

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	VIII
ABSTRACT	IX
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Antecedentes generales de fosfofructoquinasa-2 de <i>E. coli</i>	1
1.2 Requerimientos por cationes en la actividad de Pfk-2.	4
1.3 Cationes monovalentes de radio iónico grande y su contribución en la inhibición alostérica de Pfk-2.....	8
2. HIPÓTESIS	12
3. OBJETIVOS	13
3.1 Objetivo general.	13
3.2 Objetivos específicos.....	13
4. MATERIALES Y METODOLOGÍA	14
4.1 Descripción de las estructuras iniciales.....	14
4.2 Protocolo de Dinámica Molecular.....	14
4.3 Protocolo de la perturbación de energía libre (FEP).....	15
4.4 Protocolo para los cálculos de energía libre de unión de MgATP en el sitio alostérico de Pfk-2 mediante MM/PBSA	16
4.5 Protocolos para cálculo de PSN, correlación de movimientos atómicos y vías de comunicación.....	17
5. RESULTADOS	19
5.1 Selectividad del sitio para cationes monovalentes de Pfk-2.....	19
5.1.1 Determinación de los parámetros óptimos para los cálculos de FEP	19
5.1.2 Resultados FEP K ⁺ vs Na ⁺	20
5.2 Efectos estructurales de Pfk-2 causados por la unión de cationes monovalentes	21
5.2.1 Obtención de sistemas iniciales para las simulaciones de dinámica molecular	21
5.2.2 Estabilidad estructural de los sistemas simulados	22
5.2.3 Fluctuación de los residuos de Pfk-2 en las simulaciones moleculares	24
5.2.4 Interacción de π -stacking entre adenina del MgATPa y Tyr23.....	25
5.2.5 Puentes de hidrógeno ligados al MgATP alostérico.....	27

5.2.6	Efecto de cationes monovalentes en las correlaciones de movimientos atómicos en Pfk-2	29
5.2.7	Redes de estructuras de proteínas (PSN)	31
5.2.8	Vías de Comunicación en la Pfk-2	33
5.3	Efecto del K^+ sobre la afinidad de MgATP en el sitio alostérico de Pfk-2	34
6.	DISCUSIÓN	36
6.1	Selectividad del sitio para cationes monovalentes de Pfk-2	37
6.2	La estabilidad estructural de Pfk-2 mejora en presencia de K^+	38
6.3	La presencia de K^+ induce un aumento en la afinidad por MgATP en el sitio alostérico de Pfk-2	40
7.	CONCLUSIONES	44
8.	REFERENCIAS	45
9.	ANEXOS	49
9.1	Fundamentos teóricos	49
9.1.1	Métodos de dinámica molecular	49
9.1.2	Método perturbativo para el cálculo de energía libre (FEP)	52
9.1.3	MM/PBSA (Molecular Mechanics/Poisson Boltzmann Surface Area)	54
9.1.4	Redes de Estructuras de Proteínas (PSN)	55
9.1.4.1	Definición de <i>Hubs</i> , <i>Huérfanos</i> y <i>Clusters</i>	56
9.1.5	Movimientos correlacionados	57
9.1.6	Búsqueda de la vía de comunicación no-covalente más corta	57
9.2	Gráficos de RMSF para las simulaciones de la Pfk-2	58
9.3	Matrices de correlaciones obtenidas de las dinámicas moleculares	59
9.4	Presentaciones a congresos y publicaciones	60

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Reacción catalizada por la Pfk-2 y su regulación negativa mediada por MgATP.....	2
Figura 2. Localización de los ligandos en la estructura cristalográfica de Pfk-2.	3
Figura 3. Estructura cristalográfica de fosfofructoquinasa-2 de <i>E. coli</i> y su sitio de unión a cationes monovalentes.	7
Figura 4. Inhibición de la actividad catalítica de Pfk-2 por MgATP.	10
Figura 5. Efecto de cationes monovalentes en la unión de MgATP observado por fluorescencia intrínseca.....	10
Figura 6. Efecto de sales de cloruro de metales monovalentes en la velocidad inicial de Pfk-2	11
Figura 7. Ciclo termodinámico para realizar los cálculos de FEP.	19
Figura 8. Determinación parámetros óptimos del sistema proteína-catión.	20
Figura 9. Cálculos de FEP.	20
Figura 10. Modelo representativo de los sistemas ionizados y solvatados.	21
Figura 11. RMSD de la cadena principal con respecto al primer <i>frame</i> de producción.....	22
Figura 12. Gráficos de RMSF de los sistemas con y sin K ⁺	24
Figura 13. Pfk-2 coloreada según valor de RMSF.	25
Figura 14. Distancias de π -stacking entre anillo de adenina del MgATPa y Tyr23.....	27
Figura 15. Frecuencia de los puentes de hidrógeno entre MgATPa y los residuos cercanos....	28
Figura 16. Correlaciones de residuos del sitio para cationes monovalentes con el sitio alostérico de Pfk-2.	30
Figura 17. Efecto del K ⁺ en las redes PSN de la Pfk-2.	32
Figura 18. Vía de comunicación entre el sitio para cationes monovalentes con el sitio alostérico de Pfk-2.	33
Figura 19. Residuos importantes en la unión de MgATPa en la Pfk-2.	35

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Distancias de coordinación de los cationes K^+ y Cs^+	6
Tabla 2. Efecto de KCl en los parámetros cinéticos de Pfk-2.....	11
Tabla 3. Efecto del KCl en los parámetros de unión seguidos por fluorescencia intrínseca.....	11
Tabla 4. Valores de RMSD de las distintas simulaciones de la Pfk-2.....	23
Tabla 5. Distancia π -stacking entre MgATPa y Tyr23.....	26
Tabla 6. Correlaciones entre los residuos Lys27, Arg29 y Arg105 de la cadena A con el sitio para cationes monovalentes de la cadena B.....	30
Tabla 7. Correlaciones entre los residuos Lys27, Arg29 y Arg105 de la cadena B con el sitio para cationes monovalentes de la cadena A.....	31
Tabla 8. Parámetros obtenidos de las redes de PSN en presencia y ausencia de K^+	31
Tabla 9. Residuos que más aportan a la unión de MgATPa.....	35