

I. INDICE GENERAL.

I.	AGRADECIMIENTOS.....	1
II.	INDICE GENERAL.....	2
III.	INDICE DE TABLAS.....	5
IV.	INDICE DE FIGURAS.	9
V.	INDICE DE ECUACIONES.....	12
VI.	RESUMEN.....	13
VII.	ABSTRACT.	14
1.	INTRODUCCIÓN.....	15
1.1.	Antecedentes generales.....	15
1.2.	Receptores de ACh (AChRs).....	15
1.2.1.	Receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR).....	16
1.2.2.	Estructura del nAChR.....	16
1.2.3.	Subtipos y conformaciones del nAChR.....	18
1.3.	Sitios de unión a ligando.	20
1.4.	Problemas asociados al mal funcionamiento de nAChR y relevancia estadística de su estudio.....	22
2.	HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS.....	25
2.1.	Hipótesis.....	25
2.2.	Objetivos.	25
2.2.1.	Objetivo general.....	25
2.2.2.	Objetivos específicos	25
3.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
3.1.	Simulación de la flexibilidad estructural de nAChRs humano $\alpha 7$ en estado abierto (conformación agonista) y $\alpha 4(2)\beta 2(3)$ en estado abierto y cerrado (conformación agonista y antagonista).....	27

3.1.1.	Pre-procesamiento de las estructuras proteicas.	27
3.1.2.	Construcción de los sistemas moleculares.	28
3.1.3.	Protocolo de simulación.	30
3.2.	Búsqueda de sitios de unión a ligandos putativos en nAChRs humano (estequiometria $\alpha 7$ agonista y $\alpha 4\beta 2$ agonista y antagonista).	31
3.3.	Detección de sitios putativos de unión conservados en las diversas trayectorias de dinámica molecular.	33
3.4.	Acoplamiento molecular.	34
3.4.1.	Obtención y preparación de ligandos.	34
3.4.2.	Creación de grillas y acoplamiento molecular proteína-ligando.	35
3.4.3.	Selección de conformaciones finales del acoplamiento proteína-ligando	35
4.	RESULTADOS.	37
4.1.	Desviación cuadrática media y energías totales de las dinámicas moleculares de nAChRs en estequiometria $\alpha 7$ (conformación agonista) y $\alpha 4(2)\beta 2(3)$ (conformaciones agonista y antagonista)	37
4.2.	Búsqueda de sitios putativos de unión a ligandos en nAChRs estequiometria $\alpha 7$ en estado abierto y $\alpha 4(2)\beta 2(3)$ en estado abierto y cerrado.	40
4.3.	Búsqueda de sitios de unión a ligando conservados entre distintas trayectorias de dinámica molecular.	41
4.3.1.	Sitios putativos de unión a ligando en receptores $\alpha 7$ agonista.....	41
4.3.2.	Sitios putativos de unión a ligando en receptores $\alpha 4(2)\beta 2(3)$ (conformación agonista).....	49
4.3.3.	Sitios putativos de unión a ligando en receptores $\alpha 4(2)\beta 2(3)$ antagonista.	
	56	
4.4.	Acoplamiento molecular proteína-ligando y cálculos de energía libre con el método MM-GBSA.	62

4.4.1.	Acoplamiento molecular proteína-ligando para las representaciones de las estructuras del nAChR $\alpha 7$ en conformación agonista.	62
4.4.2.	Acoplamiento molecular proteína-ligando para las estructuras promedios $\alpha 4(2)\beta 2(3)$ en conformación agonista.	63
4.4.3.	Acoplamiento proteína-ligando para las estructuras promedios $\alpha 4(2)\beta 2(3)$ antagonista.....	64
5.	DISCUSIÓN.....	65
6.	CONCLUSIONES.....	70
7.	ANEXOS.....	72
7.1.	Herramientas bioinformáticas y de química computacional.....	72
7.1.1.	Dinámica molecular.....	72
7.1.2.	Búsqueda de sitios de unión a ligandos.....	76
7.1.3.	Acoplamiento molecular (Docking molecular).	79
7.1.4.	Mecánica molecular/Superficie de área de Born (MM-GBSA).	83
7.2.	Código de programas.	85
7.2.1.	Script #1: Extracción de estructuras de una DM.	85
7.2.2.	Script #2: Automatización de SiteMap.....	86
7.2.3.	Script #3: extracción de residuos a 5Å de sitio putativo detectado.	87
7.2.4.	Script #4: Agrupación temporal de sitios putativos.....	89
7.2.5.	Script #5: Detección de sitios putativos entre DM.	93
7.2.6.	Script #6: Obtención de residuos consenso que forman el sitio putativo.	96
7.2.7.	Script #8: Obtención de ligandos que presenten mayor probabilidad de unión al receptor.....	102
7.3.	Material Suplementario.....	107
7.3.1.	Tablas de cantidad mínimo, máxima, promedio y moda de sitios putativos encontrados a lo largo de las dinámicas moleculares.	107

7.3.2.	Tablas de tiempo de apertura de los sitios por DM.	108
7.3.3.	Residuos que conforman cada sitio putativo estable para nAChRs $\alpha 7$ en estado abierto y $\alpha 4\beta 2$ en estado abierto y cerrado.	108
7.3.3.1.	Residuos que conforman los sitios putativos del nAChR $\alpha 7$	108
7.3.3.2.	Residuos que conforman los sitios putativos del nAChR $\alpha 4\beta 2$ en estado abierto.	112
7.3.3.3.	Residuos que conforman los sitios putativos del nAChR $\alpha 4\beta 2$ en estado cerrado.	116
7.3.4.	Tablas de moléculas acopladas en todas las representaciones de los sitios y energías de acoplamiento post-MM/GBSA en nAChRs $\alpha 7$ en estado abierto y $\alpha 4\beta 2$ en estado abierto y cerrado.	118
7.3.4.1.	Moléculas acopladas y energías post-MM/GBSA en nAChRs $\alpha 7$	118
7.3.4.2.	Moléculas acopladas y energías post-MM/GBSA en nAChRs $\alpha 4\beta 2$ en estado abierto.	124
7.3.4.3.	Moléculas acopladas y energías post-MM/GBSA en nAChRs $\alpha 4\beta 2$ en estado cerrado.	131
7.4.	Presentaciones a congresos.	135
8.	REFERENCIAS.	137

II. INDICE DE TABLAS.

Tabla 3.1:	Valores de número semilla para cada sistema sobre el cual se realizó simulación de dinámica molecular.	31
Tabla 4.1:	Ligandos que se acoplaron a más de tres sitios en el nAChR $\alpha 7$ en estado abierto.	63
Tabla 4.2:	Ligandos que se acoplaron a más de tres sitios en el nAChR $\alpha 4\beta 2$ en estado abierto.	64
Tabla 4.3:	Ligandos que se acoplaron a más de tres sitios en el nAChR $\alpha 4\beta 2$ en estado cerrado.	64

Tabla 7.1: Cantidad de sitios de unión putativos encontrados a través de SiteMap para cada DM.....	107
Tabla 7.2: Cantidad promedio de sitios de unión encontrados por cada estructura que conforma la trayectoria de dinámica molecular	107
Tabla 7.3: Moda de sitios de unión encontrado por cada estructura que conforma la trayectoria de dinámica molecular. En paréntesis se muestra la cantidad de repeticiones de la moda.	107
Tabla 7.4: Cantidad de posibles sitios de unión que se mantienen por sobre la mitad (50%) del tiempo de simulación total.....	107
Tabla 7.5: Porcentaje de tiempo en el que se encuentra el sitio en cada trayectoria de DM donde fue reconocido.	108
Tabla 7.6: Porcentaje de tiempo en el que se encuentra el sitio en cada trayectoria de DM donde fue reconocido.	108
Tabla 7.7: Porcentaje de tiempo en el que se encuentra el sitio en cada trayectoria de DM donde fue reconocido.	108
Tabla 7.8: Residuos conservados que conforman el primer sitio putativo de unión a ligando encontrado para la estructura $\alpha 7$ en estado agonista.....	109
Tabla 7.9: Residuos conservados que conforman el segundo sitio putativo de unión a ligando encontrado para la estructura $\alpha 7$ en estado agonista.	110
Tabla 7.10: Residuos conservados que conforman el tercer sitio putativo de unión a ligando encontrado para la estructura $\alpha 7$ en estado agonista.....	110
Tabla 7.11: Residuos conservados que conforman el cuarto sitio putativo de unión a ligando encontrado para la estructura $\alpha 7$ en estado agonista.....	111
Tabla 7.12: Residuos conservados que conforman el quinto sitio putativo de unión a ligando encontrado para la estructura $\alpha 7$ en estado agonista.....	111
Tabla 7.13: Residuos conservados que conforman el sexto sitio putativo de unión a ligando encontrado para la estructura $\alpha 7$ en estado agonista.....	112
Tabla 7.14: Residuos conservados que conforman el séptimo sitio putativo de unión a ligando encontrado para la estructura $\alpha 7$ en estado agonista.	112
Tabla 7.15: Residuos conservados que conforman el primer sitio putativo de unión a ligando encontrado para la estructura $\alpha 4\beta 2$ en estado agonista.....	113

Tabla 7.16: Residuos conservados que conforman el segundo sitio putativo de unión a ligando encontrado para la estructura $\alpha 4\beta 2$ en estado agonista.	113
Tabla 7.17: Residuos conservados que conforman el tercer sitio putativo de unión a ligando encontrado para la estructura $\alpha 4\beta 2$ en estado agonista.....	114
Tabla 7.18: Residuos conservados que conforman el cuarto sitio putativo de unión a ligando encontrado para la estructura $\alpha 4\beta 2$ en estado agonista.....	115
Tabla 7.19: Residuos conservados que conforman el quinto sitio putativo de unión a ligando encontrado para la estructura $\alpha 4\beta 2$ en estado agonista.....	115
Tabla 7.20: Residuos conservados que conforman el sexto sitio putativo de unión a ligando encontrado para la estructura $\alpha 4\beta 2$ en estado agonista.....	116
Tabla 7.21: Residuos conservados que conforman el primer sitio putativo de unión a ligando encontrado para la estructura $\alpha 4\beta 2$ en estado antagonista.....	116
Tabla 7.22: Residuos conservados que conforman el segundo sitio putativo de unión a ligando encontrado para la estructura $\alpha 4\beta 2$ en estado antagonista.	117
Tabla 7.23: Residuos conservados que conforman el tercer sitio putativo de unión a ligando encontrado para la estructura $\alpha 4\beta 2$ en estado antagonista.....	117
Tabla 7.24: Residuos conservados que conforman el cuarto sitio putativo de unión a ligando encontrado para la estructura $\alpha 4\beta 2$ en estado antagonista.....	118
Tabla 7.25: Moléculas que presentan el 25% menor de energía de unión tras la técnica de Docking molecular sobre el primer sitio de unión putativo en nAChR $\alpha 7$ en conformación agonista y sus mejores energías de unión luego de aplicar la técnica de MM-GBSA.....	119
Tabla 7.26: Moléculas que presentan el 25% menor de energía de unión tras la técnica de Docking molecular sobre el segundo sitio de unión putativo en nAChR $\alpha 7$ en conformación agonista y sus mejores energías de unión luego de aplicar la técnica de MM-GBSA.....	120
Tabla 7.27: Moléculas que presentan el 25% menor de energía de unión tras la técnica de Docking molecular sobre el tercer sitio de unión putativo en nAChR $\alpha 7$ en conformación agonista y sus mejores energías de unión luego de aplicar la técnica de MM-GBSA.....	121

Tabla 7.28: Moléculas que presentan el 25% menor de energía de unión tras la técnica de Docking molecular sobre el cuarto sitio de unión putativo en nAChR $\alpha 7$ en conformación agonista y sus mejores energías de unión luego de aplicar la técnica de MM-GBSA.....	122
Tabla 7.29: Moléculas que presentan el 25% menor de energía de unión tras la técnica de Docking molecular sobre el quinto sitio de unión putativo en nAChR $\alpha 7$ en conformación agonista y sus mejores energías de unión luego de aplicar la técnica de MM-GBSA.....	123
Tabla 7.30: Moléculas que presentan el 25% menor de energía de unión tras la técnica de Docking molecular sobre el sexto sitio de unión putativo en nAChR $\alpha 7$ en conformación agonista y sus mejores energías de unión luego de aplicar la técnica de MM-GBSA.....	124
Tabla 7.31: Moléculas que presentan el 25% menor de energía de unión tras la técnica de Docking molecular sobre el séptimo sitio de unión putativo en nAChR $\alpha 7$ en conformación agonista y sus mejores energías de unión luego de aplicar la técnica de MM-GBSA.....	124
Tabla 7.32: Moléculas que presentan el 25% menor de energía de unión tras la técnica de Docking molecular sobre el primer sitio de unión putativo en nAChR $\alpha 4\beta 2$ en conformación agonista y sus mejores energías de unión luego de aplicar la técnica de MM-GBSA	126
Tabla 7.33: Moléculas que presentan el 25% menor de energía de unión tras la técnica de Docking molecular sobre el segundo nAChR $\alpha 4\beta 2$ en conformación agonista y sus mejores energías de unión luego de aplicar la técnica de MM-GBSA.	127
Tabla 7.34: Moléculas que presentan el 25% menor de energía de unión tras la técnica de Docking molecular sobre el tercer sitio de unión putativo en nAChR $\alpha 4\beta 2$ en conformación agonista y sus mejores energías de unión luego de aplicar la técnica de MM-GBSA.	128
Tabla 7.35: Moléculas que presentan el 25% menor de energía de unión tras la técnica de Docking molecular sobre el cuarto sitio de unión putativo en nAChR	

$\alpha 4\beta 2$ en conformación agonista y sus mejores energías de unión luego de aplicar la técnica de MM-GBSA.	129
Tabla 7.36: Moléculas que presentan el 25% menor de energía de unión tras la técnica de Docking molecular sobre el quinto sitio de unión putativo en nAChR $\alpha 4\beta 2$ en conformación agonista y sus mejores energías de unión luego de aplicar la técnica de MM-GBSA.	131
Tabla 7.37: Moléculas que presentan el 25% menor de energía de unión tras la técnica de Docking molecular sobre el sexto sitio de unión putativo en nAChR $\alpha 4\beta 2$ en conformación agonista y sus mejores energías de unión luego de aplicar la técnica de MM-GBSA.	131
Tabla 7.38: Moléculas que presentan el 25% menor de energía de unión tras la técnica de Docking molecular sobre el primer sitio de unión putativo en nAChR $\alpha 4\beta 2$ en conformación antagonista y sus mejores energías de unión luego de aplicar la técnica de MM-GBSA.....	132
Tabla 7.39: Moléculas que presentan el 25% menor de energía de unión tras la técnica de Docking molecular sobre el segundo sitio de unión putativo en nAChR $\alpha 4\beta 2$ en conformación antagonista y sus mejores energías de unión luego de aplicar la técnica de MM-GBSA.....	133
Tabla 7.40: Moléculas que presentan el 25% menor de energía de unión tras la técnica de Docking molecular sobre el tercer sitio de unión putativo en nAChR $\alpha 4\beta 2$ en conformación antagonista y sus mejores energías de unión luego de aplicar la técnica de MM-GBSA.....	133
Tabla 7.41: Moléculas que presentan el 25% menor de energía de unión tras la técnica de Docking molecular sobre el cuarto sitio de unión putativo en nAChR $\alpha 4\beta 2$ en conformación antagonista y sus mejores energías de unión luego de aplicar la técnica de MM-GBSA.....	134

III. INDICE DE FIGURAS.

Figura 1.1: Estructura química del neurotransmisor Acetilcolina.....	15
-----------------------------------------------------------------------------	----

Figura 1.2: Diagrama del nAChR en el que se puede visualizar que está compuesto por 5 subunidades.	17
Figura 1.3: Diagrama de cintas de la vista lateral de una subunidad α	18
Figura 1.4: Segmentos de transmembrana que componen una subunidad del poro.	19
Figura 1.5: Principal cambio conformacional en el mecanismo de apertura del poro.	20
Figura 1.6: Esquema de las conformaciones de los nAChRs.	21
Figura 1.7: Ubicación de los sitios de unión ortostérico en la interfaces de nAChR homopentámero y heteropentámero.	22
Figura 3.1: Sistema molecular final para el nAChR $\alpha 7$ humano en estado abierto.	29
Figura 3.2: Sistema molecular final para el nAChR $\alpha 4(2)\beta 2(3)$ humano en estado abierto.	29
Figura 3.3: Sistema molecular final para nAChR $\alpha 4(2)\beta 2(3)$ humano en estado cerrado.	30
Figura 4.1: RMSD de las cinco dinámicas moleculares del receptor nicotínico en estequiometría $\alpha 7$ en conformación agonista.	38
Figura 4.2: RMSD de las cinco dinámicas moleculares del receptor nicotínico en estequiometría $\alpha 4\beta 2$ en conformación agonista.	38
Figura 4.3: RMSD de las cinco dinámicas moleculares del receptor nicotínico en estequiometría $\alpha 4\beta 2$ en conformación antagonista.	39
Figura 4.4: Energía total de las 5 trayectorias de dinámica molecular para el sistema $\alpha 7$	39
Figura 4.5: Energía total de las 5 trayectorias de dinámica molecular para el sistema $\alpha 4(2)\beta 2(3)$ (estado abierto).	40
Figura 4.6: Energía total de las 5 trayectorias de dinámica molecular para el sistema $\alpha 4(2)\beta 2(3)$ (estado cerrado).	40
Figura 4.7: Primer sitio putativo conservado entre diversas dinámicas moleculares del nAChR $\alpha 7$	42

Figura 4.8: Segundo sitio putativo conservado entre diversas dinámicas moleculares del nAChR $\alpha 7$	43
Figura 4.9: Tercer sitio putativo conservado entre diversas dinámicas moleculares del nAChR $\alpha 7$	44
Figura 4.10: Cuarto sitio putativo conservado entre diversas dinámicas moleculares del nAChR $\alpha 7$	45
Figura 4.11: Quinto sitio putativo conservado entre diversas dinámicas moleculares del nAChR $\alpha 7$	46
Figura 4.12: Sexto sitio putativo conservado entre diversas dinámicas moleculares del nAChR $\alpha 7$	48
Figura 4.13: Séptimo sitio putativo conservado entre diversas dinámicas moleculares del nAChR $\alpha 7$	49
Figura 4.14: Primer sitio putativo conservado entre diversas dinámicas moleculares del nAChR $\alpha 4\beta 2$ en estado abierto.....	51
Figura 4.15: Segundo sitio putativo conservado entre diversas dinámicas moleculares del nAChR $\alpha 4\beta 2$ en estado abierto.....	52
Figura 4.16: Tercer sitio putativo conservado entre diversas dinámicas moleculares del nAChR $\alpha 4\beta 2$ en estado abierto.....	53
Figura 4.17: Cuarto sitio putativo conservado entre diversas dinámicas moleculares del nAChR $\alpha 4\beta 2$ en estado abierto.....	54
Figura 4.18: Quinto sitio putativo conservado entre diversas dinámicas moleculares del nAChR $\alpha 4\beta 2$ en estado abierto.....	55
Figura 4.19: Sexto sitio putativo conservado entre diversas dinámicas moleculares del nAChR $\alpha 4\beta 2$ en estado abierto.....	56
Figura 4.20: Primer sitio putativo conservado entre diversas dinámicas moleculares del nAChR $\alpha 4\beta 2$ en estado cerrado.....	58
Figura 4.21: Segundo sitio putativo conservado entre diversas dinámicas moleculares del nAChR $\alpha 4\beta 2$ en estado cerrado.....	59
Figura 4.22: Tercer sitio putativo conservado entre diversas dinámicas moleculares del nAChR $\alpha 4\beta 2$ en estado cerrado.....	60

Figura 4.23: Tercer sitio putativo conservado entre diversas dinámicas moleculares del nAChR $\alpha 4\beta 2$ en estado cerrado.....	61
Figura 7.1: Esquema de las condiciones periódicas de borde.....	75
Figura 7.2: Algunos de los métodos de identificación de sitios de posibles sitios de unión a ligandos.	78
Figura 7.3: Definición del núcleo y rotámeros.....	80
Figura 7.4: Embudo de Glide para la selección de conformaciones finales de los ligandos.....	82

IV. INDICE DE ECUACIONES.

Ecuación 7.1	72
Ecuación 7.2	73
Ecuación 7.3	84
Ecuación 7.4	84