

## II. ÍNDICE DE CONTENIDOS

II. ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	5
III. ÍNDICE DE FIGURAS.....	7
IV. ÍNDICE DE TABLAS.....	8
V. RESUMEN.....	9
VI. ABSTRACT.....	10
1. INTRODUCCIÓN.....	11
1.1. ANTECEDENTES GENERALES.....	11
1.1.1. Patologías características por parte de Pseudomonas aeruginosa.....	12
1.2. PSEUDOMONAS AERUGINOSA.....	14
1.2.1. Características.....	14
1.3. MECANISMO DE INFECCIÓN PROPUESTO PARA FOSFORILCOLINA FOSFATASA.....	19
1.3.2. Súperfamilia Haloácido dehalogenasa (HAD).....	24
1.4. ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DE PchP.....	25
1.4.1. Sitio activo en PchP.....	27
1.4.2. Inhibición de PchP por compuestos de amonio cuaternario.....	30
1.4.3. Sitio de inhibición en PchP.....	32
2. HIPÓTESIS.....	37
3. OBJETIVOS.....	38
3.1. OBJETIVO GENERAL.....	38
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	38
4. METODOLOGÍA.....	39
4.1. SIMULACIÓN DE ACOPLAMIENTO PROTEÍNA-LIGANDO (DOCKING).....	39
4.1.1. Antecedentes previos.....	39
4.1.2. Acoplamiento proteína-ligando.....	39
4.1.3. Confirmación de la metodología de docking.....	40
4.2. SIMULACIÓN MOLECULAR DEL COMPLEJO.....	41
4.2.1. Construcción del sistema molecular.....	41
4.2.2. Minimización energética y dinámica molecular.....	42
4.2.3. Análisis posteriores a la simulación de dinámica molecular.....	44
4.3. ANÁLISIS DE PERTURBACIÓN DE ENERGÍA LIBRE (FEP).....	44
4.3.1. Creación de la mutante E42A.....	44
4.3.2. Parámetros de perturbación y restricciones energéticas al sistema.....	46
4.3.3. Análisis posteriores a los cálculos de perturbación de energía libre.....	47
4.4 TRANSFORMACIÓN DE CONSTANTES CINÉTICAS DE INHIBICIÓN EN VALORES DE ENERGÍA LIBRE.....	47

5. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	49
5.1. ACOPLAMIENTO PROTEÍNA-LIGANDO (DOCKING).....	49
5.1.1. Conformaciones .....	49
5.1.2. Validación de la metodología de docking.....	51
5.2. ANÁLISIS DE LA TRAYECTORIA DE SIMULACIÓN DE DINÁMICA MOLECULAR.....	54
5.2.1. Evaluación de la estabilidad del complejo enzima-sustrato.....	54
5.2.2. Caracterización estructural de los sitios activo y de inhibición.....	56
5.2.3. Análisis de cavidades e hidratación de los sitios activo y de inhibición.....	59
5.2.4. Análisis de la superficie de área accesible a solvente.....	60
5.2.5. Análisis de enlaces de hidrógeno.....	62
5.2.6. Análisis de potencial electrostático.....	66
5.3. ESTUDIO DEL ANÁLISIS DE PERTURBACIÓN DE ENERGÍA LIBRE (FEP).....	67
5.3.1. Relación energética entre valores experimentales y cálculos de FEP.....	67
5.3.2. Análisis de la perturbación de la energía libre en la mutante E42A_1.....	69
5.3.3. Análisis de la perturbación de la energía libre en la mutante E42A_2.....	70
5.3.3.1. Análisis de la trayectoria de la mutante E42A_2 en FEP .....	71
5.3.3.2. Análisis de enlaces de hidrógeno en la mutante E42A_2 .....	76
5.3.3.3. Análisis de potencial electrostático en la mutante E42A_2 .....	80
5.3.3.4. Comparativa de la enzima en estado silvestres WT-PchP con la mutante E42A_2 ...	81
6. CONCLUSIONES.....	85
7. TRABAJOS FUTUROS.....	86
8. BIBLIOGRAFÍA .....	87
9. ANEXOS I .....	94
9.1. PRESENTACIÓN A CONGRESOS .....	94
10. ANEXOS II.....	95
10.1. FUNDAMENTOS METODOLÓGICOS .....	95
10.1.1. Métodos de Perturbación .....	95
10.2. INFORMACIÓN SUPLEMENTARIA DE LOS CÁLCULOS DE FEP .....	103
10.2.1. ENERGÍAS LIBRES DE LA MUTANTE E42A_1 .....	103
10.2.2. ENERGÍAS LIBRES DE LA MUTANTE E42A_2 .....	104
11. ANEXOS III .....	105
11.1. SCRIPTS Y PROGRAMAS .....	105
11.1.1. SCRIPTS DE MINIMIZACIÓN ENERGÉTICA Y DINÁMICA MOLECULAR.....	105
11.1.2. SCRIPTS DE FEP.....	107

### III. ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1: <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> .....	15
FIGURA 2: GRÁFICO DEL TAMAÑO DEL GENOMA ENTRE DIVERSOS ORGANISMOS PROCARIONTES.....	17
FIGURA 3: METABOLISMO DE COLINAS.....	21
FIGURA 4: MECANISMO DE INFECCIÓN PROPUESTO PARA FOSFORILCOLINA FOSFATASA.....	24
FIGURA 5: COMPARACIÓN DE COLINA CON BISTRIS.....	26
FIGURA 6: ESTRUCTURA SECUNDARIA DE PCHP.....	26
FIGURA 7: SITIO ACTIVO DE PCHP.....	29
FIGURA 8: MODELO CATALÍTICO DE PCHP.....	34
FIGURA 9: ETAPAS EN LA CONSTRUCCIÓN DEL SISTEMA EN ESTADO SILVESTRE.....	42
FIGURA 10: CICLO TERMODINÁMICO.....	45
FIGURA 11: TOPOLOGÍA DUAL DE LA MUTANTE E42A.....	46
FIGURA 12: CONFÓRMEROS OBTENIDOS A TRAVÉS DE SIMULACIONES DE <i>DOCKING</i> .....	51
FIGURA 13: ALINEAMIENTO ESTRUCTURAL DE MOLÉCULAS DE PCH Y BTB INTERACTUANDO CON PCHP.....	53
FIGURA 14: GRÁFICOS DE RMSD DEL SITIO ACTIVO.....	55
FIGURA 15: GRÁFICOS DE RMSD DEL SITIO DE INHIBICIÓN.....	55
FIGURA 16: RESIDUOS PRESENTES EN LOS SITIOS ACTIVO Y DE INHIBICIÓN.....	58
FIGURA 17: REPRESENTACIÓN DE CAVIDADES E HIDRATACIÓN EN PCHP.....	59
FIGURA 18: REPRESENTACIÓN DE LA SUPERFICIE DE ÁREA ACCESIBLE AL SOLVENTE.....	61
FIGURA 19: GRÁFICOS DE ENLACES DE HIDRÓGENO EN EL SITIO ACTIVO.....	64
FIGURA 20: GRÁFICOS DE ENLACES DE HIDRÓGENO EN EL SITIO DE INHIBICIÓN.....	65
FIGURA 21: REPRESENTACIÓN DE POTENCIAL ELECTROSTÁTICO EN WT-PCHP.....	67
FIGURA 22: ENERGÍA LIBRE TOTAL PARA LA MUTANTE E42A_1.....	70
FIGURA 23: ENERGÍA LIBRE TOTAL PARA LA MUTANTE E42A_2.....	71
FIGURA 24: TRAYECTORIA DE LOS LIGANDOS PCH EN AMBOS SITIOS PARA LA SIMULACIÓN DE FEP.....	75
FIGURA 25: GRÁFICOS DE ENLACES DE HIDRÓGENO EN EL SITIO ACTIVO.....	78
FIGURA 26: GRÁFICOS DE ENLACES DE HIDRÓGENO EN EL SITIO DE INHIBICIÓN.....	79
FIGURA 27: REPRESENTACIÓN DE POTENCIAL ELECTROSTÁTICO EN E42A_2.....	80
FIGURA 28: SUPERFICIE DE ÁREA ACCESIBLE A SOLVENTE ENTRE WT_PCHP Y E42A_2.....	84
FIGURA 29: RELACIONES ENTRE IMPORTANTES REGIONES DEL ESPACIO DE FASE.....	99
FIGURA 30: RELACIÓN TERMODINÁMICA DE $\Delta A$ , $\Delta S$ Y $\Delta U$ . EN UN SISTEMA EN EQUILIBRIO.....	101
FIGURA 31: ENERGÍAS LIBRES DE TODAS LAS VENTANAS PARA LA MUTANTE E42A_1.....	103
FIGURA 32: ENERGÍAS LIBRES DE TODAS LAS VENTANAS PARA LA MUTANTE E42A_2.....	104

## IV. ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1: CONSTANTES CINÉTICAS DE PCHP CON DIFERENTES IONES METÁLICOS.....	23
TABLA 2: RESIDUOS MUTADOS DE LOS MOTIVOS HAD .....	28
TABLA 3: INHIBICIÓN DE PCHP CON COMPUESTOS DE AMONIO CUATERNARIO .....	31
TABLA 4: CONSTANTES ENZIMÁTICAS DE PCHP. ....	35
TABLA 5: TIEMPOS DE SIMULACIÓN Y USO DE RESTRICCIONES ENERGÉTICAS APLICADOS AL SISTEMA. ....	43
TABLA 6: ENERGÍAS DE INTERACCIÓN OBTENIDAS MEDIANTE DOCKING.....	49
TABLA 7: DISTRIBUCIÓN DE LOS RESIDUOS DE WT-PCHP A 5 Å DEL LIGANDO PCH EN CADA SITIO. ....	56
TABLA 8: SASA PROMEDIO A LO LARGO DE LA SIMULACIÓN DE DINÁMICA MOLECULAR.....	60
TABLA 9: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS ENLACES DE HIDRÓGENO.....	63
TABLA 10: RESUMEN DE LAS SIMULACIONES DE PERTURBACIÓN DE ENERGÍA LIBRE.....	69
TABLA 11: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS ENLACES DE HIDRÓGENO PARA E42A_2.....	77
TABLA 12: CUADRO RESUMEN DE LOS ANÁLISIS REALIZADO A WT-PCHP Y LA MUTANTE E42A_2..	84