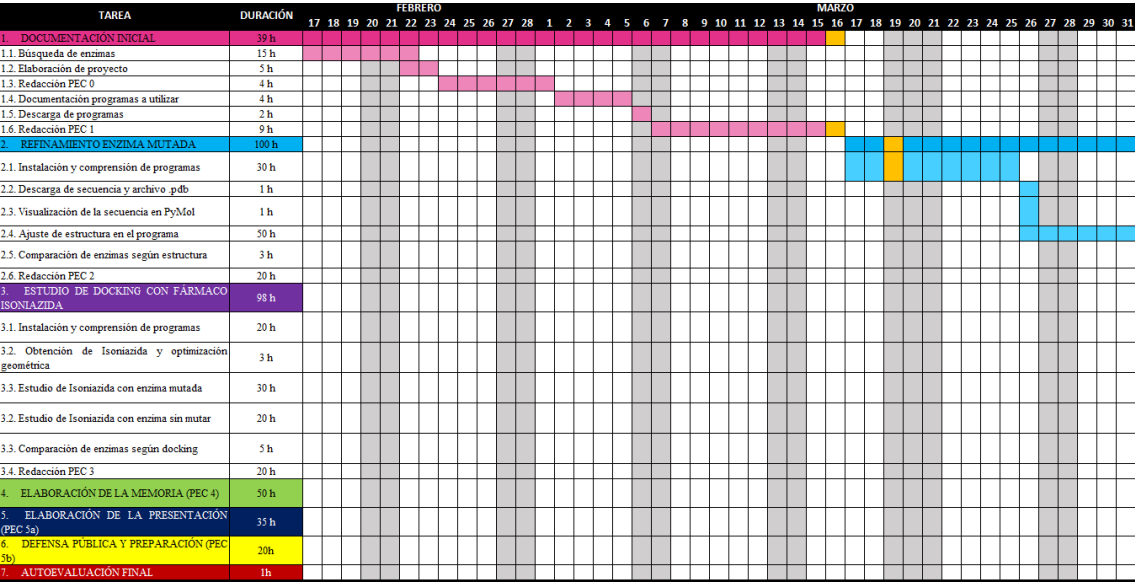


Figura 1. Diagrama de Gantt febrero y marzo.

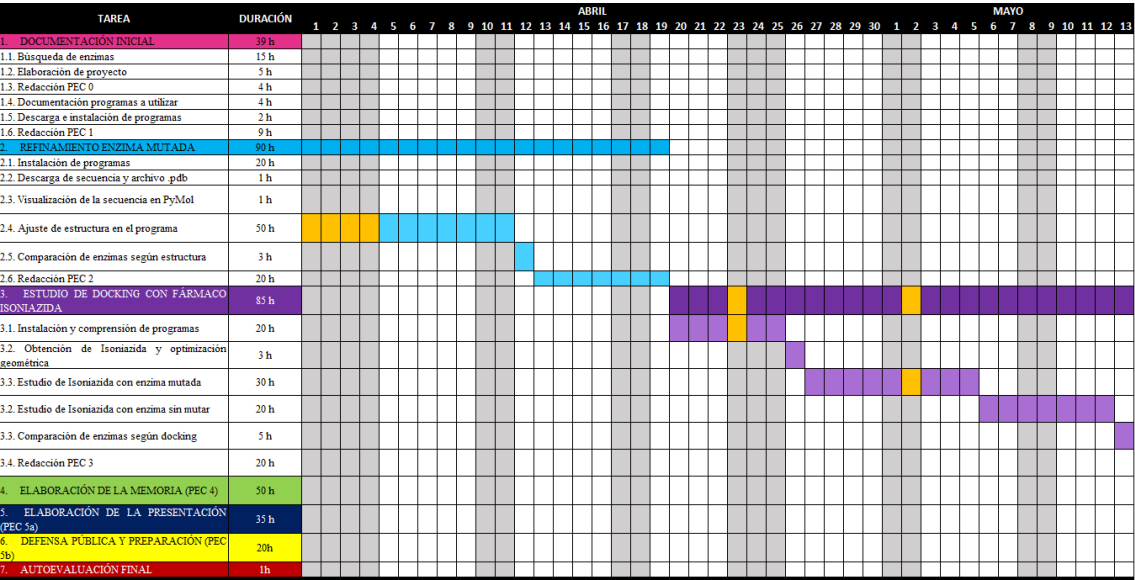


Figura 2. Diagrama de Gantt abril y mayo.

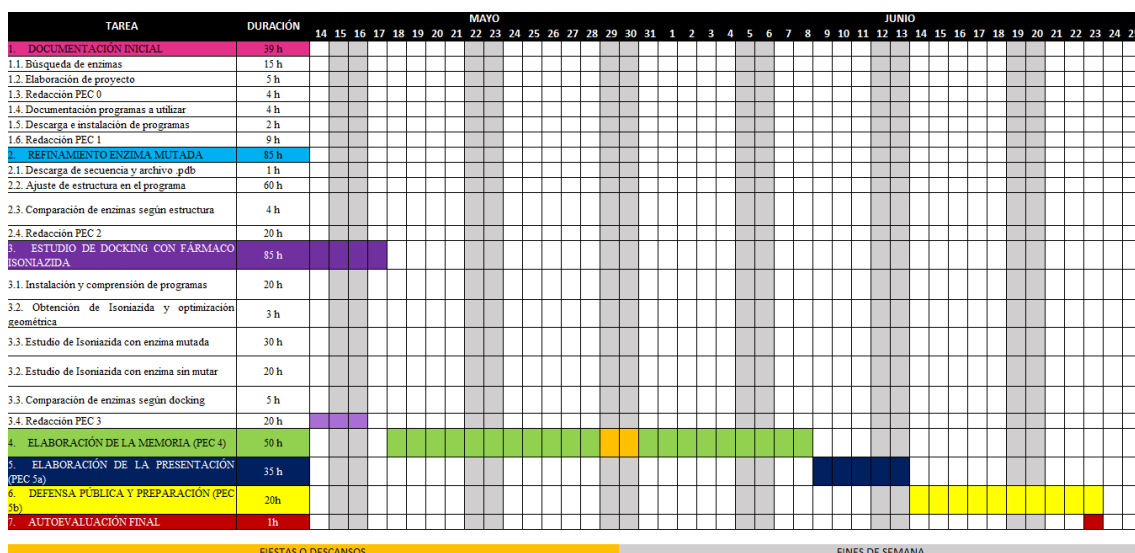


Figura 3. Diagrama de Gantt mayo y junio.

2.4.3 Hitos:

Los hitos que se planean ir alcanzando en cada una de las Pruebas de Evaluación Continua (PEC) se pueden observar en la Tabla 2.

Tabla 2. Hitos programados.

HITO	Fecha de inicio	Fecha final
Definición de los contenidos del trabajo (PEC 0)	17/02/2021	01/03/2021
Plan de trabajo (PEC 1)	02/03/2021	16/03/2021
Desarrollo del trabajo: Refinamiento enzima mutada (PEC 2)	17/03/2021	19/04/2021
Desarrollo del trabajo 2: Estudios de docking (PEC 3)	20/04/2021	17/05/2021
Elaboración de la memoria (PEC 4)	18/05/2021	08/06/2021
Elaboración de la presentación (PEC 5 ^a)	09/06/2021	13/06/2021
Defensa pública y preparación (PEC 5b)	14/06/2021	23/06/2021

2.4.4 Análisis de riesgos:

En la planificación realizada, se han seleccionado 11 días de fiesta o descanso, ya que no se espera perder más días sin trabajar en este proyecto. Aun así, siempre serán

remplazables si se encuentra algún problema o complicación con algunas de las tareas, para aumentar el tiempo de dedicación al proyecto.

Teniendo en cuenta el tipo de TFM y su planificación, no se espera en un inicio tener problemas de tiempo, ya que se estima que cada parte tenga suficiente temporalidad para realizarse perfectamente y, salvo problemas personales impredecibles, se ajusta perfectamente a la situación individual. Tampoco se espera tener problemas con la escritura u entrega de cada uno de los hitos.

Los principales problemas que se esperan encontrar surgen al hablar de los programas informáticos a utilizar, tanto para refinar la estructura 3D de la enzima (*FoldX*), como para los estudios de docking (*Autodock Vina*), ya que es la primera vez que se van a utilizar y no se tienen conocimientos iniciales sobre ello, por lo que se prevé como la tarea más compleja de este trabajo y la que más retrasos, dudas, errores y dificultades pueden causar.

No obstante, hablando sobre los objetivos de este trabajo, se cuenta con una posible complicación a la hora de observar las diferencias estructurales de las enzimas y uniones con la Isoniazida. Se espera encontrar diferencias significativas que expliquen la resistencia a dicho fármaco, pero puede ser que estos estudios no nos lleven a lo esperado.

2.4.5 Breve resumen de contribuciones y productos obtenidos

Los productos obtenidos durante la realización de este TFM son los siguientes:

1. Mutación *W107R* de la enzima *KatG* de *M.tuberculosis* refinada: Se ha obtenido un archivo .pdb con la enzima completa de aminoácidos, sin agua, con las cargas adaptadas y todos los enlaces de átomos. Esto proporciona la estructura 3D perfeccionada para estudios posteriores.
2. *Docking* de la mutación *W107R* de la enzima *KatG* de *M.tuberculosis* con el fármaco Isoniazida: Se ha obtenido el mejor acoplamiento del fármaco a la enzima, con sus energías de afinidad, sus interacciones y sus tipos de uniones.
3. *Docking* de la enzima *KatG* de *M.tuberculosis* con el fármaco Isoniazida: Se ha obtenido el mejor acoplamiento del fármaco a la enzima, con sus energías de afinidad, sus interacciones y sus tipos de uniones.

Todos los archivos se pueden encontrar en el repositorio de *github*, que se pueden trabajar, visualizar y están preparados para trabajar con ellos: <https://github.com/mariarm23/TFM/>

2.4.6 Breve descripción de los otros capítulos de la memoria.

El resto de la memoria está escrita siguiendo el formato de artículo científico. La primera parte es una introducción donde se exponen los conocimientos previos para la realización del trabajo, la metodología seguida con todos los programas que se han utilizado y sus debidas versiones, los resultados que se han obtenido tanto del refinamiento como de los estudios de docking, una discusión final de los resultados obtenidos y sus respectivas conclusiones.

3 Marco teórico.

3.1 *M.tuberculosis* y la enfermedad tuberculosis.

3.1.1 Etimología.

Tuberculosis proviene del latín *tuberculum* (pequeño tumor o protuberancia). Se ha relacionado también con *tumeo* (presentar hinchazón). El sufijo *-osis* significa enfermedad. Por tanto, es una enfermedad que presenta tubérculos y granulomas en el enfermo, sobre todo en los pulmones.

Esta palabra fue establecida por el médico y profesor alemán Johann Lucas Schönllein en 1839 en Berlín. En 1950 empezó a usarse en Francia y en Italia, en 1960 en Inglaterra y en 1884 en España. Aun así, la enfermedad es bastante más antigua.

En castellano se denominaba tisis o tísica, palabras que proceden del latín *phthisis*. Pese a empezar a usarse en 1839, en 1689 el médico inglés Richard Morton descubrió tubérculos en los pulmones de un paciente. Posteriormente fue cuando Schönllein estableció la palabra tuberculosis para referirse a esta enfermedad¹⁰.

3.1.2 Microorganismo.

Mycobacterium tuberculosis (Figura 4), también denominado Bacilo de Koch, es una bacteria que pertenece a la familia *Mycobacteriaceae*. Dichos bacilos se caracterizan por tener forma curvada, son ácido-alcohol resistentes, aerobios, inmóviles, no producen esporas¹¹, no tienen cápsula y se trata de bacterias Gram positivas (+)¹².

Estos bacilos, además, tienen una capa externa muy rica en lípidos, glicolípidos y polisacáridos, entre los que destacan el ácido micólico y el peptidoglicano que le otorgan a la bacteria hidrofobicidad, causando resistencia a los medicamentos¹³.

Asimismo, tiene un genoma de 4.411.529 pares de bases¹⁴ rico en guanina y citosina¹⁵. Se trata de una bacteria prototrófica con un metabolismo flexible que tiene una gran capacidad de adaptación, acto que se ha relacionado con su patogénesis y su estructura, debido a que presentan gran resistencia a los cambios. Esta adaptación hacia la privación de nutrientes, hipoxia, condiciones de estrés exógeno o el entorno intrafagosomal se

deben, en mayor medida, a los cambios adaptativos en las señales y redes reguladoras que ocurren durante el procesado génico¹⁶.



Figura 4. Bacilo de Kock o *M. tuberculosis*. Fuente: ¹⁷.

M. tuberculosis dentro del su hospedador es de crecimiento lento y es capaz de adquirir un estado de latencia¹⁸. Puede vivir en lugares oscuros y con una temperatura baja durante meses. Sin embargo, en telas, en cadáveres o abonos puede vivir algunas semanas. Se trata de una bacteria sensible al calor y a la luz, tanto solar como ultravioleta; resistente al frío y a condiciones de baja humedad. El estado de latencia suele adoptarse cuando las condiciones del medio son críticas para su supervivencia^{11,19}.

Pese a ser un patógeno pulmonar, *M. tuberculosis* puede causar infección en la mayoría de los órganos y tejidos del organismo, aunque no suele afectar al corazón, al páncreas, al tiroides ni al tejido muscular esquelético²⁰.

3.1.3 Historia y epidemiología.

La tuberculosis es una enfermedad antigua. Se ha llegado a encontrar en restos de humanos precolombinos, en egipcios tempranos y en neolíticos. Por los hallazgos realizados, además, se sabe que el auge de la enfermedad fue tras la revolución industrial, ya que las condiciones de vida eran pobres, la calidad laboral precaria y los niveles de contaminación y de gases no estaban regulados. En los S. XVII y XVIII fue la enfermedad responsable de una cuarta parte de todas las muertes de adultos en Europa²¹.

La única solución que tenían hasta el momento era~~n~~ confinar a los enfermos en sanatorios para prevenir el contagio de más personas. Hasta 1946 no se empezó el tratamiento para esta enfermedad cuando se descubrió el antibiótico estreptomicina y cuando, en 1952, surgió la isoniazida, un fármaco antituberculoso, que permitió controlar

muchos casos de tuberculosis. En 1970 con la rifampicina, la asistencia médica efectiva aumentó con éxito²².

A pesar de estos avances, la tuberculosis es una enfermedad que ha vuelto a aparecer en los últimos años. Como otras muchas enfermedades infecciosas que han vuelto a subir su prevalencia, está dentro del grupo de las denominadas Enfermedades Emergentes. Se cree que este suceso es debido a la pobreza, el tabaquismo, la desnutrición²³, la resistencia a fármacos²⁴, la inmigración y, en África, debido a la multitud de casos de VIH que se están diagnosticando²⁵. Esto hace que, aunque en las décadas anteriores a 1980 había habido un gran declive, la tuberculosis sigue estando entre las diez primeras causas de muerte en el mundo, siendo su disminución anual de un 3% en la tasa de mortandad y un 2% en la incidencia²⁶.

3.1.4 Tratamiento farmacológico.

Los infectados con tuberculosis siguen la terapia propuesta por la Organización Mundial de la Salud donde aquellos que no presentan resistencia a los fármacos y tienen una tuberculosis activa y sintomática son tratados mediante una fase intensiva con los siguientes medicamentos: Isoniazida, rifampicina, pirazinamida y etambutol durante una duración de dos meses²⁷. Posteriormente, en la fase de continuación, la cual dura cuatro meses son tratados con isoniazida y rifampicina. Estos medicamentos son denominados “medicamentos de primera línea”.

Hay individuos que presentan resistencia a los medicamentos contra la enfermedad. Dentro de este grupo se pueden encontrar distintos tipos de resistencia²⁸:

- Monorresistencia.
- Polirresistencia.
- Resistencia múltiple o tuberculosis multirresistente (MDR-TB).
- Resistencia extensa o tuberculosis extensamente resistente (XDR-TB).
- Resistencia extrema o total.

El fracaso del tratamiento farmacológico está asociados prácticamente a la resistencia a fármacos, aunque también suele ocurrir por una duración breve o por incumplimiento de las dosis²⁹.

3.1.5 Enzima *KatG*.

La enzima *KatG* (Figura 5) es una enzima bifuncional homodependiente con actividad catalasa y peroxidasa, denominadas hidroperoxidasas I, de amplio espectro, que oxida varios donantes de electrones. Está codificada por el gen *katG* que genera una variedad de especies reactivas para la actividad bactericida³⁰. Protege *M.tuberculosis* contra las

especies tóxicas de oxígeno reactivo (ROS), incluido el peróxido de hidrógeno y los peróxidos orgánicos, y por lo tanto contribuye a su supervivencia dentro de los macrófagos del huésped al contrarrestar la explosión oxidativa de los fagocitos. También muestra una actividad de peroxinitritasa eficaz, que puede ayudar a la bacteria a persistir en los macrófagos. Es una enzima clave contra el tratamiento frente a la enfermedad tuberculosis, ya que esta enzima, en *M.tuberculosis* presenta la inhibición específica de la síntesis de ácidos micólicos, sin afectar la de otros ácidos grasos, por lo que inhabilita a la bacteria y consigue que se elimine del cuerpo al que infecta³¹.

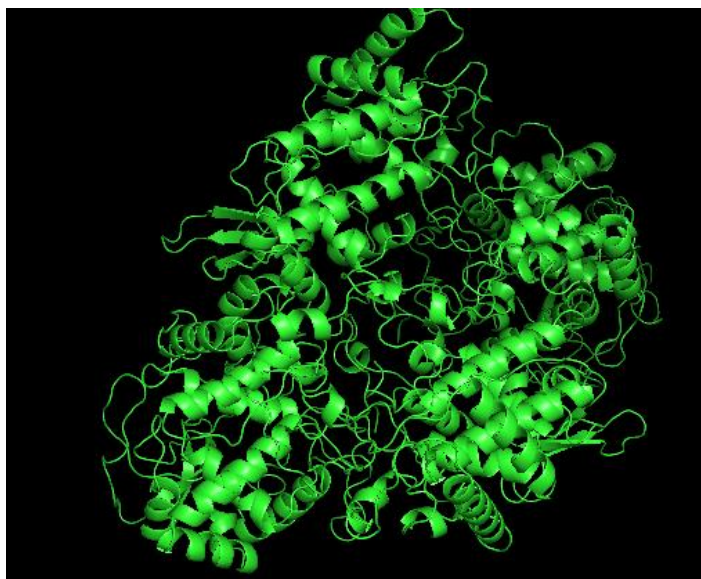


Figura 5. Enzima KatG de *M.tuberculosis* visualizada en PyMol.

Se conoce que más del 60% de las mutaciones conocidas que desencadenan la resistencia al fármaco principal (Isoniazida), es la enzima *KatG*³². Las mutaciones en *KatG* que eliminan o disminuyen su actividad catalasa-peroxidasa provocan resistencia a Isoniazida porque reducen el grado de activación del fármaco. Varias alteraciones en el gen *katG* dan como resultado una función enzimática reducida y una disminución de la sensibilidad a INH³³, pero su estructura sigue siendo poco estudiada y desconocida, aunque se sabe que es un homodímero de 82 kDa³⁴. Estudios de rayos X han informado que las mutaciones ocurridas en el gen *katg* que codifican la proteína, causan una delección en el extremo C completo del gen, lo que da como resultado una pérdida de la función catalasa-peroxidasa y un aumento de la resistencia a Isoniazida³⁵, pero los mecanismos de la resistencia no pueden observarse *in vitro*, ya que las mutaciones predominantes *in vivo*, no han sido capaz de simularse en un laboratorio³⁶.

La enzima *KatG* tiene importantes mutaciones conocidas, como la mutación *W107R*³⁷ (Figura 6), cuya estructura es conocida mediante técnicas de microscopía crioelectrónica (Cryo-EM), un método que permite visualizar los efectos estructurales de las mutaciones de resistencia. Se trata de una estructura con una resolución de 2,7Å³⁸.

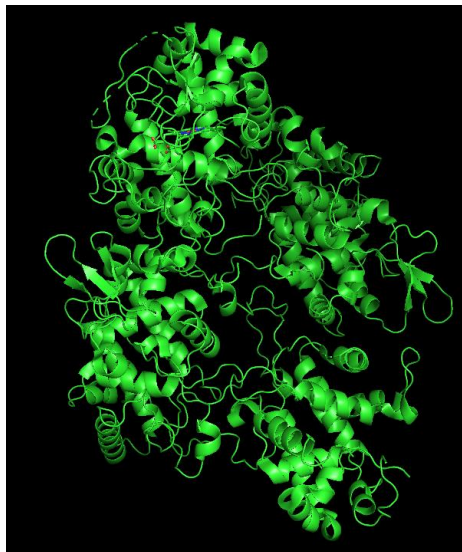


Figura 6. Mutación W107R de la enzima *KatG* de *M.tuberculosis* visualizada en PyMol.

3.1.6 Resistencia a antibióticos.

Los antibióticos son medicamentos que combaten las infecciones causadas por bacterias^{39,5}. Desde el descubrimiento de la penicilina por Alexander Fleming en 1928⁴⁰, los antibióticos han sido el camino para combatir infecciones y enfermedades bacterianas⁴¹. Los antibióticos han sido remedios para combatir microorganismos que tuvieron éxito desde el primer momento, ya que son los únicos fármacos que no afectan directa y exclusivamente al paciente. De hecho, los antibióticos se dirigen a la biología de los microorganismos⁴², pero tienen el inconveniente de que, por unas causas u otras, se ha observado resistencia a casi todos los antibióticos que se han desarrollado⁴⁰, por lo que las infecciones bacterianas se han convertido en una amenaza de nuevo.

La resistencia a antibióticos es el proceso por el que las bacterias dejan de ser sensibles a los fármacos administrados, ya sea por acostumbrarse a dichas sustancias o por generar mecanismos en su interior que impidan la unión a los fármacos, el acceso a su medio interno o la capacidad de afectar su ciclo de vida y/o reproducción³⁹. Las causas de las resistencias a antibióticos ha sido un tema muy hablado y controvertido⁴³, pero los motivos que más han afectado a la resistencia son los siguientes: Un uso prolongado e innadecuado⁴⁴, el uso extensivo para el ganado y los campos agrícolas⁴⁵, la ausencia de

nuevos antibióticos (debido a que las farmacéuticas no están interesadas en nuevos fármacos por motivos económicos)⁴⁶, el gran número de antibióticos que se toman y han tomado sin receta médica y las recetas inadecuadas sin corroborar si las infecciones eran bacterianas o víricas⁴⁷.

3.1.7 Resistencia a antibióticos de *M.tuberculosis*: Isoniazida.

La isoniazida (Figura 7) es un profármaco activado por la enzima catalasa peroxidasa (*KatG*) de *M.tuberculosis*. Una vez el fármaco es activado, la misma activación produce especies reactivas de oxígeno como radicales superóxido, peróxido e hidroxilo, óxido nítrico y especies orgánicas reactivas³⁰. Las especies reactivas y los radicales libres afectan a dianas celulares de la bacteria, afectando a su actividad bactericida, aunque no se conocen todos los mecanismos de la activación de la Isoniazida. Uno de los mecanismos conocidos radica en la formación de un aducto entre el fármaco y la enzima NAD, que también favorece desencadenando la actividad antituberculosa³⁷.

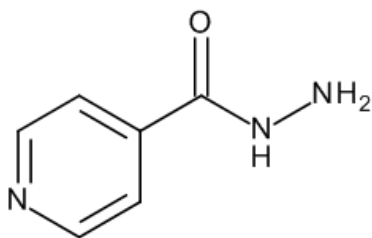


Figura 7. Estructura del fármaco Isoniazida.

La Isoniazida se une a la enzima *KatG* de *M.tuberculosis* por cinco de los residuos que contiene: Trp107, Asp137, Tyr229, Met255 y Ser315, que forman un bolsillo de unión⁴⁸ y pueden observarse en la Figura 8.

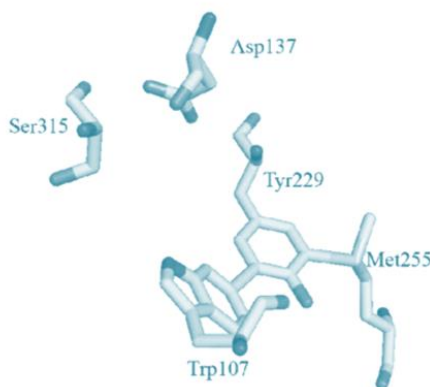


Figura 8. Aminoácidos involucrados en la unión con Isoniazida.

Dentro de estos cinco aminoácidos, el más destacado es la Ser315, ya que es un punto estratégico frente a la resistencia, ya que presenta polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) en el codón del gen *katg*⁴⁹. Algunas de las mutantes de *KatG* presentan mutaciones en este aminoácido, que para ser clave en la interacción entre la Isoniazida y el grupo hemo al que está unido la proteína, causando la inestabilidad del complejo y conllevando a una mala activación del profármaco⁵⁰.

3.1.8 Refinamiento de proteínas con *FoldX*.

Refinar una proteína consiste en obtener un modelo termoestable de un modelo de proteína 3D ya existente que tiene una alta energía e incluso, huecos en su cadena de aminoácidos con el fin de acercarlos a su precisión experimental para proseguir con estudios computacionales. Estos métodos se utilizan cuando no hay posibilidad de cristalizar la proteína, ya sea por motivos económicos, procedimentales o por la inestabilidad de dicha proteína. Son métodos ampliamente utilizados y útiles, ya que normalmente las diferencias que presentan con la proteína nativa son pequeñas⁵¹.

Conocer la estructura de una proteína es esencial para conocer el funcionamiento de los organismos y de las enfermedades. Actualmente, gracias a la gran cantidad de datos, repositorios, bases de datos y Big Data, es posible almacenar millones de archivos de información que facilitan el trabajo científico⁵². Los métodos actuales para refinar estructuras proteicas de forma computacional incluyen simulaciones de dinámica molecular, métodos de muestreo relacionados o protocolos de optimización de estructuras iterativas; aunque sigue siendo muy difícil alcanzar una precisión experimental⁵¹. La estabilidad mejorada de la proteína en general se puede lograr debido a varios factores, por ejemplo, aumentando la termoestabilidad, la tolerancia a la sal o la tolerancia hacia disolventes orgánicos y, en consecuencia, implica diferentes enfoques bioinformáticos⁵³.

El método experimental básico para conseguir estructuras proteicas es la cristalografía de rayos X. El objetivo es conseguir obtener una estructura molecular tridimensional de un cristal, para ello es necesario cristalizar la muestra purificada a alta concentración y exponerlos a un haz de rayos X, que muestra manchas dando información de la estructura a partir de la cual se puede calcular un mapa de la densidad de los electrones para ajustar una conformación termodinámicamente favorecida⁵⁴. El problema principal de este método es que hay muchas proteínas, sobre las proteínas de membrana, que no pueden cristalizarse, ya sea por su inestabilidad, su difícil extracción, su incompatibilidad con el disolvente o por ser incapaz de simular su medio de función fue del organismo del que

forma parte⁵⁵, por lo que el modelado y el refinamiento de proteínas mediante métodos computacionales y bioinformáticos tienen una gran importancia biológica⁵⁶.

Uno de los programas que nos permite utilizar técnicas de modelado molecular y refinamiento de proteínas es *FoldX*⁵⁷. *FoldX* es un programa que fue desarrollado para la evaluación del efecto de mutaciones sobre la estabilidad, plegamiento y dinámica de proteínas y ácidos nucleicos. Basa su funcionamiento en calcular la energía libre (en kcal/mol), donde tiene en cuenta los parámetros de solvatación, las moléculas de agua, enlaces de Van der Waals, enlaces de hidrógeno, interacciones de Coulomb y no suele tener penalizaciones debidas a la entropía. La energía libre de Gibbs es la cantidad máxima de trabajo de no expansión que se puede extraer de un sistema cerrado termodinámicamente⁵⁸. Nuestra proteína será estable si su energía de Gibbs es cercana a 0, ya que, si es negativa, el proceso será espontáneo y generará muchas mutaciones que la alejarán de la estabilidad y una energía de Gibbs alta constará de un proceso no espontáneo que necesitará energía para que ocurran reacciones⁵⁹. El cálculo de energía libre de Gibbs se basa en la fórmula de la Figura 9⁵⁸.

$$\begin{aligned} \Delta G = & a \cdot \Delta G_{\text{vdw}} + b \cdot \Delta G_{\text{solvH}} + c \cdot \Delta G_{\text{solvP}} + d \\ & \cdot \Delta G_{\text{wb}} \\ & + e \cdot \Delta G_{\text{hbond}} + f \cdot \Delta G_{\text{el}} + g \cdot \Delta G_{\text{kon}} + h \cdot T \Delta S_{\text{mc}} \\ & + k \cdot T \Delta S_{\text{sc}} + l \cdot \Delta G_{\text{clash}}. \end{aligned}$$

Figura 9. Fórmula de la energía de Gibbs de FoldX. Fuente: ⁵⁸.

Este software incluye diferentes funciones, como RepairPDB, BuildModel, PrintNetworks, AnalyseComplex, estabilidad..., pero también permite el cálculo de las energías totales de los objetos.⁶⁰ FoldX es un programa escrito en lenguaje de programación C++, aunque tiene una interfaz fácil de usar con el complemento Yasara, el cual está escrito en lenguaje de programación Python⁵³. Estos programas muestra un rendimiento y una calidad alta en comparación con el tiempo necesario para realizar el cálculo⁶⁰. Yasara, a su vez, es un programa de modelado y simulación de gráficos moleculares con una interfaz de usuario intuitiva, gráficos fotorrealistas que crea un gran nivel de interacción con la realidad artificial. Funciona con una marco de desarrollo *Portable Vector Language (PVL)* que permite un gran rendimiento⁶¹.

3.1.9 Estudios de docking con *Autodock-vina*.

La finalización del proyecto genoma humano, la creación de multitud de nuevos fármacos, las técnicas de cristalización y modelado molecular, la capacidad de almacenaje de datos científicos, la reciente necesidad por conocer los mecanismos de enfermedad y la bioinformática han permitido estrategias computacionales que permiten el descubrimiento de fármacos, su funcionalidad y sus mecanismos de acción⁴⁸. La técnica que permite ver cómo un ligando se acopla con una diana, ya sea una proteína o una familia de proteínas, se denomina técnica de acoplamiento molecular o *docking*. El acoplamiento molecular es útil tanto para modelar la interacción entre un ligando y una proteína, como para extraer información de los procesos bioquímicos que los fármacos experimentan para activarse y/o para ejecutar su función antimicrobiana⁶².

El acoplamiento molecular es un procedimiento computacional que intenta predecir la unión no covalente de macromoléculas o, más frecuentemente, de una macromolécula (receptor) y una molécula pequeña (ligando) de manera eficiente, comenzando con sus estructuras no unidas, estructuras obtenidas de simulaciones o modelos de homología. etc. El objetivo es predecir las conformaciones unidas y la afinidad de unión⁶³.

Para poder utilizar las técnicas de acoplamiento se recomienda conocer el sitio de unión del ligando a la proteína, ya que facilita y aumenta la eficacia del estudio, además de permitir obtener información comparativa con otro tipo de ligandos de forma rápida y sencilla. El objetivo de los estudios de *docking* es proporcionar una predicción de la estructura receptor-ligando utilizando cálculos en los que se estudió la interacción del ligando con el centro de unión o sitio activo de la proteína y reproducen la unión de dichas moléculas clasificando las posibles conformaciones según su afinidad de unión⁶⁴.

El acoplamiento es computacionalmente difícil porque hay muchas formas de juntar dos moléculas donde el número de posibilidades crece exponencialmente con el tamaño de los componentes⁶⁵.

Los primeros métodos de acoplamiento informados se basaron en el supuesto de bloqueo y llave propuesto por Fischer, que indica que tanto el ligando como el receptor pueden tratarse como cuerpos rígidos y su afinidad es directamente proporcional a un ajuste geométrico entre sus formas⁶⁶. Durante las últimas dos décadas, se han desarrollado más de 60 herramientas y programas de acoplamiento diferentes para uso académico y comercial, como el ejemplo de *Autodock-vina*.

Autodock-vina es un programa de acoplamiento molecular y cribado virtual que logra ejecutar las órdenes de trabajo de forma rápida, eficiente y precisa en comparación con

otros programas de su calidad que son bastante más lentos y necesitan de computadoras más cualificadas⁶⁶. El acoplamiento producido está interesado en obtener potenciales químicos que determinan la preferencia de conformación unida y la energía libre de dicha unión⁶⁶.

Para el desarrollo del algoritmo de *Vina*, se empleó el criterio de Metrópolis y se implementó el método de Broyden-Fletcher-Goldfarb-Shanno (BFGS), el cual es un método cuasi-Newton. Se trata de un método con propiedades de autocorrección muy eficaces⁶⁶. *Vina* se diseñó para ser compatible con los archivos de su predecesor *Autodock 4*, archivos *PDBQT*, que es una extensión de los archivos *PDB*. Esta característica permite que se pueda usar *Vina* con *AutodockTools*. *AutodockTools* es un programa que ofrece una interfaz gráfica y sencilla al uso de *Autodock* y *Autodock-vina*, llegando a permitir al usuario identificar y determinar visualmente uno de los elementos más el volumen de espacio buscando determinar el volumen que ocupa el acoplamiento y el lugar perfecto de unión para un ligando en concreto. *AutoDockTools* está implementado en el lenguaje de programación orientado a objetos Python y está construido a partir de componentes de software reutilizables⁶⁶.

Por tanto, las hipótesis planteadas en este trabajo son:

- La enzima refinada disminuirá los niveles de energía y, por tanto, aumentará los valores de estabilidad, frente a la enzima sin mutar.
- La masa de la enzima refinada, al igual que el total de su cadena peptídica variarán frente a la enzima no mutada.
- La enzima *KatG* y la mutación *W107R* presentan diferencias en su estructura, que derivan en una disminución de la interacción entre la Isoniazida y el fármaco.
- Las uniones entre el fármaco y las enzimas serán significativamente menores en el caso de la enzima mutada que en el caso de la enzima no mutada.

4 Metodología.

4.1 Programas y versiones utilizadas.

- Para obtener los datos necesarios para este estudio, la estructura por microscopía electrónica de la mutante W107R de la enzima *KatG* y la enzima *KatG* sin mutar se utilizan las secuencias y estructuras de la base de datos *Protein Data Bank* (PDB - <https://www.rcsb.org/>).
- Para el estudio de la estructura de la proteína mutada *KatG* de *M.tuberculosis*, se utiliza el programa *FoldX*. (Obtenido de la página web: <http://foldxsuite.crg.eu/>). Se utiliza la versión “FoldX 5.0” para Windows.
- Para utilizar *FoldX* desde una interfaz visual se utilizará *Yasara* (Obtenido en <http://www.yasara.org/downloads.htm>). Se utiliza su versión “20.12.24”.
- Para el estudio de docking de las enzimas con el fármaco Isoniazida se utiliza el programa Autodock-vina. (Obtenido de la página web: <http://vina.scripps.edu/>). Se utiliza la versión “Windows Autodock Vine 1.1.2”.
- Para utilizar *Autodock-vina* con una interfaz visual se utiliza *Autodock-Tools* (Obtenido de la página web <http://autodock.scripps.edu/resources/adt>). Se utiliza la versión “AutoDock 4 with AutodockTools”.
- Para comparar las diferencias estructurales de ambas enzimas se utiliza el programa *BLASTp*. (Se puede utilizar en la página web: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>).
- Para realizar la estructura química del fármaco Isoniazida, se utiliza el programa *GausView* (Se puede obtener en <https://gaussian.com/gaussview6/>). Se utiliza la versión “GausView 6”.
- Para observar las interacciones del *docking* y los tipos de enlaces de la unión entre las enzimas y el fármaco se utiliza el programa web *Protein-Ligand Interaction Profiler*. (Puede utilizarse en <https://plip-tool.biotec.tu-dresden.de/plip-web/plip/index>)
- Para escribir este documento y todos los demás hitos entregables se utiliza la versión educativa de *Microsoft Word* (Obtenido en https://www.microsoft.com/es-es/microsoft-365/free-office-online-for-the-web_Versión_Microsoft_Office_365), y se convierte a formato .pdf para su entrega con

FoxitPhantomPDF Business 10 (Obtenido en <https://www.foxitsoftware.com/es-la/pdf-editor/>).

- Para visualizar las moléculas se utiliza el programa *PyMol*. (Obtenido en <https://pymol.org/2/>). Se utilizará la versión “PyMol 2.5”.
- Para la presentación final a entregar se utiliza *Microsoft PowerPoint* (Versión de *Microsoft Office 365*).
- Para realizar tablas o diagramas de Gantt se emplea *Microsoft Excel* (Versión de *Microsoft Office 365*).
- Los navegadores de búsqueda, navegación y descarga de archivos utilizados son *Google Chrome* (Obtenido en <https://www.google.com/intl/es-es/chrome/>) y *Mozilla Firefox* (Obtenido en <https://www.mozilla.org/es-ES/firefox/new/>).
- Para gestionar, guardar y citar las referencias bibliográficas utilizadas en este trabajo se utiliza el software *Mendeley*, en su modalidad *Mendeley Desktop for Windows*, *Mendeley Importer Web* y *Mendeley Citation Plugin* (Obtenidos en <https://www.mendeley.com/download-desktop-new/>).
- El dispositivo utilizado para realizar este proyecto posee las siguientes características:
 - CPU: 11th Gen Intel® Core™ i7-1185G7 @ 3.00 GHz
 - RAM: 32,0 GB
 - Local Disk: Phison 1TB SM2801T24GKBB4S-E162
 - OS: Microsoft Windows 10 Pro 64 bits
 - BIOS: E16S6IMS.10^a

4.2 Métodos.

4.2.1 Refinamiento de la mutación *W107R* de la enzima *KatG* de *M.tuberculosis*.

Se comenzó con la observación de la enzima en PyMol y Yasara. Posteriormente se utilizaron distintas funcionalidades de *FoldX* para obtener información de la enzima: Secuencia de la proteína, masa, información tridimensional y termoestabilidad.

Una vez obtenidos estos datos, se refinó la estructura tridimensional de la proteína *KatG* sin mutar, partiendo de los datos del .pdb obtenidos por RMN⁶⁷. Para refinar la proteína se utilizaron varios apartados de *FoldX*:

- Repair object: Este comando completa la secuencia de aminoácidos y estudia las uniones entre ellos y entre las cadenas laterales para minimizar la energía libre de una proteína, es decir, aumenta su termoestabilidad. Este comando va asociado a “Fix residues”, ya que este selecciona aminoácidos que no se quieren reordenar, pero en este caso no se ha seleccionado ninguno. Posteriormente se volvió a analizar la secuencia de la enzima, la masa completa y la estructura tridimensional.
- Sequence detail of object: Imprime la información de secuencia de la proteína en un formato de columna: aminoácidos(aa), cadena, número de pares de bases (PdB).
- Backbone Dihedrals on object: Calcula los ángulos diedros de los enlaces de los átomos.
- Optimize object sidechain: Este apartado permite optimizar las cadenas laterales de la enzima de forma estructural. A continuación, el propio programa muestra como ha conducido a cambios en la estructura 3D sin modificar la secuencia proteína haciendo un alineamiento.

El programa devuelve toda la información obtenida y recogida y la introduce en un archivo .pdb llamado Object2, por lo que se cargó este archivo en Yasara.

- Stability of object: Se calcula la estabilidad de esta enzima para ver si se ha mejorado el modelo con los cálculos y los cambios propuestos.
- Position scan: Como curiosidad final, se con esta función, que muta un aminoácido a los otros 20 y repara los residuos vecinos. Se opera con esta función seleccionando la serina 315 y la arginina 463 para el escáner, ya que, según la bibliografía consultada, son los aminoácidos más mutados en la enzima *KatG*, esto ayudará a saber cuáles son los cambios más frecuentes y estables en las mutaciones.

Posteriormente se cargó en el programa el archivo .pdb de la enzima *KatG* sin mutaciones obtenido por cristalización y se utilizaron distintas funcionalidades de *FoldX* para obtener información de la enzima: Secuencia de la proteína, masa, información tridimensional y termoestabilidad. Para finalizar, se realizaron alineamientos de las secuencias para ver sus diferencias en *BlastP*.

4.2.2 Estudio de *docking* de las enzimas con el fármaco Isoniazida.

Se tiene el archivo refinado obtenido en los pasos previos de este trabajo (Object2.pdb) y el archivo de la proteína sin mutar descargado directamente del *Protein Data Bank* (PDB) sin refinar (1sj2.pdb). Antes de comenzar a trabajar, se comprobó el archivo 1sj2.pdb (Figura 11) y se vio que contenía átomos sin enlazar, moléculas de agua y de oxígeno a su alrededor, por lo que se decidió utilizar nuevamente *Yasara* y refinar la enzima (1sj2ref.pdb) para poder utilizarla en el estudio de docking (Figura 10).

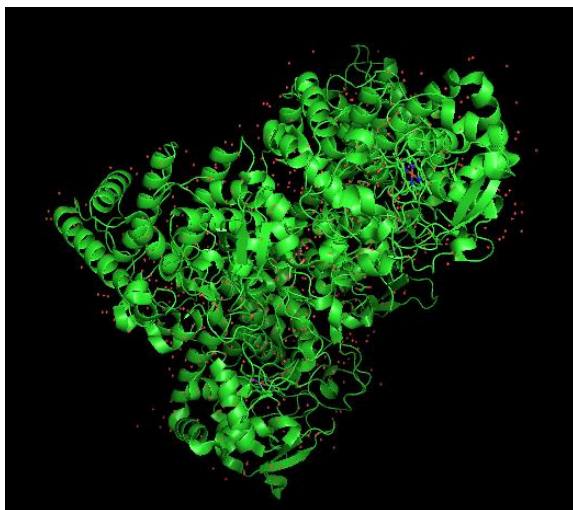


Figura 11. Visualización en PyMol de KatG (1sj2.pdb) con residuos.

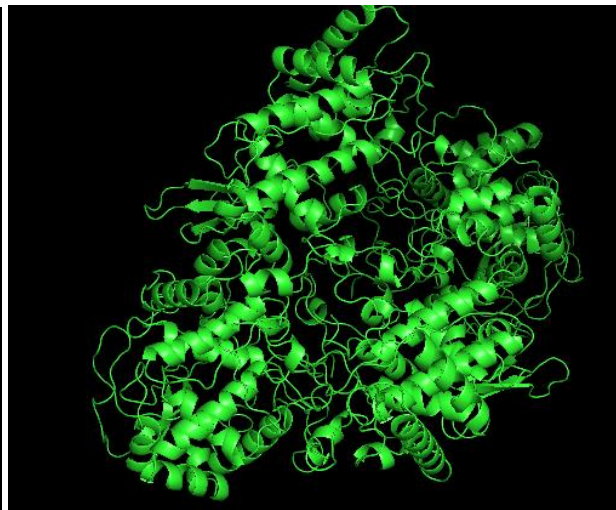


Figura 10. Visualización en PyMol de KatG (1sj2.pdb) sin residuos.

Teniendo las enzimas preparadas, el paso faltante es preparar el fármaco Isoniazida (Figura 12), el cual se dibujó en el programa *Gaussview* y se lanzó al programa *Lusitania* para obtener una optimización de la geometría, ya que mostraba un error de geometría al cargarlo en *Autodock-Vina*. Se guardó en formato .mol2, uno de los formatos posteriormente reconocidos por *AutodockTools*.

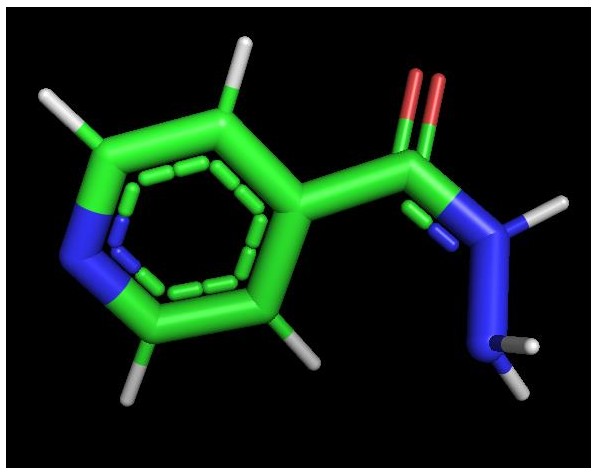


Figura 12. Isoniazida tras optimización geométrica observada en Pymol.

Una vez los archivos estaban preparados para comenzar los estudios de docking, se empezó por realizar el docking de la enzima mutada y refinada en la PEC 2, la enzima *KatG* de *M.tuberculosis* mutación *W107R*.

Al cargar *AutodockTools*, se cargó la macromolécula (object2.pdb) y se cambiaron las opciones de visualización y colorido, para ver la molécula perfectamente (Figura 13).

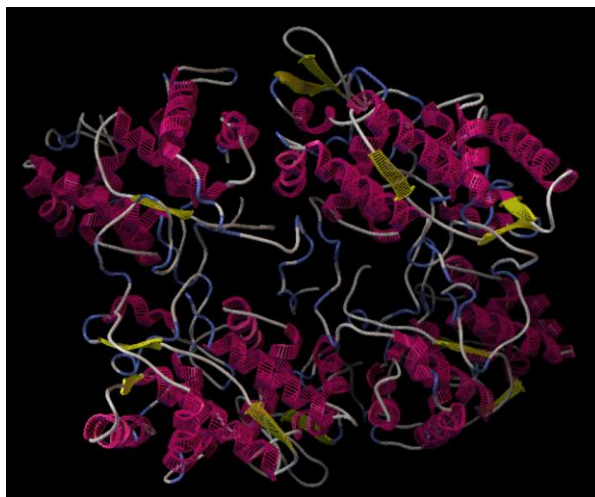


Figura 13. Proteína *KatG* W107R visualizada en *AutodockTools*.

Dentro del programa, de eliminaron los hidrógenos no polares, se añadieron los polares y las cargas de Kollman, esenciales para los archivos pdb, que en este caso fueron de -12.736 (Figura 14).



Figura 14. Cargas de Kollman añadidas a KatG W107R.

Posteriormente se abrió el fármaco en formato .mol2 y se guardó en .pdbqt, que el formato por defecto del programa *AutodockTools* para trabajar, como puede observarse en la Figura 15.

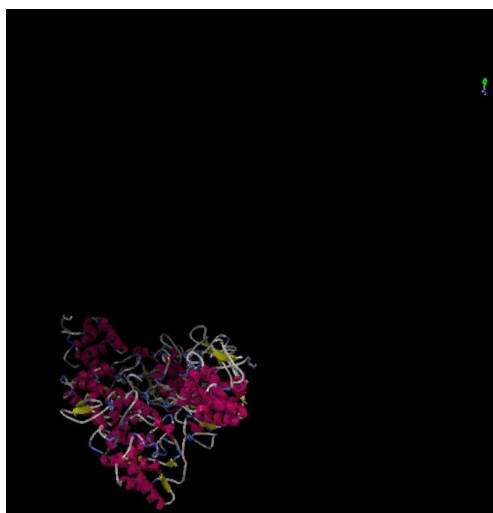


Figura 15. Proteína KatG W107R y fármaco Isoniazida.

Se seleccionan los aminoácidos del centro de (Figura 16) a la isoniazida en el programa (vistos en el [apartado 3.1.7.](#)), pero se encuentran mutaciones en el sitio de unión:

- El aminoácido en la posición 107 no es triptófano, sino arginina.
- No existe el residuo 229.

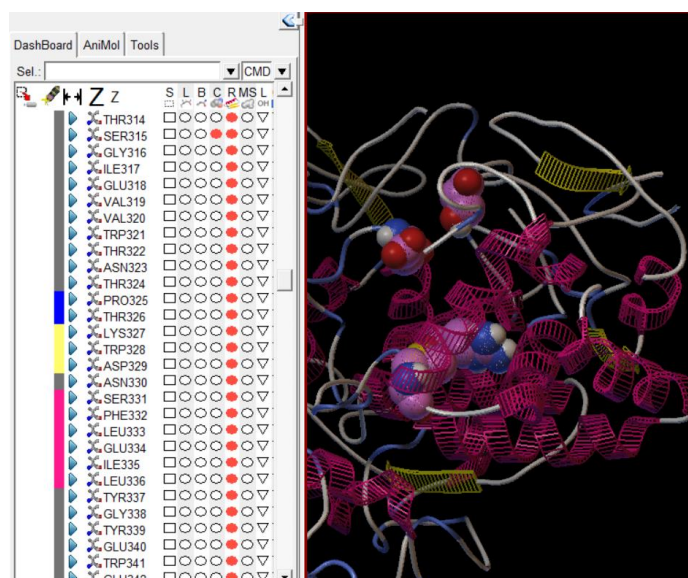


Figura 16. Aminoácidos del centro de unión marcados.

Se construyó la caja (Figura 17) que marca el centro de unión al cual debe acercarse el fármaco al correr el *docking*. Se puede observar la posición y el tamaño de la caja, estos datos se encuentran guardados en el archivo grid1.txt.

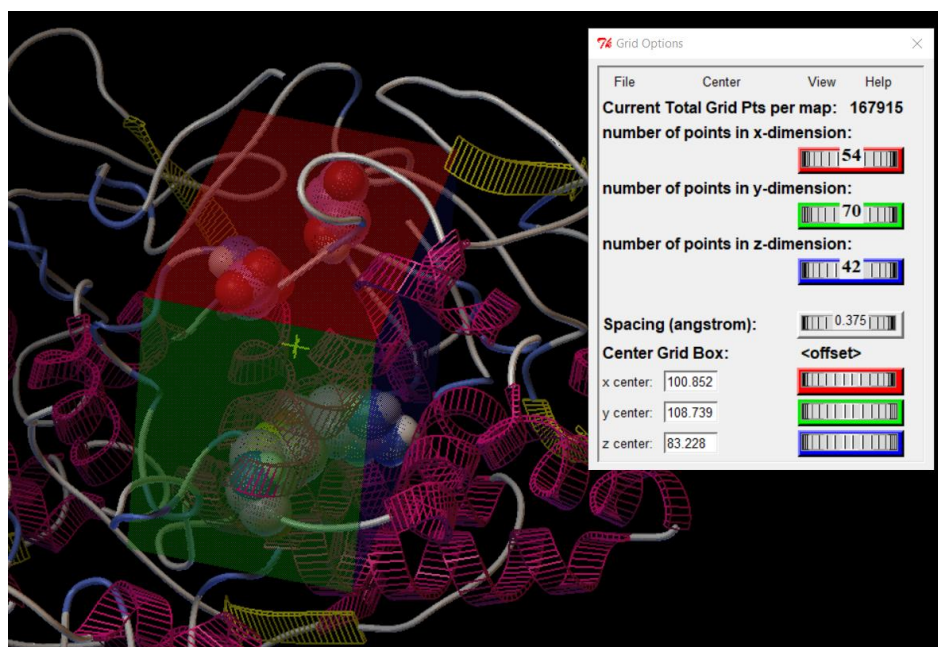


Figura 17. Aminoácidos dentro de la caja para el docking.

Se seleccionó la macromolécula, el fármaco y el archivo vina de salida con las características requeridas (Figura 18 y Figura 19).

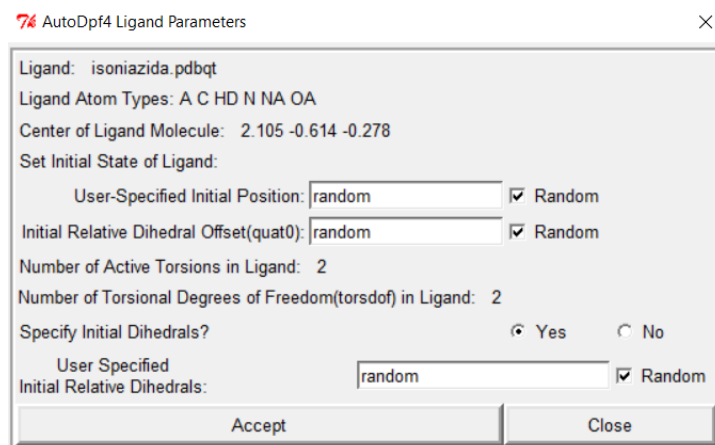


Figura 18. Parámetros del ligando Isoniazida.

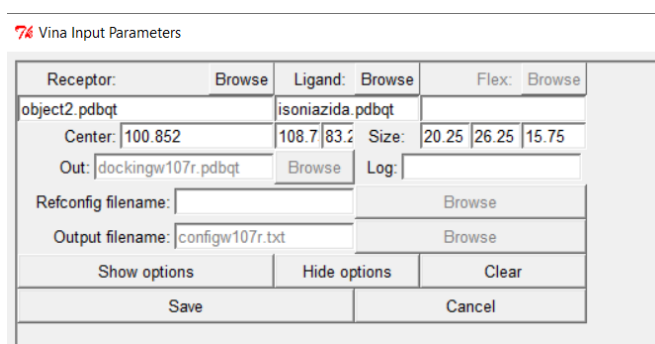


Figura 19. Parámetros de Vina.

Se llamó dockingw107r.pdbqt al archivo donde va a resultar el docking y configw107r.txt el archivo utilizado por vina para hacer el docking (Figura 20) y se corrió *Autodock-Vina*.

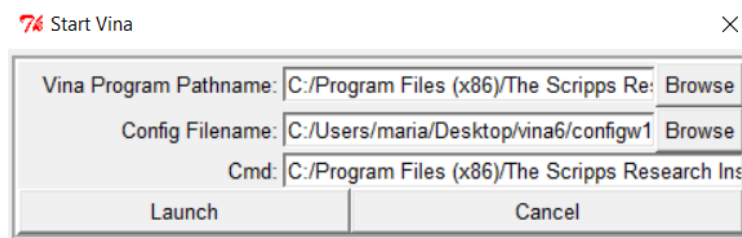


Figura 20. Localización de archivos para la ejecución de Vina.

Para ver las interacciones en el programa *Protein-Ligand Interaction Profiler*, hay que guardar en un mismo archivo la conformación del fármaco y la enzima. Para ello, se seleccionó dockingw107r y object2 y se hizo click click en Select y Add selection to dashboard, se guardó este archivo como w107rligando.pdb.

Se observó en *Pymol* (Figura 21) que se guardó perfectamente y se abrió *Protein-Ligand Interaction Profiler*.



Figura 21. Resultado de docking de KatG W107R y mejor conformación de Isoniazida.

Posteriormente se repitieron los mismos pasos con el archivo 1sj2ref.pdb. Se cargó la molécula, se añadieron los hidrógenos polares, se eliminaron los no polares y se añadieron las cargas de Kollman. Se añadió el ligando y se guardó en formato isoniazida.pdbqt. Se marcaron los cinco residuos que forman el sitio de unión (Trp107, Asp137, Tyr229, Met255 y Ser315) (Figura 22).

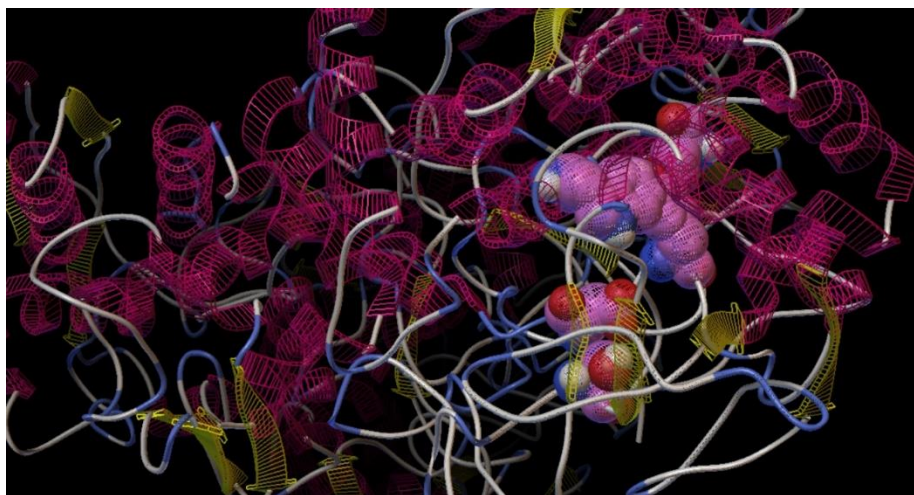


Figura 22. Aminoácidos del sitio de unión a Isoniazida de KatG.

Se añadió la caja (Figura 23) y se guardaron los valores con el nombre gridKatG.txt.

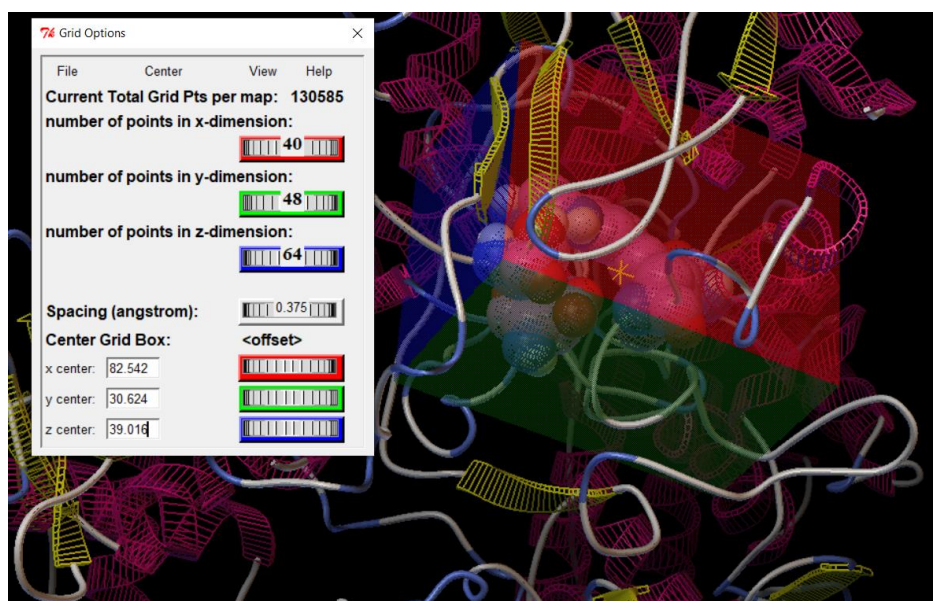


Figura 23. Caja de docking para KatG.

Se seleccionó la macromolécula, el ligando y el archivo .txt de salida de *Autodock-Vina* que se llamó configkatg.txt (Figura 24) y el archivo de salida del docking (Figura 25) que se llamó dockingkatg.pdbqt.

Figura 24. Parámetros del ligando Isoniazida.

Receptor:	Browse	Ligand:	Browse	Flex:	Browse
1sj2ref.pdbqt		isoniazida.pdbqt			
Center:	82.542	30.62	39.01	Size:	15.0 18.0 24.0
Out:	dockingkatg.pdbqt	Browse		Log:	
Refconfig filename:				Browse	
Output filename:	configkatg.txt			Browse	
Show options		Hide options		Clear	
Save				Cancel	

Figura 25. Parámetros para la salida de Vina.

Se unificó el resultado del docking y la proteína en un archivo llamado katgligando.pdb, se visualiza en Pymol (Figura 26) y se cargó en el programa web *Protein-Ligand Interaction Profiler*.

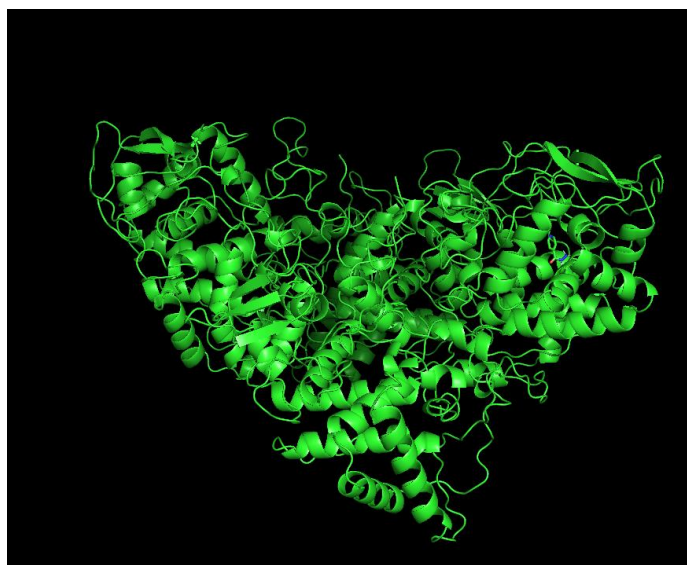


Figura 26. Visualización del docking Isoniazida y KatG con la mejor conformación.

5 Resultados

5.1 Resultados del refinamiento de la mutación *W107R* de la enzima *KatG* de *M.tuberculosis*.

La secuencia de la proteína *W107R* de *KatG* según *FoldX* es:

>SequenceObj W107R or 1 and All

```
MPEQHPPITETTTGAASNGCPVVGHMKYPVEGGGNQDWWPNRLNLKVLHQNPVADPMGA
AFDYAAEVATIDVDALTRDIEEVMTTSQPWWPADYGHYGPLFIRMARHAAGTYRIHDGRGGAG
GGMQRFAPLNSWPDNASLKDARRLLWPVKKKYGKKLSWADLIVFAGNCALESMGFKTFGFGF
GRVDQWEPDEVYWGKEATWLGDERYSGKRDLNPLAAVQMGLIYVNPEGPNGNPDPMAAAV
DIRETFRRMAMNDVETAALIVGGHTFGKTHGAGPADLVGPEPEAAPLEQMGLGWKSSYGTGTG
KDAITSGIEVVWNTNPTKWDNSFLEILGYEWELTKSPAGAWQYTAKDGAGAGTIPDPFGGPGR
SPTMLATDLSLRVDPIYERITRRWLEHPEELADEFAKAWYKLIHRDMGPVARYLGPLVPKQTLL
WQDPVPAVSHDLVGAEIASLKSQIRASGLTVSQLVSTAWAAAASSFRGSDKRGGANGGRIRLQP
QVGWEVNDPDGDLRKVIRLTLEEIQESFNSAAPGNIKVSFADLVVLGGCAAIEKAAKAAGHNITVP
FTPGRTDASQEQTDESFAVLEPKADGFRNYLGKGNPLPAEYMLLDKANLLTSAPEMTVLVGG
LRVLGANYKRLPLGVFTEASESLTNDDFFVNLLDMGITWEPSPADDGTYQKDGSGKVKWTGSR
VDLVFGSNSSELRALVEVYGADDAQPKFVQDFVAAWVKVMNLDRFDVR
```

La masa de la enzima obtenido por el programa es de 131784.532 g/mol, cuya información tridimensional es la siguiente:

>SecStrAll

All has secondary structure content 37.6% helix, 3.1% sheet, 13.3% turn, 45.4% coil, 0.6% 3-10 helix and 0.0% pi-helix.

La visualización de la enzima que nos devuelve Yasara se puede visualizar en la Figura 27 y 28.

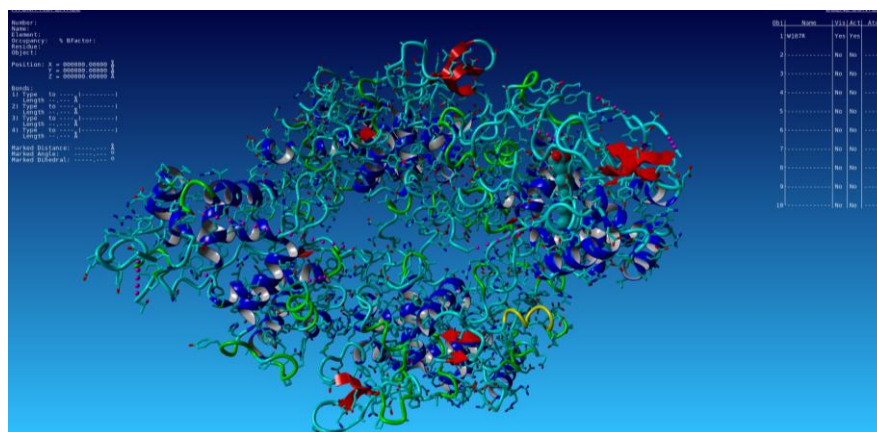


Figura 27. Visualización de la enzima W107R de KatG por Yasara (I).

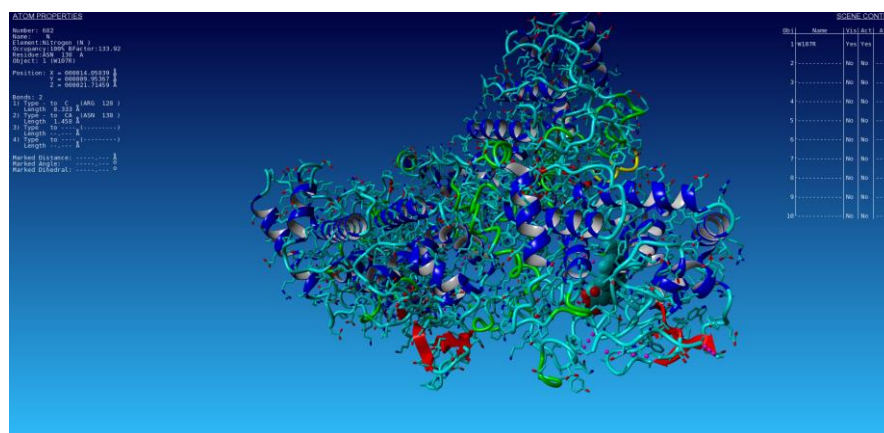


Figura 28. Vista de la enzima W107R de KatG por Yasara (II).

La termoestabilidad de esta proteína no es demasiado efectiva, ya que posee valores muy altos: Plugin>Stability of: W107R = 1035.04 (kcal/mol)

El archivo .pdb de esta enzima puede encontrarse en el reservorio bajo el nombre de W107R. El archivo que muestra la masa, la estructura y la estabilidad de dicha proteína puede encontrarse en el reservorio bajo el nombre de proteína_W107R. También calculamos y observamos los ángulos diedros, lo que puede verse en el archivo backbonedihedralsonobject_W107R del reservorio de Github.

Los resultados obtenidos al refinar la proteína utilizando varios apartados de *FoldX* fueron:

- Repair object: La estructura tridimensional obtenida se puede ver en la Figura 29.

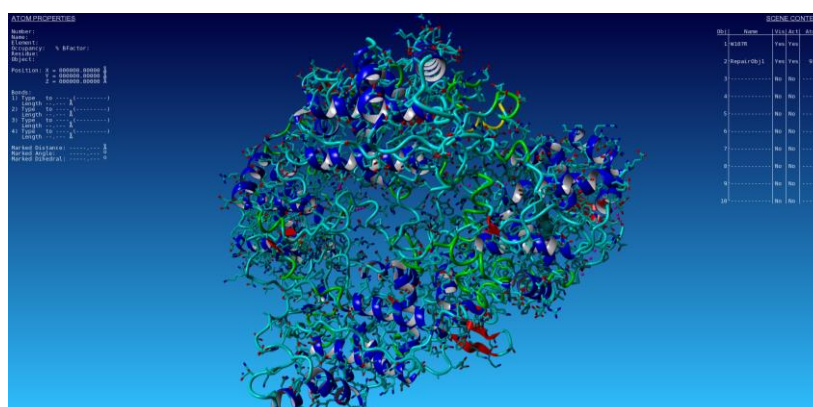


Figura 29. Forma tridimensional de la enzima W107R de KatG tras el Repair Object.

La secuencia que devolvió el programa de la enzima reparada es la siguiente:

>SequenceAll - Object 2 (RepairObj1), molecule B:

.PNRLNLKVLHQNPVADPMGAFFDYAAEVATIDVDALTRDIEEVMTTSPQWPPADYGHYGPLFI
RMARHAAGTYRIHDGRGGAGGGMQRFPALNSWPDNASLKDARRLLWPVKKKYGKKLSWADLI


```
VFAGNCALESMGFKTFGFGFGRVDQWEPDEVVNPEGPNGNPDPMAAAVDIRETFRRMAMNDVE  
TAALIVGGHTFGKTHDLVGPEPEAAPLEQMGLGWKSSYGTGTGKDAITSGIEVVWNTPTKWDNS  
FLEILYGYEWELTKSPAGAWQYTAKGTIPDPFRSPTMLATDLSLRVDPIYERITRRWLEHPEELADE  
FAKAWYKLIHRDMGPVARYLGPLVPKQTLLWQDPVPAVSHDLVGEAEIASLKSQIRASGLTVSQL  
VSTAWAAASSFRGSDKRGGANGGRIRLQPQVGWEVNDPDGDLRKVIRTLEEIQESFNSAAPGNIK  
VSFADLVVLGGCAAIEKAACAAGHNITVPFTPGRTDASQEQTDESFAVLEPKADGFRNYLGKGN  
PLPAEYMLLDKANLLTSAPEMTVLVGGLRVLGANYKRLPLGVFTEASESLTNDDFFVNLLDMGIT  
WEPSPADDGTYQKDGSGKVKWTGSRVDLVFGSNSSELRALVEVYGADDAQPKFVQDFVAAWD  
KVMNLDLRFDV.
```

La masa de la enzima completa es:

>MassAll - All has mass 245421.983 g/mol

La estructura tridimensional es:

>SecStrAll

All has secondary structure content 37.6% helix, 3.1% sheet, 13.3% turn, 45.4% coil, 0.6% 3-10 helix and 0.0% pi-helix.

- Sequence detail of object: El archivo de configuración se puede en detailobject_NEWW107R.
- Backbone Dihedrals on object: La información puede observarse en diedral_NEWW107R.
- Optimize object sidechain: el propio programa muestra la optimización de las cadenas laterales sin cambios en la estructura 3D:
 - > The above structural alignment between Object2 and RepairObj1 has an RMSD of 0.000 Å over 1217 aligned residues with 100.00% sequence identity.

El alineamiento completo puede observarse en el archivo alineamiento_NEWW107R.

Toda esta información el programa la ha introducido en un archivo .pdb llamado Object2 (Figura 30).

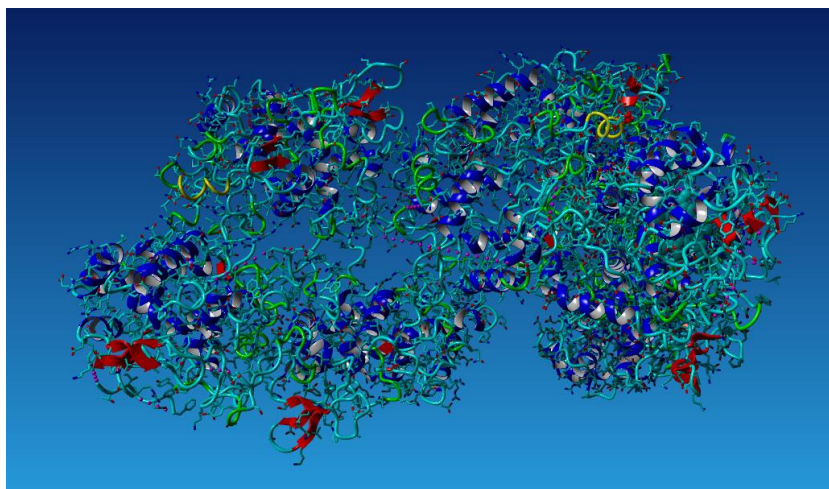


Figura 30. Visualización del archivo Object2

- Stability of object: La nueva energía de la enzima es 454.75 kcal/mol.
Plugin>Stability of: Object2 = 454.75 (kcal/mol)
- Position scan: Los resultados nos derivan en que la serina 315 muta de forma más favorable a metionina, teniendo una menor energía. La arginina 463 mutaría de forma más favorable a leucina. Los resultados completos pueden observarse en el archivo positionscan.

Los resultados obtenidos de la enzima *KatG* no mutada (Figura 31) son los siguientes:

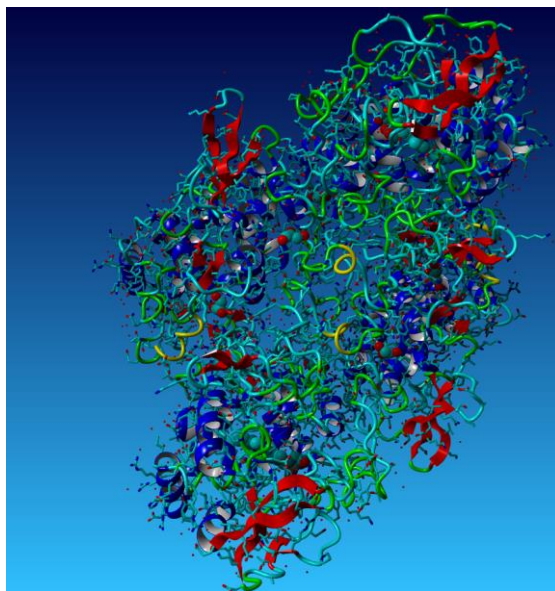


Figura 31. Visualización de la enzima *KatG* en Yasara.

La estructura tridimensional de la enzima es:

>SecStrAll - All has secondary structure content 37.7% helix, 7.7% sheet, 21.0% turn, 32.0% coil, 1.7% 3-10 helix and 0.0% pi-helix.

La estabilidad de la enzima:

Plugin>Stability of: 1sj2 = 886.13 (kcal/mol).

Para finalizar, observamos los resultados de los alineamientos de secuencias finales realizados en BLASTp:

- El BLASTp entre W107R y Object2 muestran un Query de 94% y un porcentaje de identidad del 93.3% (Figura 32).

Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
1300	1300	94%	0.0	93.30%	654	Query_44875

Figura 32. BLASTp entre W107R inicial y Object2.

- El BLASTp entre KatG y Object2 muestra un Query del 94% y un porcentaje de identidad del 93.15% (Figura 33).

Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
1295	1295	94%	0.0	93.15%	654	Query_4999

Figura 33. BLASTp entre Object2 y KatG.

5.2 Resultados del estudio de *docking* de las enzimas con el fármaco Isoniazida.

5.2.1 Docking de la mutación W107R.

La información obtenida del docking en la terminal de *Autodock* mostró que hay nueve posibles conformaciones, siendo la mejor de ellas la que tiene una afinidad de -5,8 kcal/mol (Figura 34). (La información obtenida en la terminal se guardó en el archivo dockingw107rinfo.txt).

mode	affinity (kcal/mol)	dist from best mode	
		rmsd l.b.	rmsd u.b.
1	-5.8	0.000	0.000
2	-5.7	6.561	8.092
3	-5.4	6.189	7.409
4	-5.4	2.796	4.737
5	-5.3	3.679	4.651
6	-5.2	5.596	7.025
7	-5.1	2.498	3.418
8	-5.0	4.092	4.785
9	-5.0	5.012	5.990

Figura 34. Resultados de Vina para KatG W107R.

Se pueden observar las nueve conformaciones obtenidas en la Figura 35, 36 y 37.

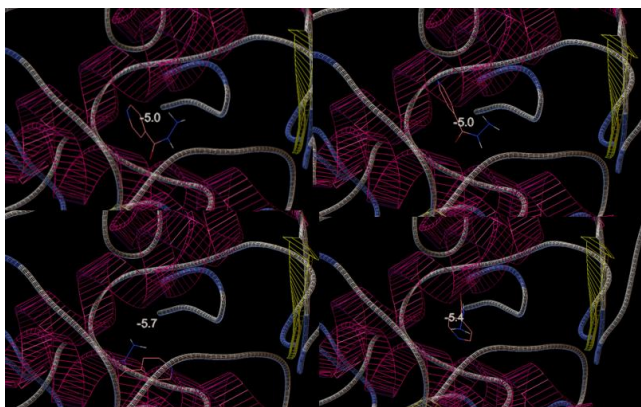


Figura 35. Conformaciones obtenidas en el estudio de docking para W107R e Isoniazida (I).

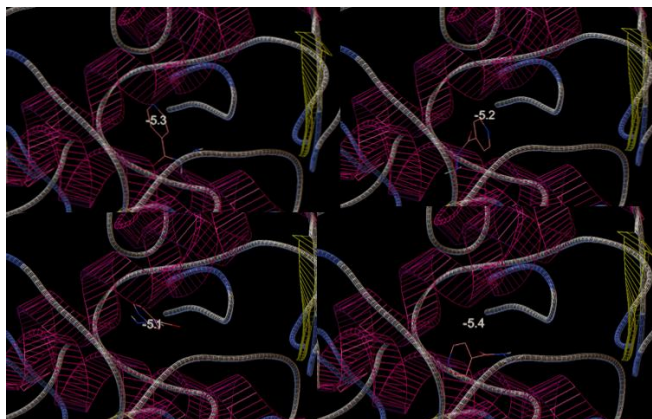


Figura 36. Conformaciones obtenidas en el estudio de docking para W107R e Isoniazida (II).

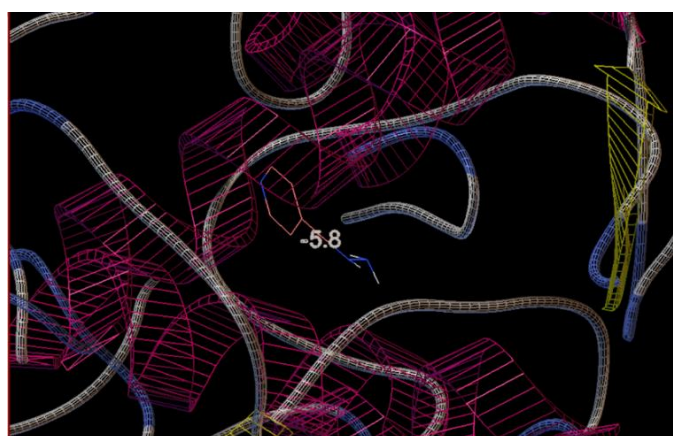


Figura 37. Mejor conformación obtenida en el estudio de docking para W107R e Isoniazida.

Los resultados obtenidos de *Protein-Ligand Interaction Profiler* (PLIP) pueden observarse en la Figura 38 y 39.

SMALLMOLECULE

RES (4-phosphoerythronhydroxamic acid)

RES-d-1

Interacting chains: B

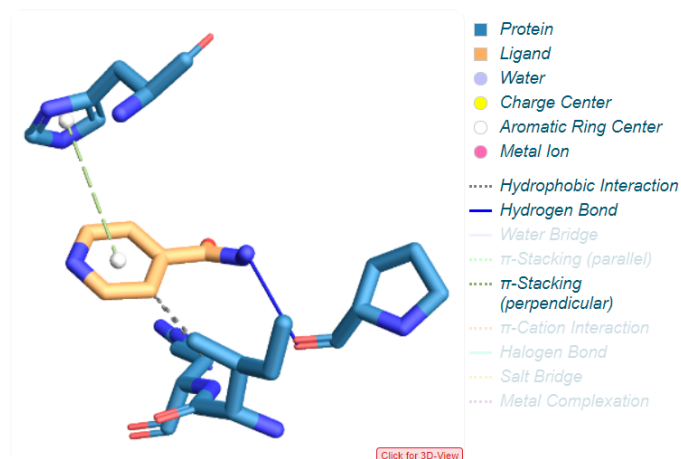


Figura 38. Resultados obtenidos del programa PIPL para W107R (I).

▼ Hydrophobic Interactions

Index	Residue	AA	Distance	Ligand Atom	Protein Atom
1	103B	ILE	3.48	11533	5973
2	104B	ARG	3.90	11533	5980

▼ Hydrogen Bonds —

Index	Residue	AA	Distance H-A	Distance D-A	Donor Angle	Protein donor?	Side chain	Donor Atom	Acceptor Atom
1	100B	PRO	2.75	3.32	116.00	×	×	11540 [N3]	5941 [O2]

▼ π -Stacking

Index	Residue	AA	Distance	Angle	Offset	Stacking Type	Ligand Atoms
1	270B	HIS	4.81	81.53	0.79	T	11530, 11531, 11532, 11533, 11534, 11535

Figura 40. Resultados obtenidos del programa PIPL para W107R (II).

La información disponible se guardó en los archivos PLIPresultw107r.xlm y W107RLIGRANDO_PLP_RESULT.pse.

5.2.2 Docking de la enzima *KatG* sin mutar.

Se corrió el docking y los resultados obtenidos en la terminal se guardaron en un archivo dockingkatgresult.txt. Se obtuvieron también 9 conformaciones, esta vez la mejor de ellas tenía una afinidad mayor, de -5,5 kcal/mol (Figura 40).

mode	affinity (kcal/mol)	dist from best mode rmsd l.b. rmsd u.b.
1	-5.5	0.000 0.000
2	-5.5	5.475 6.056
3	-5.0	5.386 6.895
4	-5.0	5.416 6.793
5	-5.0	2.943 4.648
6	-4.9	6.246 6.932
7	-4.9	6.209 7.315
8	-4.9	5.024 5.368
9	-4.9	6.406 7.622

Figura 39. Resultados del programa PILP de *KatG* W107R.

Se cargaron los resultados del docking y se observaron las nueve conformaciones (Figura 41, 42 y 43).

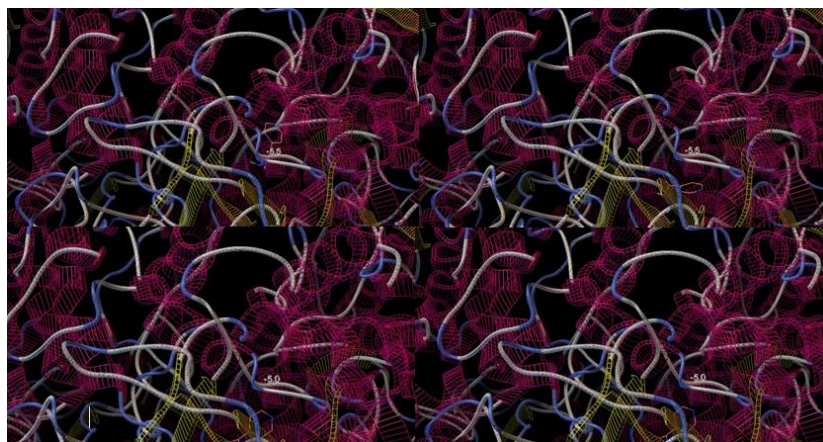


Figura 42. Conformaciones obtenidas en el estudio de docking para KatG e Isoniazida (I).

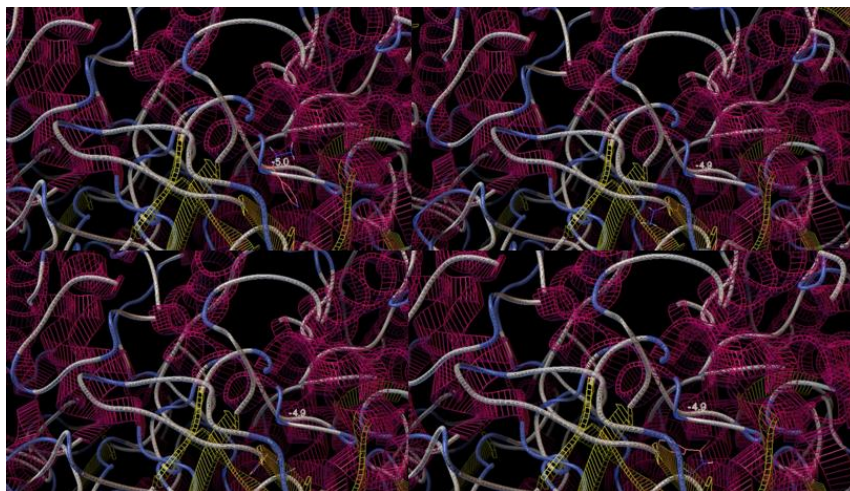


Figura 43. Conformaciones obtenidas en el estudio de docking para KatG e Isoniazida (II).

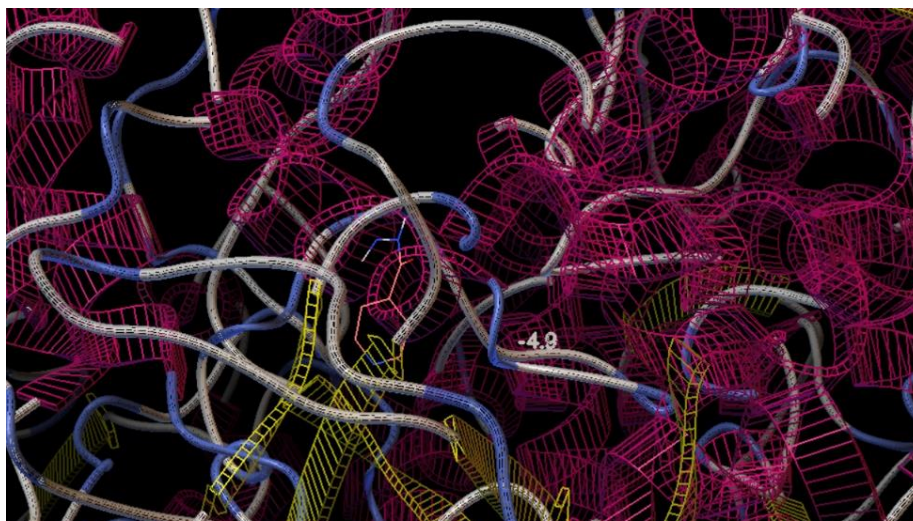


Figura 44. Conformaciones obtenidas en el estudio de docking para KatG e Isoniazida (III).

Los resultados obtenidos de *Protein-Ligand Interaction Profiler* pueden observarse en la Figura 44.

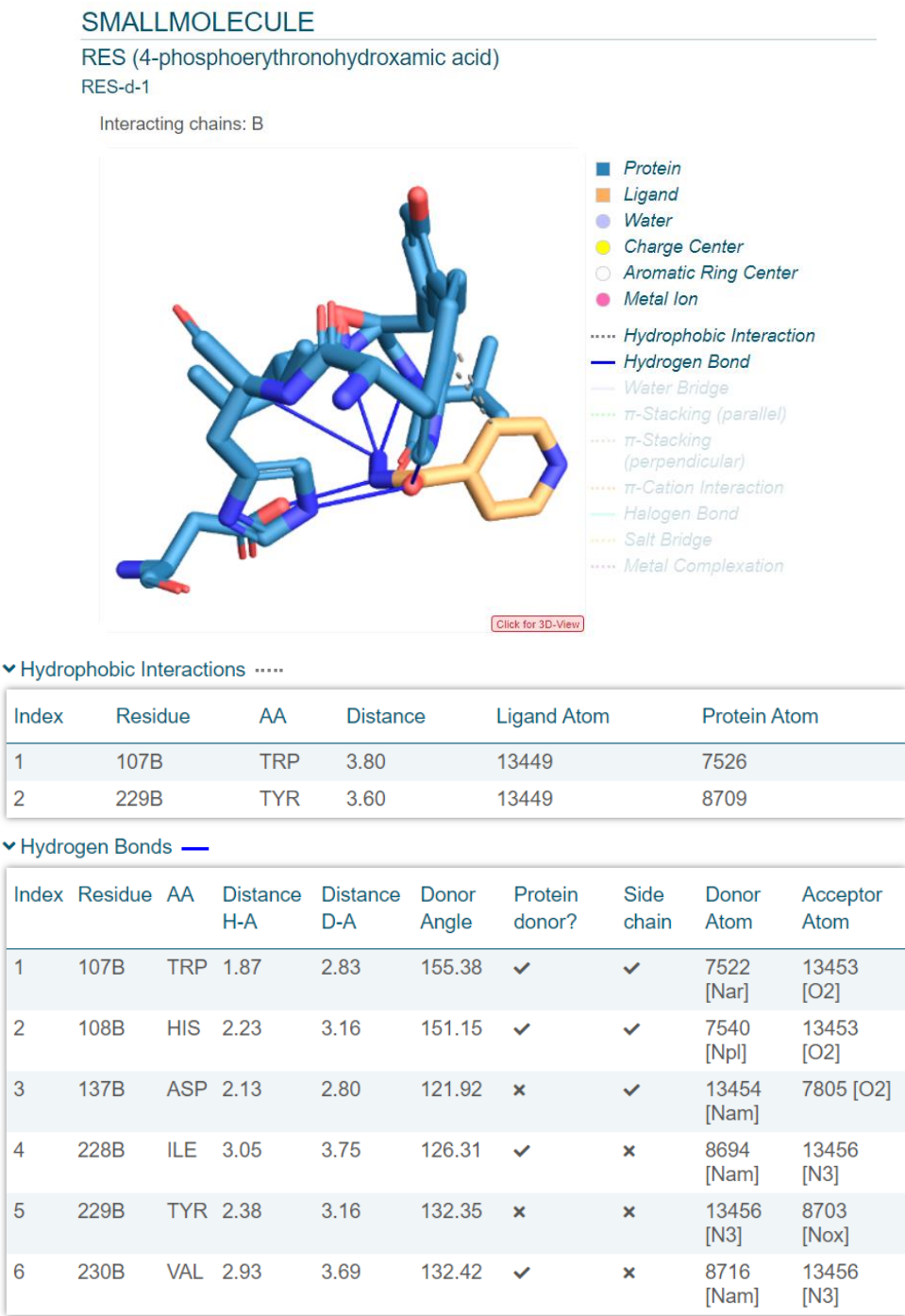


Figura 45. Resultados obtenidos del programa PIPL para KatG.

La información disponible se guardó en los archivos PLIPresultkatg.xlm y KATGLIGRANDO_PILP_RESULT.pse.

6 Discusión

La enzima refinada posee una estructura más parecida a la cristalización de la enzima KatG sin mutar (Figuras 45 y 46), lo que nos indica buenos resultados en nuestro modelo refinado. En un inicio podemos observar que el archivo .pdb de W107R tiene 89 huecos en la cadena peptídica, que logramos introducir gracias a FoldX, obteniendo una cadena completa. Esto consigue que la masa de nuestra proteína cambie de 131784.532 g/mol a 245421.983 g/mol.

Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
1295	1295	94%	0.0	93.15%	654	Query_4999

Figura 46. BLASTp W107 refinada y KatG.

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
98734 bits(256308)	0.0	Compositional matrix adjust.	77000/95995(80%)	77767/95995(81%)	9896/95995(10%)

Figura 47. BLASTp W107 no refinada y KatG.

Los estudios de ángulos de átomos, de cadenas laterales y de alineación nos proporcionan una enzima mucho más estable que la estructura que contiene el .pdb inicial, el cual es el fin de este apartado. La energía de la enzima sin refinar es de 1035.04 (kcal/mol) y la de la enzima refinada 454.75 (kcal/mol), ya que cuanto menor es la energía, más estable es una proteína. Además, a la hora de refinar una proteína o de conseguir su estructura por homología, se ha visto que cuanto más baja es la energía de una proteína cuya estructura se está obteniendo mediante métodos computacionales, más parecida será la proteína a su estado nativo⁵¹.

Esta información, unida al alto query e identidad del BLASTp de la secuencia refinada y la secuencia sin refinar, indican que el resultado ha sido exitoso. Además, observamos que los resultados son muy parecidos al comparar la estructura obtenida con la de la enzima sin mutación. También encontramos que la energía de la enzima refinada es menor que la energía de la proteína sin mutar, lo que deriva en el problema real existente: KatG es una proteína que muta fácilmente, ya que las mutaciones favorecen la estabilidad⁶⁸.

Los resultados del ScanPosition final muestran que las mutaciones más favorables son las que más ocurren según la bibliografía consultada, como indican Purkan *et al.*⁶⁹, ya que las mutaciones que más estabilidad generan según FoldX son Serina 315 por

Treonina y Arginina 463 por Leucina, lo que indica que la enzima refinada tiene las mismas características que la enzima mutada empírica.

Una de las diferencias encontradas entre las dos enzimas es que el bolsillo de unión del fármaco encontrado en la bibliografía⁷⁰ no coincide en ambas enzimas.

<i>KatG</i> no mutada	Trp107	Asp137	Tyr229	Met255	Ser315
<i>KatG W107R</i>	Trp107	Arg137		Met255	Ser315

En la enzima *KatG* no mutada, las posiciones y los aminoácidos que hay en ellas coinciden a la perfección, pero en la mutante *W107R*, en el residuo 137 se encuentra un aminoácido de arginina en vez de un aminoácido de ácido aspártico y en la posición 229 no hay aminoácido. Se está buscando bibliografía para observar si hay alguna diferencia significativa comprobada en otras especies bacterianas de cambios de ácido aspártico a arginina que desfavorezca la unión del fármaco respecto a la discusión final de este trabajo, pero todavía no se ha encontrado información relevante.

La afinidad obtenida del docking realizado por Autodock Vina es la energía libre de Gibbs⁷¹. La energía libre de Gibbs es un potencial termodinámico que se usa para calcular el máximo de trabajo reversible que puede realizarse mediante un sistema termodinámico a una temperatura y presión constante.⁷² Se estudió la energía de enlace media para todas las conformaciones en el grupo y cuanto más grupos y cuanto más débil es la energía media, menos probable es que el ligando se una⁴⁸. Por lo que podemos concluir que la energía de Gibbs de la enzima mutada es menor que la energía de la enzima sin mutar, por lo que tendrá menos probabilidades de unir el fármaco la mutante *W107R*.

Además, existe una relación entre la energía de Gibbs y la constante de disociación(K_d): $\Delta G = RT \ln K_d$ ⁷³. Es decir, si despejamos la K_d , podemos obtener la constante de afinidad de unión de cada enzima al fármaco suponiendo una temperatura constante (cogemos como temperatura $37^\circ\text{C} = 310^\circ\text{K}$, ya que es la temperatura idónea para el bacilo *M.tuberculosis*⁷⁴), cuanto mayor sea K_d , mayor será la afinidad de unión⁷⁵.

- *W107R*: $K_d = 0,81$
- *KATG*: $K_d = 0,82$

Aunque no hay diferencias significativas entre las constantes de afinidad, sí vemos reducida la afinidad del fármaco hacia la enzima mutada, por lo que puede ser un primer motivo que refleje la resistencia a antibióticos.

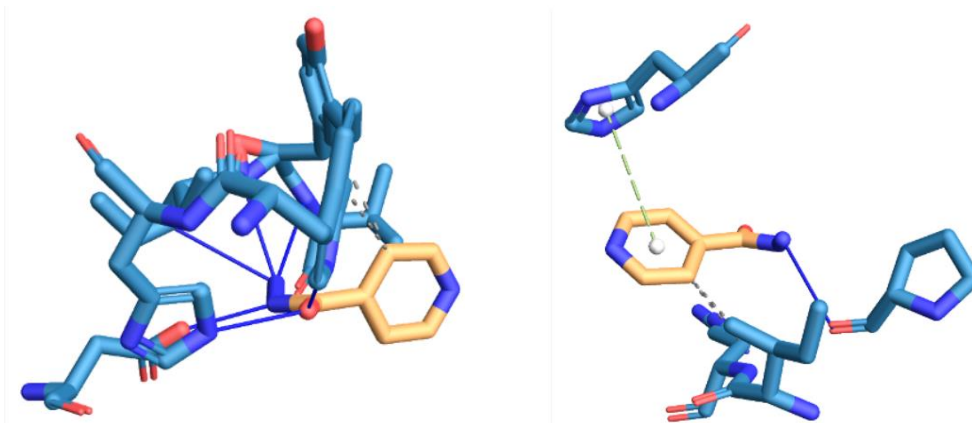


Figura 48. Uniones de KatG y KatG W107R tras el docking

Si se observan las dos imágenes producidas por el programa *PLIP* (Figura 47), se puede concluir que el fármaco encaja y se acerca mucho mejor en la proteína sin mutar, que en la proteína mutada, lo que puede derivar a problemas de acoplamiento y ser un motivo más de la resistencia a antibióticos que presenta *M.tuberculosis*.

Además, las uniones que se producen en ambas también son diferentes (Figura 48), sobre todo en el número de interacciones.

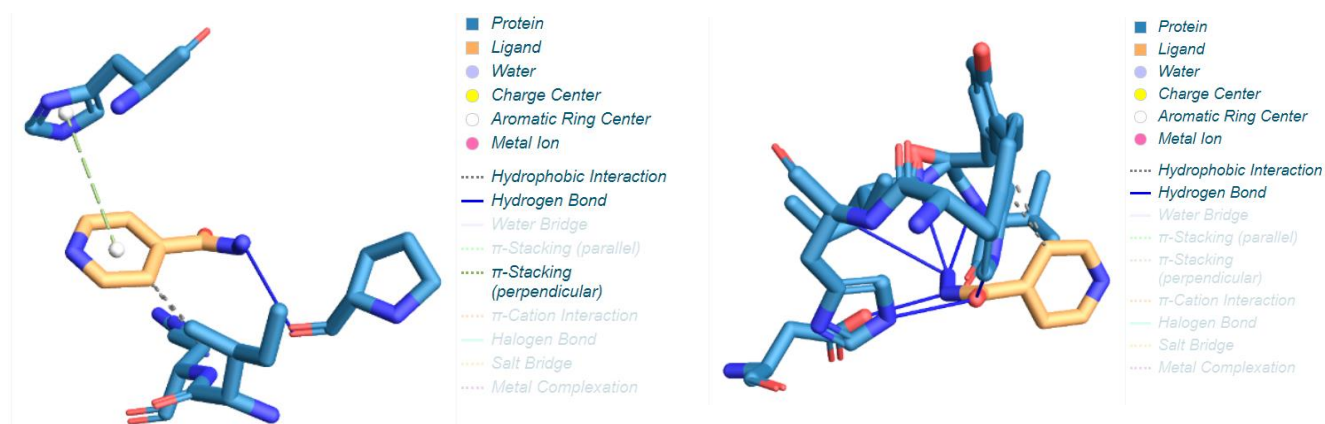


Figura 49. Tipos de uniones de KatG y KatG W107R tras el docking.

En la imagen de la derecha observamos que hay bastantes uniones mediante puentes de hidrógeno, mientras que en la imagen de la izquierda (proteína mutada) disminuyen las interacciones mediante puentes de hidrógeno, como se puede observar en las Figuras 49 y 50, donde la proteína mutada tiene una interacción mediante puentes de hidrógeno y la proteína sin mutar tiene seis. Siendo los puentes de hidrógeno la interacción no covalente más fuerte, la diferencia de unión es significativa.

▼ Hydrogen Bonds —

Index	Residue	AA	Distance H-A	Distance D-A	Donor Angle	Protein donor?	Side chain	Donor Atom	Acceptor Atom
1	100B	PRO	2.75	3.32	116.00	✗	✗	11540 [N3]	5941 [O2]

Figura 50. Puentes de hidrógeno de KatG W107R.

▼ Hydrogen Bonds —

Index	Residue	AA	Distance H-A	Distance D-A	Donor Angle	Protein donor?	Side chain	Donor Atom	Acceptor Atom
1	107B	TRP	1.87	2.83	155.38	✓	✓	7522 [Nar]	13453 [O2]
2	108B	HIS	2.23	3.16	151.15	✓	✓	7540 [Npl]	13453 [O2]
3	137B	ASP	2.13	2.80	121.92	✗	✓	13454 [Nam]	7805 [O2]
4	228B	ILE	3.05	3.75	126.31	✓	✗	8694 [Nam]	13456 [N3]
5	229B	TYR	2.38	3.16	132.35	✗	✗	13456 [N3]	8703 [Nox]
6	230B	VAL	2.93	3.69	132.42	✓	✗	8716 [Nam]	13456 [N3]

Figura 51. Puentes de hidrógeno de KatG.

Además, también encontramos interacciones hidrofóbicas (Figura 51 y 52), dos en cada una de las proteínas, aunque los aminoácidos cambian. La media de las distancias en las que ocurren estos enlaces es parecida, por lo que no se ven diferencias significantes más allá del cambio de orientación del fármaco.

▼ Hydrophobic Interactions

Index	Residue	AA	Distance	Ligand Atom	Protein Atom
1	107B	TRP	3.80	13449	7526
2	229B	TYR	3.60	13449	8709

Figura 52. Uniones hidrofóbicas de KatG W107R.

Index	Residue	AA	Distance	Ligand Atom	Protein Atom
1	103B	ILE	3.48	11533	5973
2	104B	ARG	3.90	11533	5980

Figura 53. Uniones hidrofóbicas de KatG.

Otra diferencia que llama la atención es que en la proteína mutada encontramos una unión pi-stacking (Figura 53) que se produce únicamente en la proteína mutada. Este tipo de unión ocurre entre anillos aromáticos y se observan en muchas áreas de la bioquímica⁷⁶. En principio, estas interacciones mejoran la unión, pero son más débiles que los puentes de hidrógeno, por lo que, al disminuir mucho los puentes de hidrógeno, realmente la molécula pierde afinidad y fuerza de unión. Esta unión podría verse causada por la desaparición del residuo 229 en el sitio de unión, ya que desaparece una tirosina, que al tener un anillo aromático que lo convierte en un aminoácido hidrofóbico, las uniones entre la propia proteína que causa desaparecen, forzando las interacciones pi de la proteína con el fármaco.

▼ π -Stacking

Index	Residue	AA	Distance	Angle	Offset	Stacking Type	Ligand Atoms
1	270B	HIS	4.81	81.53	0.79	T	11530, 11531, 11532, 11533, 11534, 11535

Figura 54. Uniones pi-stacking de KatG W107R.

7 Conclusiones

7.1 Conclusiones

Las conclusiones obtenidas de este trabajo son:

- La enzima refinada disminuye los niveles de energía frente a la enzima *KatG* sin refinar, por lo que aumenta su estabilidad.
- La masa de la enzima refinada y sus aminoácidos varían frente a la enzima sin refinar, lo que conlleva a pensar que han ocurrido cambios en la estructura primaria y secundaria, al intentar mejorar la estructura tridimensional de la enzima.
- La enzima *KatG* y la mutación *W107R* presentan diferencias en su estructura de unión, abarcando más espacio y ocasionando por ello más distancia entre el fármaco y la enzima mutada, que derivan en una disminución de la interacción entre la Isoniazida y la enzima mutada, lo que explica las resistencias. Además, el número de interacciones encontradas entre la enzima *KatG* y el fármaco son mucho más numerosas que entre el fármaco y la enzima mutada.
- Las diferencias en los estudios de *docking*, pueden demostrar posibles mecanismos de escape de la bacteria hacia el profármaco, pero no se encuentran grandes distinciones que permitan afirmarlo con exactitud.
- La desaparición del residuo Tyr229 en el sitio de unión (aminoácido hidrofóbico), disminuye con puentes de hidrógeno con el fármaco, lo que podría forzar las interacciones π de la proteína mutada con el fármaco.
- La constante de afinidad se encuentra reducida en la enzima mutada, por lo que puede ser un primer motivo que refleje la resistencia a antibióticos, aunque es una diferencia muy leve.

7.2 Líneas de futuro

Más allá de lo investigado y aprendido en este trabajo, como línea futura, se podría marcar una profundización en el estudio de *docking*, repitiendo el *docking* en *Vina* mil veces, tal y como recomienda la bibliografía para obtener resultados mucho más concluyentes bioquímicamente.

Otras opciones para seguir con la línea marcada, sería intentar cristalizar la enzima en laboratorio, para comprobar que el refinamiento de la enzima corresponde o se parece con los resultados obtenidos por Rayos-X.

Además, también se podría seguir con la investigación buscando cómo mejorar las interacciones de la enzima mutada y el fármaco Isoniazida, haciendo un estudio computacional más avanzado, procesando los datos mediante modelos estadísticos y realizando un estudio experimental químico, donde se diseñase un fármaco parecido a la Isoniazida, añadiéndole más residuos aromáticos para potenciar las interacciones pi-stacking y puentes de hidrógeno, evitando los mecanismos de resistencia del microorganismo al fármaco.

7.3 Seguimiento de la planificación

En un inicio las tareas propuestas no eran exactamente las mismas que las finales, ya que se realizaron algunos cambios durante el desarrollo del trabajo, como puede observarse en las Figuras 55 y 56. Además, no se ajustó perfectamente el tiempo de cada tarea, aunque tampoco fue demasiado distinto al tiempo definitivo empleado.

TAREAS	DURACIÓN
1. DOCUMENTACIÓN INICIAL	39 h
1.1. Búsqueda de enzimas	15 h
1.2. Elaboración de proyecto	5 h
1.3. Redacción PEC 0	4 h
1.4. Documentación programas a utilizar	4 h
1.5. Descarga e instalación de programas	2 h
1.6. Redacción PEC 1	9 h
2. REFINAMIENTO ENZIMA MUTADA	85 h
2.1. Descarga de secuencia y archivo .pdb de PDB.	1 h
2.2. Ajuste de estructura en el programa	60 h
2.3. Comparación de enzimas según estructura	4 h
2.4. Redacción PEC 2	20 h
3. ESTUDIO DE DOCKING CON FÁRMACO ISONIAZIDA	85 h
3.1. Estudio de Isoniazida con enzima mutada	30 h
3.2. Estudio de Isoniazida con enzima sin mutar	30 h
3.3. Comparación de enzimas según docking	5 h
3.4. Redacción PEC 3	20 h
4. ELABORACIÓN DE LA MEMORIA (PEC 4)	50 h
5. ELABORACIÓN DE LA PRESENTACIÓN (PEC 5a)	35 h
6. DEFENSA PÚBLICA Y PREPARACIÓN (PEC 5b)	20h
7. AUTOEVALUACIÓN FINAL	1h
TOTAL	315 h

Figura 56. Planificación inicial del trabajo

TAREAS	DURACIÓN
1. DOCUMENTACIÓN INICIAL	39 h
1.1. Búsqueda de enzimas	15 h
1.2. Elaboración de proyecto	5 h
1.3. Redacción PEC 0	4 h
1.4. Documentación programas a utilizar	4 h
1.5. Descarga de programas	2 h
1.6. Redacción PEC 1	9 h
2. REFINAMIENTO ENZIMA MUTADA	100 h
2.1. Instalación y comprensión de programas	30 h
2.2. Descarga de secuencia y archivo .pdb de PDB	1 h
2.3. Visualización de la secuencia en PyMol	1h
2.4. Ajuste de estructura en el programa	50 h
2.5. Comparación de enzimas según estructura	3 h
2.6. Redacción PEC 2	15 h
3. ESTUDIO DE DOCKING CON FÁRMACO ISONIAZIDA	98 h
3.1. Instalación y comprensión de programas	20 h
3.2. Obtención de Isoniazida y optimización geométrica	3 h
3.3. Estudio de Docking de Isoniazida con enzima mutada	30 h
3.4. Estudio de Docking de Isoniazida con enzima sin mutar	20 h
3.5. Comparación de enzimas según docking	5 h
3.6. Redacción PEC 3	20 h
4. ELABORACIÓN DE LA MEMORIA (PEC 4)	50 h
5. ELABORACIÓN DE LA PRESENTACIÓN (PEC 5a)	35 h
6. DEFENSA PÚBLICA Y PREPARACIÓN (PEC 5b)	20h
7. AUTOEVALUACIÓN FINAL	1h
TOTAL	343 h

Figura 55. Planificación final del trabajo.

Además, se realizaron los siguientes cambios:

- Finalmente, la versión utilizada de *FoldX* no fue la prevista en el Plan de Trabajo (“FoldX 4.0 Suite”), sino que se utilizó la versión “FoldX 5.0” por fallos de compatibilidad encontrados. Se utilizó la versión para Windows 64.

- Además, finalmente se optó por utilizar *FoldX* dentro del entorno *YASARA* con el fin de obtener una interfaz más fácil de usar que permitiese el trabajo directo sobre la proyección en 3D de la enzima, lo que ha permitido utilizar *FoldX* en una versión más intuitiva y ver la estructura 3D de la enzima a cada paso.
- Antes de comenzar a trabajar con la enzima, se obtuvo una previsualización de las cadenas de la enzima a refinar descargada mediante el programa *PyMol* (Versión *PyMol 2.4 for Windows*).
- A la hora de redactar esta memoria para el entregable PEC 2, se ha optado por crear un repositorio en Github donde subir los resultados obtenidos, los archivos *.pdb*, *FASTA* y la información que se crea relevante. El repositorio es: <https://github.com/mariarm23/TFM/>. Se irán subiendo los archivos y se ordenarán y nombrarán en la memoria final del TFM.
- El cambio más significativo en cuanto a la metodología de trabajo estimada ha sido con el programa *ModelX*, el cual se quería utilizar junto a *FoldX*, pero no se ha conseguido instalar y poner en funcionamiento siguiendo los tutoriales encontrados, ni en su versión en Windows ni en su versión en Linux, por lo que se prescindirá de este programa a la hora de hacer el estudio de *docking*.
- Además de utilizar *Autodock-Vina* para realizar el estudio de docking, se instaló y utilizó *AutodockTool*, programa que proporciona una interfaz gráfica fuera de la terminal de trabajo de Windows.
- Finalmente se optó por utilizar *GaussView* en vez de *ChemDraw* para realizar la estructura de la Isoniazida puesto que el programa utilizado nos proporcionaba el fármaco en el formato de trabajo más recomendado por los tutoriales: *mol2*.
- Debido a un error del programa *AutodockTool* debido a cargas en la molécula de Isoniazida, se realizó una optimización de la geometría del fármaco antes de realizar el docking mediante el supercomputador Lusitania.
- Debido a la incapacidad por un error de observar las interacciones en el programa *AutodockTool*, se ha utilizado el programa web *Protein-Ligand Interaction Profiler (PLIP)*, donde se han podido comprobar perfectamente los tipos de enlace entre el fármaco y las enzimas.
- El cambio más significativo en cuanto a la metodología de trabajo estimada ha sido con el programa *ModelX*, el cual se quería utilizar en un inicio, pero no se ha conseguido instalar y poner en funcionamiento siguiendo los tutoriales encontrados, ni en su versión en Windows ni en su versión en Linux, por lo que se ha prescindido de este programa a la hora de hacer el estudio de *docking*.

8 Autoevaluación

En la primera parte del trabajo se han cumplido los objetivos que se habían estipulado, se ha conocido a la perfección el funcionamiento de FoldX, que presentaba el mayor problema de este apartado al no haberse usado nunca. Se ha entendido la enzima, su funcionamiento y sus mutaciones y se ha ido adaptando el trabajo y el tiempo a las necesidades y problemas que han ido surgiendo.

En la segunda parte del trabajo también se han cumplido los objetivos que se habían estipulado, se ha aprendido a usar el programa *Autodock-vina*, que presentaba el mayor reto a la hora de los objetivos marcados y se ha realizado correctamente el estudio de docking, se ha conseguido ver las interacciones que tienen ambas enzimas con el fármaco y se han podido comparar las diferencias entre ambas, tanto en estructura, como en interacción, sacando posibles conclusiones sobre las enzimas.

En general, creo que se ha realizado un buen trabajo, el tiempo de realización se ha ajustado bien al tiempo de la asignatura, aunque ha habido que hacer un ajuste de horas personales planificadas. Se han empleado programas y técnicas totalmente desconocidas con éxito y sin excesiva complicación y se han cumplido todos los objetivos marcados.

Tal vez ha faltado un poco de tiempo para la profundización en la comprensión de todos los resultados del *docking*, pero personalmente no encuentro ninguna pega más allá de ello, aunque tampoco era un objetivo real del trabajo.

A la hora de realizar la memoria, tampoco se han encontrado problemas para introducir ningún apartado y se ha cumplido perfectamente el límite de 45 páginas entre introducción y conclusiones, siendo estas 45.

En general, he aprendido mucho con la realización de este trabajo y, lo más importante, cosas que desconocía totalmente, por lo que estoy tremendamente satisfecha.

9 Glosario

La tabla 3 contiene los términos y acrónimos más relevantes utilizados dentro de la memoria.

Tabla 3. Términos del glosario.

<i>KatG</i>	Enzima catalasa-peroxidasa de <i>M.tuberculosis</i>
<i>katg</i>	Gen que codifica la enzima <i>KatG</i> de <i>M.tuberculosis</i>
<i>M.tuberculosis</i>	Microorganismos <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
PDB	Protein Data Bank
MDR-TB	Tuberculosis multirresistente
XDR-TB	Tuberculosis extensamente resistente
INH	Isoniazida
Cryo-EM	Microscopía crioelectrónica
SNP	Polimorfismos de un solo nucleótido
PdB	Pares de bases
PLIP	Protein-Ligand Interaction Profiler
Met	Metionina
Ser	Serina
Tyr	Tirosina
Asp	Ácido aspártico
W107R	Mutación de <i>KatG</i>
1SJ2	Nombre de PDB de <i>KatG</i>

10 Bibliografía

1. Watson, J. D. & Crick, F. H. C. Molecular structure of nucleic acids: A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* **171**, 737–738 (1953).
2. Sanger, F. . et al. & Sanger, F. . et al. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **74**, (1977).
3. Dias Xavier, D. *Estrategia de solución al problema de la anotación de secuencias de ADN mediante la metodología CommonKADS*. (2011).
4. Can, T. Introduction to bioinformatics. *Methods Mol. Biol.* **1107**, 51–71 (2014).
5. Resistencia a los antibióticos: MedlinePlus en español. <https://medlineplus.gov/spanish/antibioticresistance.html>. Fecha de acceso: 10 de marzo de 2021.
6. Quirós-Roldán, E., Airoidi, M., Moretti, F. & Carosi, G. Bases moleculares de resistencia de VHB. *Rev. diagn. biol* **50**, 204–206 (2001).
7. Antibiotic resistance. 31 July <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance> (2020). Fecha de acceso: 10 de marzo de 2021.
8. Unissa, A. N. *et al.* Significance of catalase-peroxidase (KatG) mutations in mediating isoniazid resistance in clinical strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* **15**, 111–120 (2018).
9. Romay, Z. *et al.* Detección de la mutación S315T en el gen katg como estrategia para identificación de *mycobacterium tuberculosis* resistente a isoniácida en un laboratorio de referencia. *Rev. Chil. Infectol.* **29**, 607–613 (2012).
10. Menoyo Bárcena, P. TUBERCULOSIS. (2015).
11. Fiche Technique Santé-Sécurité: Agents Pathogènes – *Mycobacterium tuberculosis* et complexe *Mycobacterium tuberculosis* - Canada.ca. 09/13/2012.
12. Madigan, M. T., Martinko, J. M., Parker, J. & Gacto Fernández, M. *Brock biología de los microorganismos*. (Prentice Hall Hispanoamericana, 2004).
13. Niederweis, M., Danilchanka, O., Huff, J., Hoffmann, C. & Engelhardt, H. *Mycobacterial outer membranes: in search of proteins*. *Trends Microbiol.* **18**, 109–116 (2010).
14. Cole, S. T. *et al.* Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* **393**, 537–544 (1998).
15. Kolattukudy, P. E., Fernandes, N. D., Azad, A. K., Fitzmaurice, A. M. & Sirakova, T. D. Biochemistry and molecular genetics of cell-wall lipid biosynthesis in *mycobacteria*. *Mol. Microbiol.* **24**, 263–70 (1997).
16. Cook, G. M. *et al.* Physiology of *mycobacteria*. *Adv. Microb. Physiol.* **55**, 81–182, 318–9 (2009).

17. Tuberculosis – Micobacterias. *06/09/2014* 1 (2014).
18. Bloom, B. R. *Tuberculosis : pathogenesis, protection, and control*. (ASM Press, 1994).
19. Institut Pasteur. Tuberculosis: información y tratamientos - Institut Pasteur. *Mars*, 2017.
20. Agarwal, R., Malhotra, P., Awasthi, A., Kakkar, N. & Gupta, D. Tuberculous dilated cardiomyopathy: an under-recognized entity? *BMC Infect. Dis.* **5**, 29 (2005).
21. Griffith, D. E. & Kerr, C. M. Tuberculosis: Disease of the past, disease of the present. *J. PeriAnesthesia Nurs.* **11**, 240–245 (1996).
22. Ramos, R. G. *et al.* *Tratamiento actual de la tuberculosis*. *AN. MED. INTERNA (Madrid)* vol. **20** (2003).
23. *Informe mundial sobre la tuberculosis 2017*. Fecha de acceso: 8 de marzo de 2021.
24. Monica Dias. OMS | Tuberculosis farmacorresistente. *WHO* (2013). Fecha de acceso: 8 de marzo de 2021.
25. Borgdorff, M. W. & van Soolingen, D. The re-emergence of tuberculosis: What have we learnt from molecular epidemiology? *Clinical Microbiology and Infection* vol. **19** 889–901 (2013).
26. Murray, C. J. & Lopez, A. D. Regional patterns of disability-free life expectancy and disability-adjusted life expectancy: Global Burden of Disease Study. *Lancet* **349**, 1347–1352 (1997).
27. Phillips, L. Infectious disease: TB's revenge. *Nature* **493**, 14–16 (2013).
28. Grobusch, M. P., Schaumburg, F., Altpeter, E. & Bélard, S. Medikamentenresistente Tuberkulose. *Internist (Berl)*. **57**, 126–135 (2016).
29. Sonnenberg, P. *et al.* HIV-1 and recurrence, relapse, and reinfection of tuberculosis after cure: a cohort study in South African mineworkers. *Lancet* **358**, 1687–1693 (2001).
30. Proteína KatG: descripción general | Temas de ScienceDirect. <https://www.sciencedirect.com/topics/pharmacology-toxicology-and-pharmaceutical-science/katg-protein>. Fecha de acceso: 27 de marzo de 2021.
31. katG - Catalase-peroxidase - Mycobacterium tuberculosis (strain CDC 1551 / Oshkosh) - katG gene & protein. <https://www.uniprot.org/uniprot/P9WIE4>. Fecha de acceso: 27 de marzo de 2021.
32. Muthaiah, M. *et al.* Prevalence of mutations in genes associated with rifampicin and isoniazid resistance in Mycobacterium tuberculosis clinical isolates. *J. Clin. Tuberc. Other Mycobact. Dis.* **8**, 19–25 (2017).
33. Heym, B., Alzari, P. M., Honore, N. & Cole, S. T. Missense mutations in the

- catalase-peroxidase gene, *katG*, are associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol. Microbiol.* **15**, 235–245 (1995).
34. Nagy, J. M., Cass, A. E. G. & Brown, K. A. Purification and characterization of recombinant catalase-peroxidase, which confers isoniazid sensitivity in *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Biol. Chem.* **272**, 31265–31271 (1997).
 35. Zhang, Y., Heym, B., Allen, B., Young, D. & Cole, S. The catalase - Peroxidase gene and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature* **358**, 591–593 (1992).
 36. Machado, P., Bizarro, C. V. & Basso, L. A. Resistance Reversed in *KatG* Mutants of *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends in Microbiology* vol. **27** 655–656 (2019).
 37. Munir, A. *et al.* Using cryo-EM to understand antimycobacterial resistance in the catalase-peroxidase (*KatG*) from *Mycobacterium tuberculosis*. *Structure* (2021) doi:10.1016/j.str.2020.12.008.
 38. Zhao, X., Hersleth, H. P., Zhu, J., Andersson, K. K. & Magliozzo, R. S. Access channel residues Ser315 and Asp137 in *Mycobacterium tuberculosis* catalase-peroxidase (*KatG*) control peroxidatic activation of the pro-drug isoniazid. *Chem. Commun.* **49**, 11650–11652 (2013).
 39. Antibiotic Resistance. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance>. Fecha de acceso: 17 de marzo de 2021.
 40. Sengupta, S., Chattopadhyay, M. K. & Grossart, H. P. The multifaceted roles of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *Frontiers in Microbiology* vol. **4** (2013).
 41. Gould, I. M. & Bal, A. M. New antibiotic agents in the pipeline and how they can help overcome microbial resistance. *Virulence* **4**, 185–191 (2013).
 42. Monnier, A. A., Eisenstein, B. I., Hulscher, M. E. & Gyssens, I. C. Towards a global definition of responsible antibiotic use: Results of an international multidisciplinary consensus procedure. *J. Antimicrob. Chemother.* **73**, vi3–vi16 (2018).
 43. Molina-Santiago, C., de Vicente, A. & Romero, D. The race for antimicrobials in the multidrug resistance era. *Microbial Biotechnology* vol. **11** 976–978 (2018).
 44. Read, A. F. & Woods, R. J. Antibiotic resistance management. *Evol. Med. Public Heal.* **2014**, 147 (2014).
 45. The antibiotic alarm. *Nature* vol. **495** 141 (2013).
 46. Piddock, L. J. V. The crisis of no new antibiotics-what is the way forward? *The Lancet Infectious Diseases* vol. **12** 249–253 (2012).
 47. Luyt, C. E., Bréchet, N., Trouillet, J. L. & Chastre, J. Antibiotic stewardship in the intensive care unit. *Crit. Care* **18**, (2014).
 48. Schleinkofer, K., Wang, T. & Wade, R. C. Molecular Docking. *Encycl. Ref.*

- Genomics Proteomics Mol. Med.* **443**, 1149–1153 (2006).
49. Jeeves, R. E. *et al.* Mycobacterium tuberculosis is resistant to isoniazid at a slow growth rate by single nucleotide polymorphisms in katg codon ser315. *PLoS One* **10**, e0138253 (2015).
 50. Suarez, J., Rangelova, K., Schelvis, J. P. M. & Magliozzo, R. S. Antibiotic resistance in Mycobacterium tuberculosis. Peroxidase intermediate bypass causes poor isoniazid activation by the S315G mutant of M. tuberculosis catalase-peroxidase (KatG). *J. Biol. Chem.* **284**, 16146–16155 (2009).
 51. Adiyaman, R. & McGuffin, L. J. Methods for the refinement of protein structure 3D models. *International Journal of Molecular Sciences* vol. **20** (2019).
 52. Elgendy, N. & Elragal, A. Big Data Analytics: A Literature Review Paper Feasibility Study for Seismicity Forecasting in Seismically Active Underground Mines View project Data Science Innovation View project. (2014) doi:10.1007/978-3-319-08976-8_16.
 53. Delgado, J., Radusky, L. G., Cianferoni, D. & Serrano, L. Structural bioinformatics FoldX 5.0: working with RNA, small molecules and a new graphical interface. *Bioinformatics* **35**, 4168–4169 (2019).
 54. Smyth, M. S. & Martin, J. H. J. x Ray crystallography. *Journal of Clinical Pathology - Molecular Pathology* vol. **53** 8–14 (2000).
 55. Waseda, Y., Matsubara, E. & Shinoda, K. *X-Ray Diffraction Crystallography X-Ray Diffraction Crystallography Introduction, Examples and Solved Problems*.
 56. Conklin, D. La Bioinformática: una perspectiva de la estructura de proteínas. 3–10 (2010).
 57. Homepage | FoldX. <http://foldxsuite.crg.eu/>. Fecha de acceso: 3 de marzo de 2021.
 58. Schymkowitz, J. *et al.* The FoldX web server: An online force field. *Nucleic Acids Res.* **33**, W382 (2005).
 59. Gibbs Free Energy - an overview | ScienceDirect Topics. <https://www.sciencedirect.com/topics/chemistry/gibbs-free-energy>. Fecha de acceso: 21 de abril de 2021.
 60. Buß, O., Rudat, J. & Ochsenreither, K. FoldX as Protein Engineering Tool: Better Than Random Based Approaches? *Computational and Structural Biotechnology Journal* vol. **16** 25–33 (2018).
 61. Krieger, E. & Vriend, G. YASARA View - molecular graphics for all devices - from smartphones to workstations. *Bioinformatics* **30**, 2981–2982 (2014).
 62. The performance of current methods in ligand–protein docking on JSTOR. <https://www.jstor.org/stable/24107087?seq=1>. Fecha de acceso: 14 de mayo de 2021.
 63. Trott, O. & Olson, A. J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of

- docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J. Comput. Chem.* **31**, NA-NA (2009).
64. Meng, X.-Y., Zhang, H.-X., Mezei, M. & Cui, M. Molecular Docking: A Powerful Approach for Structure-Based Drug Discovery. *Curr. Comput. Aided-Drug Des.* **7**, 146–157 (2012).
65. Halperin, I., Ma, B., Wolfson, H. & Nussinov, R. Principles of docking: An overview of search algorithms and a guide to scoring functions. *Proteins: Structure, Function and Genetics* vol. **47** 409–443 (2002).
66. Mezei, M. A new method for mapping macromolecular topography. *J. Mol. Graph. Model.* **21**, 463–472 (2003).
67. Bertrand, T. *et al.* Crystal structure of Mycobacterium tuberculosis catalase-peroxidase. *J. Biol. Chem.* **279**, 38991–38999 (2004).
68. Quan, L., Lv, Q. & Zhang, Y. STRUM: Structure-based prediction of protein stability changes upon single-point mutation. *Bioinformatics* **32**, 2936–2946 (2016).
69. Purkan *et al.* Mutation of katG in a clinical isolate of mycobacterium tuberculosis: Effects on catalase-peroxidase for isoniazid activation. *Ukr. Biochem. J.* **88**, 71–81 (2016).
70. Zhao, X., Yu, S. & Magliozzo, R. S. Characterization of the Binding of Isoniazid and Analogues to Mycobacterium. *Society* 3161–3170 (2007).
71. Nguyen, N. T. *et al.* Autodock Vina Adopts More Accurate Binding Poses but Autodock4 Forms Better Binding Affinity. *J. Chem. Inf. Model.* **60**, 204–211 (2020).
72. Energía Gibbs (Gratis) - Chemistry LibreTexts. [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_\(Physical_and_Theoretical_Chemistry\)/Thermodynamics/Energies_and_Potentials/Free_Energy/Gibbs_\(Free\)_Energy](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_(Physical_and_Theoretical_Chemistry)/Thermodynamics/Energies_and_Potentials/Free_Energy/Gibbs_(Free)_Energy). Fecha de acceso: 30 de mayo de 2021.
73. Equilibrium Constant from Delta G. https://www.chem.purdue.edu/gchelp/howtosolveit/Thermodynamics/K_from_DelG.html. Fecha de acceso: 4 de mayo de 2021.
74. Microbiología de la tuberculosis. https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1137-66272007000400006. Fecha de acceso: 28 de marzo de 2021.
75. Kd de afinidad de unión y equilibrio constante de disociación | Malvern Panalytical. <https://www.malvernpanalytical.com/es/products/measurement-type/binding-affinity>. Fecha de acceso: 17 de abril de 2021.
76. McGaughey, G. B., Gagné, M. & Rappé, A. K. π -Stacking interactions. Alive and well in proteins. *J. Biol. Chem.* **273**, 15458–15463 (1998).

