REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

Universidad Católica de Santa María
Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas
Escuela Profesional de Ingeniería Biotecnológica

EVALUACIÓN DE LA INTERACCIÓN QUE GOBIERNA EL ACOPLAMIENTO DE PROFILINAS DE ORIGEN HUMANO CON RECEPTORES DE FILAMENTOS DE ACTINA HUMANA Y SU ENERGÉTICA, MEDIANTE ACOPLAMIENTO MOLECULAR

Tesis presentada por la:
Bachiller:
Laura Tintaya, Lilian Mirian

Para Optar el Título Profesional de
Ingeniera Biotecnóloga
Asesor:
Dr. Gómez Valdez, Badhin

Arequipa – Perú
2018

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

UNIVERSIDAD CATOLICA SANTA MARIA
Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas
Escuela Profesional de Ingeniería Biotecnológica

Expediente N°. **16001417**
N° Trámite en Fac. **268-2016**
Fecha Recep. Fac. **14-01-2016**

FORMATO UNICO PARA TRAMITACIÓN DE TÍTULO PROFESIONAL

DE: ***LAURA TINTAYA, Lilian Mirian***

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE **INGENIERO BIOTECNOLOGO**

"EVALUACION DE LAS PROPIEDADES TERMODINAMICAS EN EL PROCESO DE INTERACCION ENTRE LAS PROFILINAS VEGETALES Y FILAMENTOS DE ACTINA HUMANA MEDIANTE ACOPLAMIENTO MOLECULAR"

DICTAMINADORES: *1) Dr. Jaime Cárdenas García* *2) Dr. José Villanueva Salas*

DICTAMEN DE PLAN: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación, el Jurado Dictaminador del Plan de Tesis informa que, hechas las observaciones y subsanadas las correcciones, consideramos se encuentra APTO para continuar con el trámite de acuerdo al Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad

Atentamente

FIRMAS: (Devolver antes de 8 días hábiles) FECHA 15/3/16

ASESOR: ***Dr. Badhin Gómez Valdez***

DICTAMEN ASESORÍA:
Se ha culminado la investigación y el proceso de escritura del informe correspondiente, por lo que doy mi aprobación para la evaluación del escrito, por parte del jurado examinador

FIRMA FECHA 15-09-17

DICTAMINADORES BORRADOR DE TESIS:
1) ***Dr. José Villanueva Salas***
2) ***Dr. Jaime Cárdenas García***
3) ***Mgter. Jaime Barreda del Carpio***

DICTAMEN FINAL: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, atendiendo a su designación como Dictaminadores del presente Borrador de Tesis sugiriendo se cambie el título a: ***"EVALUACION DE LA INTERACCION QUE GOBIERNA EL ACOPLAMIENTO DE PROFILINAS DE ORIGEN HUMANO CON RECEPTORES DE FILAMENTOS DE ACTINA HUMAN, Y SU ENERGETICA, MEDIANTE ACOPLAMIENTO MOLECULAR"***, y luego de hechas las observaciones y correcciones pertinentes, cumpliendo con las exigencias mínimas establecidas para un trabajo de investigación de Tesis profesional, por lo que consideramos APTO para continuar con los trámites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad.

Atentamente

FIRMA (Devolver antes de 15 días hábiles) FECHA

JURADOS: PRESIDENTE
VOCAL
SECRETARIO

FECHA 09/04/18 HORA 18.00 LOCAL SUM C-402

FIRMA DEL DECANO FECHA 03/04/18

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

Dedicatoria

Quiero dedicar este trabajo a Dios, por haber iluminado mi mente y fortalecer mi corazón, por haber puesto en mi camino a las personas indicadas para que sean mi compañía y soporte durante todo el periodo de estudio.

También a mi madre Bertha Tintaya Paredes, por haberme dado la vida, por su apoyo incondicional en todo momento, por sus sabios consejos, por transmitirme sus valores y por la motivación constante que me ha permitido culminar mis estudios.

A mi abuelo Julio (QEPD) por sus enseñanzas y el amor a la ciencia, su amor seguirá perdurando a través del tiempo en mi corazón.

A mi hermano mayor Victor Hugo (QEPD) por transmitirme su valentía frente a las circunstancias adversas de la vida te llevaré en mi corazón siempre querido hermano.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

Agradecimientos

Quiero agradecer a la Universidad Católica de Santa María, institución donde desa- rrollé mis estudios.

Al Dr. José Villanueva, Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquí- micas y Biotecnológicas, de la cual siempre he recibido el apoyo y los conocimientos durante el tiempo de estudios.

Al Dr. Badhin Gómez Valdez, Director del Centro de Investigación en Ingeniería Molecular. Por asesorarme, por su apoyo y motivación que me permitieron alcanzar los objetivos de mi tesis.

Al Programa Fondecyt (Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico) que financió la presente tesis mediante el proyecto 138-2015-FONDECYT.

Y especialmente a mi madre la Lic. Bertha Tintaya de la cual siempre he recibido su apoyo y motivación incondicional.

Finalmente, a todas las personas, que me brindaron tiempo e información para lograr los objetivos de mi tesis.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

Introducción

La profilina humana tipo I es una de las cuatro profilinas humanas conocidas, que actúa como un regulador complejo del ensamble de los monómeros de actina (G-Actina) en los filamentos (F-actina).[1] Las múltiples propiedades que presenta esta profilina juegan un rol fundamental en el ensamblaje de la F-actina; dentro de estas propiedades destacan la capacidad catalizadora de la interconversión de energía de ATP a ADP (conocido como desfosforilación), incrementando la canti- dad de profilina I unida a G-actina-ATP.[1,2] La profilina I se expresa en la mayor parte de tejidos del cuerpo.[3] Estructuralmente la profilina I es una proteína de 139 aminoácidos, contando actualmente con dos estructuras tridimensionales, una mediante RMN (PDB: 1PFL) y otra por medio de Rayos X (PDB: 1FIK). En ambas estructuras se puede observar que la profilina I está compuesta de 7 láminas beta antiparalelas unidas entre tres alfas hélices, dos en un lado de la lámina y otra en el otro lado.[4] Diversos estudios han identificado el rol que juega la profilina en la generación de enfermedades como la esclerosis lateral amiotrófica, cáncer, glomerulonefritis proliferativa mesangial, enfermedad de Alzheimer, síndrome X frágil, síndrome Miller-Dieker, síndrome Wiskott-Aldrich, beta talasemia, enfermedad de Parkinson, entre otras. [5–9]

La actina es una proteína que juega un papel importante en la formación estruc-
tural del citoesqueleto, dentro de la célula conforma fibras delgadas y flexibles, los filamentos de actina — microfilamentos, están organizados en estructuras de orden superior formando haces y redes tridimensionales adquiriendo propiedades similares a la de los geles semisólidos, estos filamentos de actina se encuentran debajo de la membrana plasmática formando una red que proporciona un soporte mecánico, determinando la forma de la célula y permite el movimiento de la superficie celular permitiendo la migración de células.[10] La forma en como las profilinas se ven invo- lucradas con la polimerización de la actina, se debe a que se unen simultáneamente a los monómeros de la formina y la actina; esta interacción de múltiples complejos profilina - actina cerca de la creciente final de los filamentos, promueve la adición

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

de subunidades de actina.

La bioinformática es un método que organiza los datos de una manera que per- mite acceder a la información existente y enviar nuevas entradas a medida que se producen. Nos proporciona herramientas para analizar los datos e interpretar los resultados de una manera biológicamente significativa, permitiéndonos estudiar, evaluar e interpretar propiedades termodinámicas para procesos de interacción entre moléculas, estos estudios han conducido a la aplicación de la simulación molecular en donde los datos estructurales se utilizan para calcular la energía necesaria para estabilizar las estructuras macromoleculares, simular los movimientos dentro de las macromoléculas, y calcular las energías involucradas en el acoplamiento molecular, para tal fin utilizaremos algunos de los métodos como son; la Mecánica Molecular, la Dinámica Molecular, y Docking Molecular.[11–15]

En el presente trabajo evaluaremos el proceso de interacción de las profilinas humanas junto a los filamentos de actina humana utilizando la técnica de acoplamiento molecular. Esta técnica es importante ya que nos permite observar las interacciones entre dos sistemas complejos de proteínas.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

Resumen

La Profilina es una proteína multifuncional y ubicua la cual tiene un peso de 12-17 kDa. Su importancia se debe a que es vital para funciones como; la motilidad celular, la división neuronal, la regulación de la membrana citoplasmática y dinámica del citoesqueleto. La actina es importante debido a su papel en la contracción mus- cular y formación de la estructura del citoesqueleto, dentro de la célula conforma fibras delgadas y flexibles; los filamentos de actina, microfilamentos, se encuentran formando haces y redes tridimensionales adquiriendo propiedades similares a la de los geles semisólidos, determinando la forma de la célula y permite el movimiento de la superficie celular permitiendo la migración de células. Para el proyecto se realizó una búsqueda en la base de datos del NCBI (Centro Nacional para la Formacion Biotecnológica); obteniéndose los dos tipos de las estructuras de las profilinas humanas y de los filamentos de actina humana. Con las herramientas que nos proporciona la bioinformática se determinaron las propiedades termodinámicas de las proteínas en estudio. Dichas herramientas mejoraron la predicción de cada proteína mediante el modelado por homología, teniendo en cuenta que para la optimización de la geometría se hizo uso de la minimización de energías y dinámica molecular con solvente implícito, finalmente se logró modelar cuatro filamentos de actina los cuales fueron acoplados con las profilinas de tipo I y II.

Así mismo, se determinó que la profilina de tipo I tiene una alta afinidad por los monómeros del filamento de actina, presentando mayor interacción energética con la molécula que se encuentra en forma de dímero; mientras que la profilina de tipo II mostró afinidad con dos monómeros de filamentos de actina en todos los casos presentando así una mayor interacción con el hexámero de actina.

Palabras claves: Acoplamiento molecular, energía de interacción, profilina humana.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

Abstract

The Profilin is a multifunctional and ubiquitous protein which weighs 12-17 kDa. Its importance is due to the fact that it is vital for functions such as cell motility, neuronal division, cytoplasmic membrane regulation and cytoskeleton dynamics. Actin is important because of its role in the muscular contraction and formation of the cytoskeleton structure, within the cell it forms thin and flexible fibers; the actin filaments, microfilaments, are found forming three-dimensional beams and networks acquiring properties similar to those of semi-solid gels, determining the shape of the cell and allowing the movement of the cell surface allowing the migration of cells. For the project, a search of the NCBI (National Centre for Biotechnology information) database was carried out; both types of human profilin and human actin filament structures were obtained. With the tools provided by bioinformatics, the thermodynamic properties of the proteins under study were determined. These tools improved the prediction of each protein by means of homology modeling, taking into account that for the optimization of the geometry, the use of energy minimization and molecular dynamics with implicit solvent was used. Finally, four actin filaments were modeled and coupler with the type I and II profilins.

It was also determined that type I profilin has a high affinity for the actin filament monomers, presenting a greater energy interaction with the molecule in the form of a dimer; while type II profilin showed an affinity with two actin filament monomers in all cases, thus presenting a greater interaction with the actin hexamer.

Keywords: Molecular coupler, interaction energy, human profilin.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

Índice

Dedicatoria

Agradecimientos

Introducción

Resumen Abstract

Índice **I**

Índice de figuras **IV**

Índice de tablas **VII**

Glosario **VIII**

Objetivos **XI**

1. Marco Teórico **1**

1.1. Profilinas Humanas 1

1.1.1. Generalidades 1

1.1.2. Expresión de la profilina y familia de genes 3

1.1.3. Características estructurales y moleculares 5

1.1.4. Función y Estructura 6

1.2. Actina 7

1.2.1. Descubrimiento 7

1.2.2. Definición 7

1.2.3. Estructura 8

1.2.4. Dinámica de Acoplamiento 11

1.2.5. Función y localización 13

1.2.6. Interacción con las Profilinas 14

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

1.3. Bioinformática 15
1.3.1. Mecánica Molecular 16
Campo de Fuerza 17
1.3.2. Dinámica molecular 25
Función de Potencial 27
El algoritmo de Verlet y sus variantes 28
1.3.3. Acoplamiento molecular 28
Función estándar de energía potencial 31
1.3.4. Mecánica Estadística 32
Estados de la Mecánica Estadística. 32

2. Metodología **34**
2.1. Detalles Computacionales 34
2.1.1. Hardware 34
2.1.2. Softwares 34
Gromacs 5.1.3 34
UCFS Chimera 1.6 35
2.1.3. Servidores 35
Bases de datos NCBI 35
Base de datos PDB 35
Robetta 36
PATCHDOCK 36
FIREDOCK 37
2.2. Metodología 37
2.2.1. Análisis de la estructura primaria de la proteínas 37
2.2.2. Obtención de las estructuras terciarias 38
2.2.3. Minimización y optimización geométrica de estructuras pro- téicas. 39
2.2.4. Dinámica Molecular de estructuras terciarias mediante ensamble canónico, NVT 40
2.2.5. Optimización molecular de cuatro modelos de filamento de actina 40
2.2.6. Acoplamiento molecular (filamento de actina – profilina I y II)41
2.2.7. Validación de Estructuras 41

3. Resultados y Discusión **43**
3.1. Obtención de las secuencias 43
3.2. Obtención de estructuras terciarias 44

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

Conclusiones **64**

Recomendaciones **65**

Referencias Bibliográficas **66**

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

Índice de figuras

1.1. Explicación de la ruta de polimeración y despolimerización de la actina en presencia de ATP y ADP 2
1.2. Interacción de la poli-L-prolina con actina. 3
1.3. Polimerización de laactina celular. 4
1.4. Estructura terciaria de la profilina (P07737.2). 6
1.5. Formación de los filamentos de actina. 10
1.6. Ensamble de los filamentos de actina para su transformacion a microtúbulos. 12
1.7. Polimerización de la actina. 15
1.8. Ilustración de los términos fundamentales de la energía del campo de fuerza. 16
1.9. Definición de Potencial de enlace. 19
1.10. Diferentes Potenciales definidos para el enlace en los campos de fuerza.19
1.11. Definición del Potencial de enlace. 19
1.12. Gráfica de la energía de flexión. 20
1.13. Definición del Potencial de Torsión. 21
1.14. Función de laenergía torsional. 22
1.15. Interacciones débiles tipo Lennard–Jones. 23
1.16. Imagen de las energías de Van der Waals. 24
1.17. Interacción Electrostática. 24
1.18. Imagen de las energías electrostáticas. 25
1.19. Un típico flujo de trabajo de acoplamiento. 29
1.20. Representaciones de la cuadrícula. 30
1.21. Potencial electrostático de un inhibidor unido. 31

2.1. Obtención de secuencias de aminoácidos de la Profilina I a partir de la base de datos del NCBI 37

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

2.2. Obtención de secuencias de aminoácidos de la Profilina II a partir de la base de datos del NCBI..... 38
2.3. Obtención de secuencias de aminoácidos de la Actina Humana a partir de la base de datos del NCBI 38
3.1. Estructuras Secundarias de la Profilina I, Profilina II y Actina a partir de experimentos de Rayos-X..... 45
3.2. Estructuras Secundarias de la Profilina I, Profilina II y Actina, a partir del servidor Robetta..... 46
3.3. Estructuras Secundarias de la Profilina I, Profilina II y Actina, que usamos para nuestro presente estudio. 47
3.4. Estructura Final, Raíz de la Desviación Media Cuadrática (RMSD) y la Raíz de la Fluctuación Media Cuadrática por residuos (RMSF) para la Profilina I..... ...48
3.5. Evolución de la estructura secundaria durante el tiempo de simulación de dinámica molecular para la Profilina I. 49
3.6. Diagrama de Ramachandran, para la Profilina I, tanto general como desglosado.....50
3.7. Estructura Final, Raíz de la Desviación Media Cuadrática (RMSD) y la Raíz de la Fluctuación Media Cuadrática por residuos (RMSF) para la Profilina II. 51
3.8. Evolución de la estructura secundaria durante el tiempo de simulación de dinámica molecular para la Profilina II. 52
3.9. Diagrama de Ramachandran, para la Profilina II, tanto general como desglosado.....53
3.10. Estructura Final, Raíz de la Desviación Media Cuadrática (RMSD) y la Raíz de la Fluctuación Media Cuadrática por residuos (RMSF) para la Actina Humana..... 54
3.11. Raíz de la Desviación Media Cuadrática (RMSD) y la Raíz de la Fluctuación Media Cuadrática por residuos (RMSF) para el Tetrámero, hexámero y octámero de la Actina Humana. 55
3.12. Evolución de la estructura secundaria durante el tiempo de simulación de dinámica molecular para la Actina Humana. 56
3.13. Diagrama de Ramachandran, para la Actina Humana, tanto general como desglosado 57
3.14. Superficie Hidrofóbica de la Profilina I, Profilina II y Actina..... 58

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

3.15. Superficie del Potencial Electrostático de la Profilina I, Profilina II y Actina 59
3.16. Diagramas del Z-score para las profilinas I y II y Actina 60
3.17. Actina y sus polímeros interactuando con la Profilina I 61
3.18. Actina y sus polímeros interactuando con la Profilina II 62

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

Índice de tablas

3.1. Secuencia de Aminoácidos de la Profilina Humana I y II 43
3.2. Secuencia de Aminoácidos de la Actina 44
3.3. Energías Libre de Gibbs para la interacción de sistemas interactuantes en Kcal/mol 63

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

Glosario

1. φ, Φ, ψ = Función de Onda

2.ACI = Aneurismas de la arteria carótida interna.

3.ACTB = Actina beta del músculo cardíaco.

4.ACTC = Actina alfa del músculo cardíaco.

5.ACTG = Actina gama del músculo cardíaco

6.ACTA = Proteína que induce ensamblaje de actina.

7.ADP = Adenosín Di fosfato.

8.ADNc = ADN complementario.

9.AM1 = Modelo de Austin 1.

10.AMP = Adenosina Mono fosfato.

11.AMBER = Construcción de Modelos Asistidos con Refinamiento de Energía

12.ATP = Adenosín Tri fosfato.

13.Arp2/3 = Proteínas relacionadas con la actina.

14.CHARM = Química en la Mecánica Macromolecular de Harvard

15.Cys 374 = siglas en inglés del aminoácido cisteína.

16.CTE = elemento de transporte constitutivo.

17.DFT = Teoría de Funcionales de la Densidad.

18.ELF = Función de Localización Electrónica.

19.EFF = Campo de fuerza emírico.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

20. GROMACS = GROningen MAchine para Simulaciones Químicas.

21. GPU = Unidad de procesamiento gráfico.

22. GNU = Sistema operativo de software libre.

23. Hsp70 = proteínas de shock térmico de 70 KDa.

24. Hsc-70 = tipo de proteína de choque térmico perteneciente a eucariotas.

25. LDA = Siglas en ingles de Aproximación de Densidad Local.

26. LOMETS = Local Meta-Threading-Server. Es un servidor on line para la predicción de estructuras de proteína generando modelos 3D .

27. MDA-231 = células de cáncer de mama.

28. Modulador alostérico = Un modulador alostérico es una sustancia que es capaz de modificar la actividad de la enzima. Se unen al centro alostérico del enzima de forma no covalente, y cambian la estructura de la enzima, con el consiguiente cambio en su comportamiento. No todos los moduladores son activadores, puesto que también los hay inhibidores.

29. MM = Modelado molecular.

30. MMFF = Campo de Fuerza Molecular de Merck

31. PI2P = Fosfoinositol bi fosfato.

32. Pi = Inositol pirofosfato

33. PLP = Poli-L-prolina.

34. PFN = Profilina

35. OPLS-AA = Potenciales Optimizados para Simulaciones de Líquidos-Aminoácidos.

36. OPLS-AA/L = Potenciales Optimizados para Simulaciones de Líquidos-Aminoácidos para lípidos.

37. ROCKII= Proteína quinasa asociada a Rho.

38. RRE = elemento de respuesta favorable rev. rev regula la expresión viral se une a una región afin.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

39.RMSD = Distancia media cuadrática mínima.

40.SMN = Supervivencia de Motoneuronas.

41.TZVP = Base tipo Pople con triple zeta en los electrones de valencia.

42.Ena/VASP = fosfoproteína estimulada por vasodilatador.

43.VCP = Proteína que contiene vasolina.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

Objetivos

Objetivos Generales

- Evaluación de la interacción que gobierna el acoplamiento de profilinas de origen humano con receptores de filamentos de actina humana, y su energética.

Objetivos Específicos

- Compilar la información de las profilinas de origen animal reportadas en la literatura, generando una base de datos estructurales en formato ***pdb***, así como para los filamentos de actina humana
- Generar modelos de filamentos de actina, en condición de dímero, tetrámero, hexámero y octámero
- Minimizar las estructuras de las profilinas y filamentos de actina humana, considerando el efecto solvente implícito.
- Realizar el acoplamiento, ***Docking***, entre las profilinas seleccionadas con los filamentos de actina humana.
- Evaluar la energética involucrada en el proceso de acoplamiento entre las pro- filinas humanas seleccionadas y los filamentos de actina humana.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

Capítulo 1

Marco Teórico

1.1. Profilinas Humanas

1.1.1. Generalidades

La profilina fue identificada por primera vez hace más de 30 años como una proteína de unión a la actina en el timo de ternera. Es una proteína de bajo peso molecular, de aproximadamente 15 kDa, pertenece a una familia de proteínas que se encuentran bien desarrollada en los mamíferos y se expresa en forma ubícua, debido a su propiedad y función determinada, la que es mantener a la actina estable.[16]

La profilina es una proteína multifuncional con muchas parejas de unión la cual es vital para diferentes funciones como:

- La motilidad celular.
- La citocinesis.
- La diferenciación neuronal.
- La plasticidad sináptica.
- La regulación de la membrana, el transporte y tráfico nuclear.

También es considerada como un regulador de diversos procesos celulares tales como la dinámica del citoesqueleto.[1]

La profilina forma complejos 1:1 con monómeros de actina catalizando el intercambio de nucleótidos ligados a actina, así mismo inhibiendo la formación de filamentos de actina, pero estudios recientes indican que sucede todo lo contrario como se observa en la Figura1.1. [17,18]

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

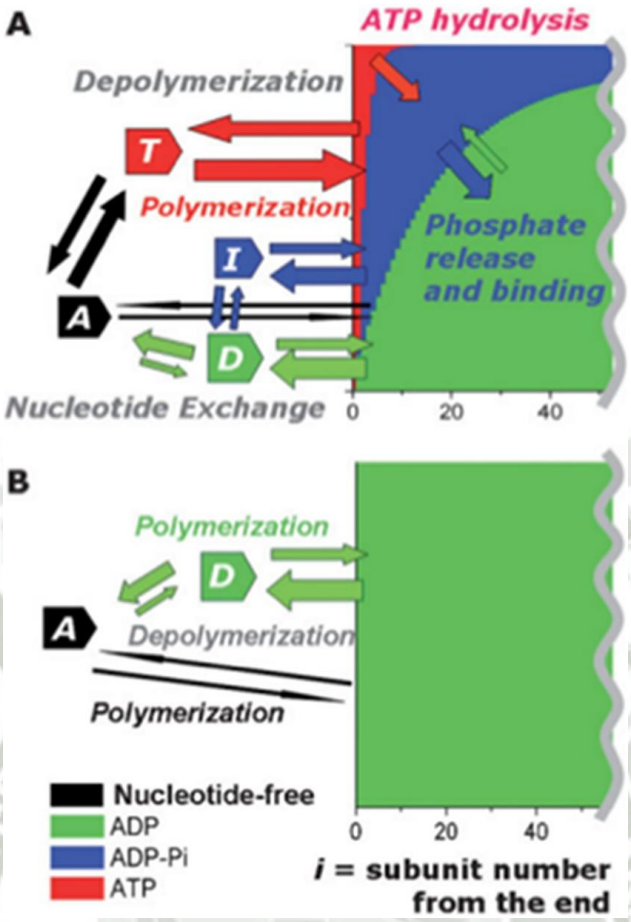


Figura 1.1: Explicación de la ruta de polimeración y despolimerización de la actina en presencia de ATP y ADP.
Fuente: Elena G. Yarmola, Michael R. Bubb. How depolymerization can promote polymerization: the case of actin and profilin. 2009

En la Figura1.1se observa que los filamentos de actina son representados por filamentos promedios en el perfil nucleotídico, donde los ATP ligados a actina son de color rojo, los ADP-Pi son de color azul, la ADP ligada a actina es de color verde y los nucleótidos libres de actina no tienen color. "i" es la distancia del final del filamento en número de subunidades, el peso relativo refleja el porcentaje de la subunidad ante "i". Las subunidades monoméricas son descritas por pentágonos y corresponden al color de la ruta.[19] Las flechas indican la asociación y disociación de las subunidades de actina. En el proceso se observa el intercambio que existe entre los nucleótidos ligados por las subunidades de G-Actina en la hidrólisis de ATP, o Pi ligado los cuales son lanzados por las subunidades de F-Actina. Estos fenómenos se dan en la polimerización y despolimerización de actina al momento de interactuar con la profilina.[20–23]

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

1.1.2. Expresión de la profilina y familia de genes

Las profilinas fueron encontradas y descritas en la superficie expuesta en sitios de unión a actina incluyendo las proteínas relativas a la actina (ARPs), poli-L-prolina estiradas y a los lípidos de fosfatidil inositol. Estos sitios de unión están bien carac- terizados, los motivos de interacción con los diferentes ligandos pueden identificarse con muchas profilinas incluyendo proteínas de plantas.[24] Esquema de los sitios de unión a Actina (rojo), PLP (azul) y la 4,5-PI2P (verde). En la superficie de una mo- lécula de profilina. Nótese que PIP2 se une al área formada a un parche extensivo que se superpone con las áreas de unión para Actina y PLP (Ver Figura1.2).

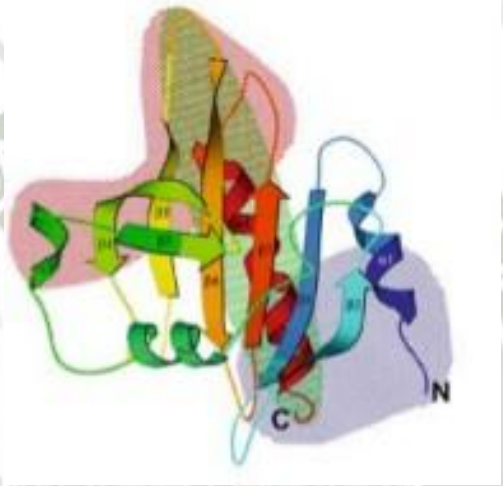


Figura 1.2: Interacción de la poli-L-prolina con actina.
Fuente: B.M. Jockusch, K. Murk. The profile of profilins. 2007

En los mamíferos se han encontrado hasta la fecha cuatro genes de profilina, en cambio en humanos se encontraron secuencias de ADNc de profilina I y profilina II específica del cerebro y recientemente descubierto en el testículo a las profilina III y en el riñon a la profilina IV.[25,26] En general, las secuencias de profilina de diferentes especies no están bien conservadas.[27] Por ejemplo, los genes de profilina I y profilina II en humanos son 65 % idénticos en el nivel de aminoácidos, sin embargo, sólo el 35 % son idénticos a profilinas de eucariotas inferiores y aproximadamente 20 % idénticos a profilinas vegetales. A pesar de las secuencias se produce una mejor conservación de las profilinas.[28]

Bioquímicamente, al unirse a un monómero de actina, la profilina aumenta la tasa de intercambio de nucleótidos en el monómero de actina, recargando así el monómero con ATP, y posiblemente potenciando la dinámica de filamento de actina. *In vivo* se piensa que la profilina es esencial para promover la polimerización de actina tras

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

la estimulación celular facilitando la adición de monómeros de actina al extremo de crecimiento rápido de filamentos de actina como se observa en la Figura1.3. La profilina también puede desempeñar un papel importante en la traducción de señales, debido a que se une a PI2P con alta afinidad y es capaz de inhibir su escisión por la fosfolipasa-Cγ bajo ciertas condiciones.[29]

En estudios recientes se ha demostrado que la profilina del tipo I y II del cerebro de ratón interactúan con un gran número de ligandos, incluyendo la dinamina I, si- napsina, ROCKII, VCP y otros que implican en la función de profilina en el tráfico de membranas y transducción de señales.[30–32] Curiosamente, los ligandos son espe- cíficos para la profilina I y II de ratón. En dicho estudio se informó que en ratones la diversidad de isoformas de la profilina se extiende por empalme alternativo de la profilina II que produce dos isoformas de profilinas , el principal la profilina IIa que se expresa en el cerebro y el menos abundante, la isoforma profilina IIb que difiere en el C-terminal de 32 aminoácidos.[33]

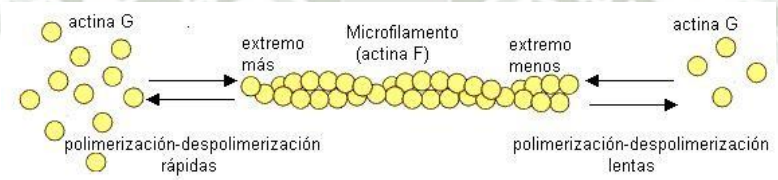


Figura 1.3: Polimerización de la actina celular.
Fuente: https://sites.google.com/site/nuestraseucariotas/organulos-no-membranosos/ citoesqueleto-celular?tmpl= %2Fsystem %2Fapp %2Ftemplates %2Fprint %2F& showPrintDia- log=1

La profilina I es un miembro de la familia de las profilinas, el cual es un factor que cataliza el intercambio de nucleótidos de difosfato de adenosina (ADP) a trifosfato de adenosina (ATP) en actina globular (G). El monómero de actina de ATP-actina no polimerizada se une a la profilina I y es fácilmente disponible para el montaje nuevo de filamentos de actina. Por lo tanto la profilina I juega un papel esencial en la regulación de la síntesis de NOVO de la polimerización de actina, esto se debe a la estimulación celular de la actina para la formación de monómeros de esta proteína (ver Figura1.3). También mejora la velocidad de polimerización de la actina mediante la entrega de ATP-actina a los extremos crecientes de los filamentos.

La profilina I, una proteína de unión a la actina de expresión ubicua la cual es regulado en varios tipos de carcinomas (mama, páncreas, hepática y gástrica) y provoca un efecto de tumores supresores sobre las líneas celulares de cáncer de mama. Sin embargo se encontró que la sobreexpresión de la profilina I puede inducir a las células MDA-231 (línea celular del cáncer de mama) para someterse a formación

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

morfológica en un fenotipo epiteloide, también la profilina I aumenta el nivel de expresión de R-cadherina (un tipo de cadherina que se expresa de forma endógena en la línea celular parental) y restaura uniones de adherencia en células MDA-231 de forma R-cadherina dependiente. La restauración de uniones de adherencia que requieren la interacción entre la profilina I y la actina induce a las células MDA- 231 a sufrir una transformación morfológica en un fenotipo epiteloide.[34] La profilina I se expresa de forma ubicua en todos los tipos celulares, excepto en el músculo esquelético.

La profilina II se expresa dos isoformas profilina IIa y profilina IIb. La profilina IIa es una isoforma que se expresa predominante en células neuronales. Mientras que en la isoforma profilina IIb, el ARNm es detectable en número infinito de tejidos adultos, principalmente en el riñón. profilina del tipo III y profilina del tipo IV se limitan a los testículos.[1]

En general profilina I y profilina II son los más comunes en mamíferos, presentan propiedades de unión de monómero de actina. La profilina acelera la extensión de los filamentos de actina en presencia de formina y luego despolimeriza los filamentos de actina encapsulada, lo que conduce a cambios en el citoesqueleto. Además la inte- rrupción de la profilina por deleción del gen profilina I en ratones o por transferencia anti-profilina en oocitos de bovinos resulta la muerte embrionaria temprana.[35]

1.1.3. Características estructurales y moleculares

Se ha descrito que la profilina se encuentra presente en células animales, vegetales, levaduras, protozoos e incluso en virus. Se menciona que es una proteína globular donde su estructura y su composición de aminoácidos se encuentra altamente con- servado. Por ello es que está involucrada en el equilibrio dinámico de ensamblaje del citoesqueleto de actina. Estas proteínas son tan pequeñas y miden entre 11 a 19 kDa. Estas proteínas controlan espacialmente y temporalmente el crecimiento de microfilamentos, por eso estas estructuras son las que intervienen en la determina- ción de la forma que tendrá la célula, en el proceso de organogénesis, movimiento celular y otros.

Posee también la capacidad de unión a péptidos con repeticiones del aminoácido prolina; así como la interacción con la actina; las profilinas pueden interaccionar con más de 50 proteínas distintas. La estructura primaria de estas proteínas muestran muchas modificaciones, en general su estructura terciaria está altamente conservada, incluso entre diferentes reinos. [36]

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

1.1.4. Función y Estructura

La función principal de la profilina es la de regular la dinámica de la actina en todos los eucariontes. La profilina se une a la actina monomérica en un complejo uno a uno (1:1); causando el equilibrio entre los filamentos de actina y sus subunidades.[34] En células animales este proceso está bajo la regulación de numerosas proteínas grandes y multidominio de las familas Ena/VASP (estimulan la elongación de filamentos de actina) y las forminas (grupo de proteínas de unión que están invo- lucradas en la inducción de la polimerización de los filamentos de actina), las que pueden unirse tanto a la actina como a la profilina. También forman parte de un complejo profilina-actina, el cual es miembro de diversas vías de señalización.[37] Dicha función de las profilinas se da por la interacción que tiene con diferentes ligandos, con distinta función según el ligando y la isoforma de profilina que intervengan.[38,39]

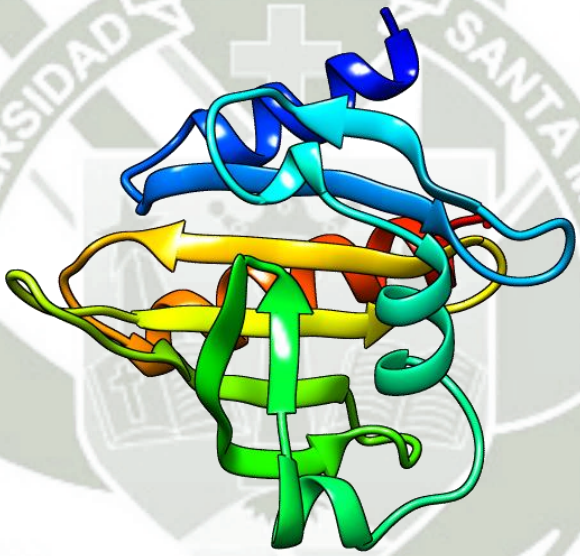


Figura 1.4: Estructura terciaria de la profilina (P07737.2).
Fuente: Fuente Propia

De estos sitios de interacción que se han caracterizado, se sabe específicamente las formas estructurales involucradas, los cuales destaca las secuencias de aminoácidos que constituyen estas formas estructurales ya que serían conservadas en diferentes organismos, en la Figura1.4podemos ver la representación de la estructura terciaria de la profilina.

En el caso de ratones sucede algo muy particular, el ARNm que codifica para esta proteína sufre una forma de *splicing* que dió como resultado una profilina que no puede unirse a la G-actina.[29] Otro caso reportado es la profilina del virus Vacci- nia la cual no se unió a polímeros de poli-L-prolina (pLp).[40] Por lo tanto se puede inferir que las profilinas son importantes en diferentes procesos celulares y final-

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

mente podemos explicar el porqué de una conservación elevada de estas proteínas e igualmente explicar la presencia de varias isoformas en diversas especies.

1.2. Actina

1.2.1. Descubrimiento

La actina fue descubierta en 1941 en extractos de músculos esqueléticos de conejo por Bruno Straub, Ilona Banga, y Albert Azent-Gyorgyi. Se utilizó la microscopía electrónica para visualizar el músculo estriado, esto se dió a partir de los años 50 por Hugh Huxley y Jean Hason, para ello se utilizó la microscopía de luz de interferencia contemporánea por Andrew Huxley y Rolf Niedergerke, así como la última interpretación en términos energéticos de la contracción del músculo.

La dinámica del filamento y la inclinación transversal del puente deslizante y el modelo de la contracción muscular es sin duda una de las mejores ejemplificaciones de un análisis funcional basado en la estructura de toda la biología y la biología molecular. No fue hasta 1970 que se descubrió que los niveles significativos de proteínas de actina y miosina del músculo que están presentes en células no musculares.[41]

En los años posteriores después de su descubrimiento, se observó que la actina y la miosina no muscular son predominantemente citoplásmicas, pero pronto una serie de estudios informó de la presencia de actina y miosina en los núcleos aislados. En 1977, se descubrió que la actina se encuentra en un equilibrio dinámico entre el citoplasma y el núcleo de los ovocitos de Xenopus, entonces este hallazgo hizo que se difunda conceptualmente la actina en el núcleo, en el sentido de que su masa y su tamaño y la forma general están por debajo del umbral de exclusión del poro nuclear. [42]

En el primer estudio de una proteína nuclear de 34 kDa de Acanthamoeba, aislado como un homodímero, se evidenció que se une a los filamentos de actina *In vitro* con un kd de 0,25 IM. La unión fue independientemente de ATP y no dio lugar a la agrupación, cortando o limitando de los filamentos de actina.[42]

1.2.2. Definición

La actina es una proteína multifuncional que está presente en todas las células eucariotas, forma parte importante del citoesqueleto y está implicada en la motilidad celular y el mantenimiento de la forma de las células eucariotas.[43] Además participa

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

en el transporte intracelular, la citosinesis y la transducción de señales. Esta proteína es también un componente constitutivo del núcleo, donde está implicado en una serie de procesos nucleares fundamentales.[42]

También es el componente principal de los finos filamentos de las células musculares y del sistema del citoesqueleto de las células no musculares, tomando parte en una multitud de funciones biológicas la actina monomérica (G-actina) se en- sambla bajo concentraciones salinas fisiológicas para formar polímeros (F-actina) como se puede ver en la Figura1.3, una propiedad que ha impedido hasta ahora la cristalización del monómero no acomplejado. Las estructuras se determinaron para los complejos de actina con desoxirribonucleasa I (ADNasa I), gelsolina, profilina, y todas las proteínas que impidan la polimerización. [44,45]

La actina y la mayoría de los miembros de su clase estructural en la que se incluye las chaperonas moleculares como las Hsp70, la hexoquinasa, las quinasas de azúcar, parecen sufrir un cambio conformacional acoplado a la hidrólisis de ATP; entonces en la actina este cambio conformacional puede jugar un papel crítico en la dinámica de filamentos.

Los filamentos ADP-actina exhiben una mayor suscepetibilidad a las proteínas despolimerizadas. La adición de fosfato inorgánico (Pi) y análogos ayuda a esta- bilizar los filamentos de ADP-actina, se piensa que mediante la imitación de un ADP+Pi. Las diferentes propiedades de ADP+Pi y filamentos de ADP-actina se han correlacionado con diferencias en sus estructuras terciarias. [42]

Con los años, la actina y miosina se han encontrado en conjunción con varios componentes del núcleo, pero se ha dado informes sobre la actina y miosina nuclear que fueron vistos con gran escepticismo y esto, debido a niveles representativos de las proteínas de actina y miosina, ya que se hallan presentes en células no musculares. Pese a la existencia de la actina en el núcleo, como una característica general de la vida eucariota, ya no estaria en duda la evidencia de su participación directa en la transcripción. Recientemente, se encontró β−actina para ser un elemento de los complejos de remodelación de la cromatina de mamíferos, en levaduras, moscas y en el hombre.[46–50]

1.2.3. Estructura

La principal proteína del citoesqueleto de la mayoría de las células es la actina, que se polimeriza para formar filamentos de actina, las cuales son fibras delgadas y flexibles de aproximadamente 7nm de diámetro y hasta varios micrómetros de

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

longitud. Los filamentos que se encuentran dentro de la célula también llamados microfilamentos, están organizados en estructuras de orden superior formando haces o redes tridimensionales con las propiedades de los geles semisólidos. El montaje y desmontaje de filamentos de actina, su reticulación en haces y redes, y su asocia- ción con otras estructuras celulares como la membrana plasmática, están regulados por una variedad de proteínas de unión a actina, que son componentes críticos del citoesqueleto de esta proteína.[51,52]

Dichos filamentos de actina son abundantes debajo de la membrana plasmática, donde forman una red que proporciona soporte mecánico, determina la forma de la célula y permite el movimiento de la superficie celular, permitiendo que las células migren, ingieran partículas y se dividan.[50]

La actina estructuralmente se encuentra en dos isoformas principales: G-actina (denominado asi para actinas globulares) que es de forma monomérica como se ve en la Figura1.3, mientras que F-actina (F para filamentos) es el polímero helicoidal (Figura1.4). La determinación de la primera estructura cristalina de G-actina fue un avance importante y la determinación simulatánea de una estructura cristalina del dominio ATPasa de la proteína de choque térmico HSC-70 condujo a la deducción de que ambas proteínas comparten el mismo pliegue con la enzima hexoquinasa.[53,54]

De las estructuras cristalinas de actina que se publicaron sólo una muestra una apertura significativa de la hendidura de unión de nucleótidos. Hubo cierta controversia sobre si una abertura de la hendidura podría estar asociado con el cambio en el nucleótido unido del ATP a ADP y si acaso hubiera otros cambios conformacionales dentro de la subunidad asociada con el cambio en el nucleótido unido. Una de las razones por la que se le da el interés respectivo es porque los filamentos de actina están regulados por la hidrólisis de ATP, observándose que dentro de la F-actina hay una abertura aparente en la hendidura asociada con la hidrólisis de ATP y la liberación de fosfato.[55]

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

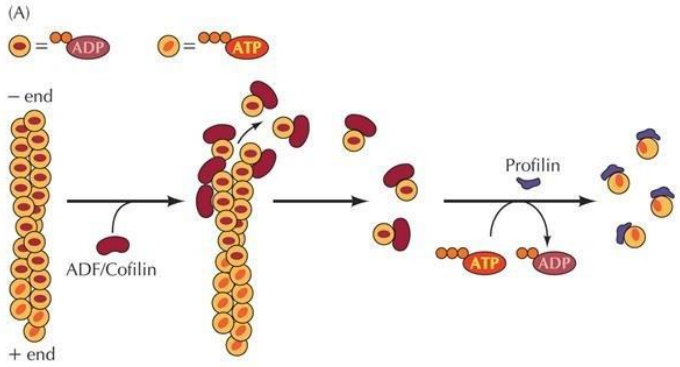


Figura 1.5: Formación de los filamentos de actina.
Fuente: http://slideplayer.es/slide/1704285

Las interacciones de las proteínas de unión a actina, tales como profilina y cofilina están reguladas por el nucleótido unido a la actina, y porque no se espera que estas proteínas contacten directamente con el nucleótido unido como se puede ver en la Figura1.5, solamente podemos observar la interacción de la profilina con los monómeros de actina. Se observa de que el factor de actina despolimerizada ADF se une a la actina G o F que contiene ATP unido a ADP y Pi, esto puede ser explicado por un cambio conformacional dentro de actina entre estos dos estados de nucleótidos. En consecuencia con esta expectativa, un estudio informó que el bucle de DnasaI está unido en el subdominio 2 de la actina, que es una beta diana en un cristal, desordenada en varios otros cristales, la cual se convierte en una hélice cuando el ADP está ligado a la actina en lugar de ATP.[56,57]

La importancia de la actina fue debido a su papel central que tiene en la contracción muscular, en su motilidad celular, así como en la dinámica del citoesqueleto y otras funciones celulares. Muchas de las propiedades de la actina, tales como la unión de numerosas proteínas a su segmento terminal amino, la inhibición de su polimerización de DNasa I, modificaciones químicas, el intercambio de nucleótidos unidos y la sensibilidad de las sondas de Cys 374 se debe a su polimerización, se explica lógicamente considerando la estructura atómica de esta proteína.[41]

La combinación de la estructura y de la difracción de fibra de patrones atómicos G-actina obtenido a partir de filamentos de actina el que permitió para construir un modelo de la estructura de F-actina aproximadamente una resolución de 10 A. En conjunto, los modelos F-actina proporcionaron un marco y un conjunto de restricciones para el mapeo de los sitios de unión para las proteínas de unión a la actina.[58]

Si bien en algunos otros estudios, se estaba trabajando sobre posibles roles funcionales de actina nuclear. En estos estudios la presencia de actina nuclear se toma

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

esencialmente por sentado y es el resultado de los ensayos funcionales de los procesos nucleares conocidos que dan la debida importancia. Por ejemplo, la actina nuclear ha sido implicada en la remodelación de la acromatina y la activación de genes a través de una familia de proteínas nucleares denominadas BAF, que se pueden aislar a partir de núcleos en asociación con una subunidad de actina. Además la actina nuclear ha sido implicado en la exportación nuclear de ARN genómico no empalmado, así como del elemento de respuesta favorable rev (RRE) y el elemento de transporte constitutivo (CTE), que contiene ARNm del VIH. Estos documentos contituyen avances importantes y sirven para avanzar rápidamente el campo de actina nuclear de forma significativa y que arrojan nueva luz sobre la base potencial del tráfico nucleocitoplasmático observado de la actina.[59]

Un estudio reciente argumentó que no hay grandes cambios conformacionales en los cambios de dominio cuando el ATP y ADP están ligados a las G-actina en base a comparaciones de las estructuras cristalinas de estos dos estados. Dado que los datos de la misma investigación muestran una gran diferencia en las comparaciones de las tasas de la digestión con la subtilisina entre ADP G-actina y ATP G-actina, por lo que es posible las interacciones de cristales de embalaje, favoreciendo un estado cerrado de G-actina a pesar de que en la solución del estado de la hendidura puede ser desplazado por un nucleótido unido. Éste tipo de conclusiones se mostró en otros estudios en donde se mostró en la escisión del bucle de DNAsaI unido, no presenta ningún cambio significativo en la estructura de G-actina, mientras que los estudios de soluciones complementarias sugirieron que la escisión se asocia con una abertura de la hendidura de unión de nucleótidos.[60,61]

La ausencia de grandes cambios conformacionales entre el monómero de G-actina y el protómero F-actina ha sido confirmada por una serie de 3 estudios realizados con la ayuda de un microscopio de baja resolución de electrones. La evidencia experimental para el movimiento del bucle en la posición de estacionamiento por disulfuro de reticulación para el cuerpo del monómero de actina en un mutante de levadura, la actina impide la formación de filamentos. Por lo que la dinámica de bucles son escenciales para la formación de filamentos, esto se puede llevar a cabo después de la polimerización en F-actina, pero se provocaría la interrupción del filamento.[56,62–64]

1.2.4. Dinámica de Acoplamiento

Los filamentos de actina se ensamblan en dos tipos generales de estructuras, llamadas haces y redes de actina, que desempeñan diferentes funciones en la célula.[65]

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

Estos filamentos de actina se reticulan en matrices paralelas estrechamente empa- quetadas y están ligeramente reticulados en conjuntos ortogonales que forman redes tridimensionales con las propiedades de los geles semisólidos; dicha formación se en- cuentra gobernada por una variedad de proteínas unidas a la actina que reticulan los filamentos de actina en patrones distintos como se observa en la Figura1.6. Estas proteínas son llamadas también proteínas de actinación y contienen al menos dos dominios que se unen a la actina permitiendoles unirse y reticular dos filamentos diferentes de actina.[66] Las proteínas que reticulan los filamentos de actina en haces suelen ser pequeñas y rígidas que obligan a los filamentos a alinearse estrechamente entre si; por el contrario, las proteínas que organizan los filamentos de actina en redes tienden a ser grandes, flexibles y pueden reticular filamentos perpendiculares.[50]

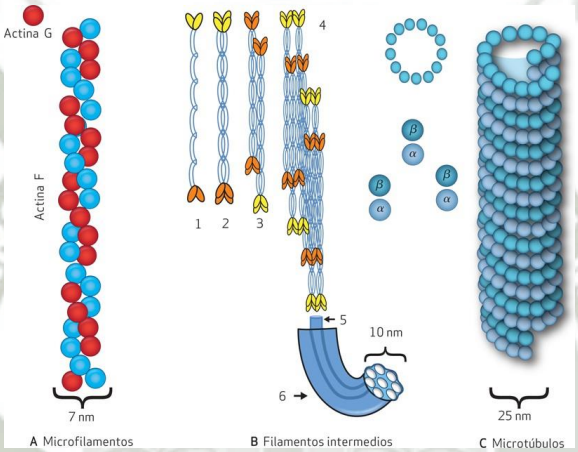


Figura 1.6: Ensamble de los filamentos de actina para su transformacion a microtúbulos.
Fuente: Teresa I. van der Goes: Histología y Biología Celular, 3ra Ed.

En la figura1.6, se observa tres filamentos que conforman el citoesqueleto, constituidos por el diámetro y las subunidades que lo conforman. (A) Se observan mi- crofilamentos conformados por subunidades de actina G, quienes se polimerizan generando dos cadenas que se asocian helicoidalmente para conformar un filamento, dicha forma de la actina se denomina F. (B) Los filamentos intermedios se conforman cuando un monómero (1) se asocia con otro para generar un dímero (2) dos dímeros se asocian para generar un tetrámero donde los extremos carboxilo y amino se encuentran en sentido contrario. Entonces el tetrámero es la subunidad básica de los filamentos. Varios tetrámeros se agrupan generando un protofilamento, donde ocho de ellos generaran un filamento (C). Los microtubúlos conformados por heterodímeros de α y β tubulinas que generan protofilamentos, 13 de ellos constituyen un microtúbulo.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

1.2.5. Función y localización

Las diversas funciones celulares de actina, ya sea como un componente del cito-esqueleto o un factor importante en los procesos de la contracción muscular y la motilidad, implican las interacciones de actina con una multitud de proteínas de unión a actina. Un claro ejemplo de la motilidad de la actina basada en células no musculares es el movimiento de la bacteria *Listeria monocytogenes* a través del citoplasma de la célula huésped. Un estudio reciente demuestra que la velocidad de movimiento de bacterias es igual a la tasa de crecimiento de cola de cometa en su ex- tremo proximal, lo que sugiere que la polimerización de actina impulsa la propulsión bacteriana.[67,68]

Estas funciones derivan de las habilidades de estos filamentos para formar polí- meros lineales. Estas estructuras proporcionan fuerza, arquitectura y la ubicación de los componentes de andamio dentro de las células, que participan en dar forma y compartimientos a orgánulos, así como moléculas de localización a sus apropiadas ubicaciones físicas.[69]

Una segunda característica de algunos polímeros de actina es que la polimerización dirigida y la despolimerización, en algunos casos pueden proporcionarse empujando y tirando fuerzas que se puede integrar en procesos biológicos en movimiento. Si los filamentos están dispuestos con sus extremos en crecimiento dirigidos al objeto, se moverá a condición de la cola del filamento y el sistema será relativamente inmóvil en relación con el objeto, por lo cual el sistema de tracción de filamentos necesitará de la integración de las fuerzas creadas a partir de la polimerización en sistemas biológicos que incluyen:

Filamentos de polimerización de actina en el borde de ataque de una célula eucariota en movimiento, conduciendo delante de la membrana.[44,70]

La actina juega un papel importante en la motilidad celular a través de un proceso dinámico de transición impulsado por la polimerización y despolimerización, de la actina globular G y F. En los filamentos de actina durante el proceso de intercambio de los nucleótidos que se encuentran ligados por subunidades de G-Actina y la hidrolisis de ATP o el Pi ligados son lanzados por subunidades de F-Actina.[71]

La polimerización de actina en presencia de ATP es un proceso complejo que involucra a muchas reacciones químicas, por lo cual la actina monomérica puede unirse a otros ATP o ADP, el ADP monomérico ligado y la actina polimérica pueden unirse al Pi.[72] Las subunidades de ATP ligados a filamentos de actina hidrolizan los enlaces de ATP y las convierten primeramente a subunidades a de ADP-Pi (Ver

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

Figura1.1), que subsecuentemente realizan la conversión de Pi a la forma de ADP ligada a actina. Después de cuatro formas de nucleótidos diferentes de actina son polimerizados en presencia de ATP, estos son:

- Los nucleótidos libres. (A)
- Los ATP ligados. (T)
- Los ADP ligados. (D)
- Los ADP + Pi ligados. (i)

En presencia de ADP y en ausencia de ATP + Pi se puede presentar en dos formas, una en forma de nucleótidos libres y la otra en formas de ADP ligados. Ellas se copolimerizan aunque no se conviertan entre si en filamentos de actina. Debido a la gran afinidad del ADP a su forma nucleotidica libre de G-Actina, la forma ADP ligado es predominante en condiciones de exceso de ADP y la cantidad de la forma de nucleótidos libres es mínima (Ver Figura1.1).

1.2.6. Interacción con las Profilinas

Las profilinas, son pequeñas células eucariotas abundantes en el citoplasma que se unen a los monómeros de actina, polifosfoinosítidos y polímeros de poli-L-prolina. Esta multiplicidad de interacciones llevó a la especulación de que las profilinas po- drían vincular la regulación del citoesqueleto de actina, las vías y tal vez otros sistemas no identificados. La profilina se une a pequeños grupos de fosfolípidos de membrana fosfatidilinositol 4.5 bifosfato (PIPX) y es esencial para la reconstrucción bioquímica de factor de crecimiento epidérmico dicha producción es regulada del segundo mensajero inositol trifosfato (IP3) de PIP2.[73–75]

La interacción entre la profilina con la regulación de la actina no está claro a niveles bioquímicos o celulares. Las preparaciones originales de profilina estan estre- chamente ligados a la actina por lo que se acepta que la profilina es un monómero de la proteína actina en los extractos celulares.[76–78]

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

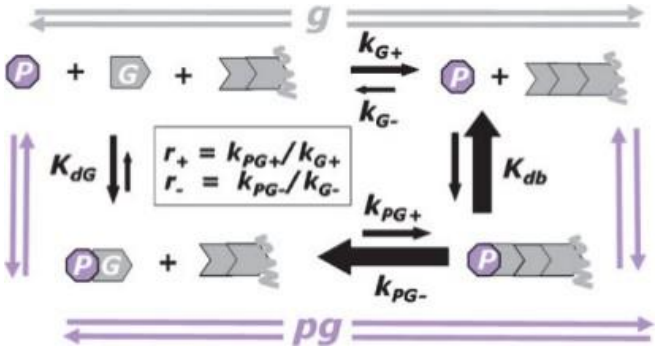


Figura 1.7: Polimerización de la actina.
Fuente: Elena G. Yarmola, Michael R. Bubb. How depolymerization can promote polymerization: the case of actin and profilin. 2009.

Se han mostrado en estudios que la profilina de plaquetas humanas se une a monómeros de actina con afinidad micromolar, se mostraron que la concentración de la actina es superior a la profilina de 5 a 10 veces en plaquetas. La profilina puede actuar catalíticamente en lugar de estequiométricamente en la actina y sugerir maneras en que podría promover la profilina en lugar de inhibir la polimerización de actina.[79–81]

La polimerización de actina se puede dar por dos caminos en presencia de actina (Ver Figura1.7), el primer camino es por elongación de filamentos de actina donde "g" (color gris), esta elongación es directa mediante la unión de subunidades de G-Actina al extremo de púas con la tasa KG^+ para obtener una subunidad larga del filamento.[1] El segundo camino es el "pg" (color morado), se da mediante la unión de la profilina a la G-Actina formando un complejo profilina-Actina (KdG), la unión del complejo profilina-Actina con la tasa $KP\ G^+$ del extremo final con púas con la subsecuente disociación de la profilina con la (Kdb). El proceso inverso para el camino "pg" involucra la asociación de la profilina con el extremo final de púas, también se puede dar una disociación del complejo profilina-Actina con la tasa $KP\,G^-$ y también la disociación de la profilina con los monómeros de actina. El proceso inverso para el proceso de "g" es simplemente una disociación de las subunidades del filamento final de actina con la tasa KG^-. Los ratios r^+ y r^- son factores de aceleración relativa a la asociación de las tasas y disociación del complejo profilina-Actina y actina pura.[1,82]

1.3. Bioinformática

La bioinformática es una ciencia que emplea como herramienta computacional que permite analizar, eliminar, almacenar, gestionar, interpretar, integrar y acelerar

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

el ingente del volumen de información a1 que la biología molecular, la genómica (rama de la biología que estudia el genoma humano) o la proteómica (centrada en el estudio y predicción del plegamiento o estructura tridimensional de las proteínas) producen. Para tal fin desarrolla aplicaciones informáticas y métodos de análisis estadístico.[83] Entre los métodos que utilizaremos describiremos algunos como son la mecánica molecular, la dinámica molecular y el docking molecular.

La bioinformática también nos permite seguir la evolución de los organismos de una especie a través de la evolución de su ADN, asi como también predecir la secuencia de aminoácidos en una proteína (su estructura primaria) a partir de la secuencia de un gen codificado, etc.[84]

1.3.1. Mecánica Molecular

La mecánica molecular es una de las técnicas con la que actualmente se viene trabajando en sistemas químicos; como cualquier técnica la mécanica molecular tiene ventajas y desventajas. Esta nos permite el modelado de macromoléculas como proteínas y segmentos de ADN. Uno de los defectos de éste método es que existen propiedades químicas que no están descritas, así como estados excitados electrónicos. Este método es eficaz para trabajar con moléculas de gran tamaño (macromoléculas), consiste en la expresión de ecuaciones clásicas simples, como la ecuación oscilador armónico con el objetivo de describir la energía que va relacionado con el enlace de estiramiento, flexión, rotación, y las fuerzas intermoleculares, así como interacciones de Vander Waals y enlaces de hidrógeno. Con éste método se puede parametrizar para una clase específica de moléculas así como proteínas, moléculas orgánicas, órgano-metálicos, etc. para así tener alguna trascendencia frente a la descripción de otras proteínas.[85]

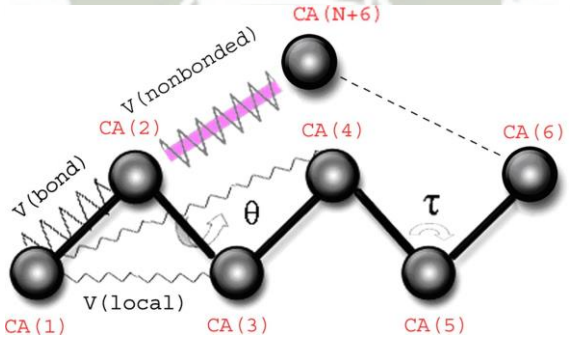


Figura 1.8: Ilustración de los términos fundamentales de la energía del campo de fuerza.
Fuente: Propio

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

El principio de la mecánica molecular es expresar la energía en función a la resistencia de estiramiento, flexión de enlaces (ver figura1.8) y el hacinamiento del átomo y usar ésta energía para encontrar las longitudes de enlace, ángulos y diedros correspondiente a la energía mínima de su geometría. La forma de expresión matemática de la energía y los parámetros constituyen un campo de fuerza por lo que a los métodos de mécanica molecular se les denomina métodos de campo de fuerza.[85]

Campo de Fuerza

En mecánica molecular, considera a la molécula como un grupo de partículas (átomos) unidos por fuerzas armónicas o elásticas; cuyas fuerzas pueden ser detalladas como funciones de energía potencial de la mecánica clásica, que se basa fundamentalmente en la consideración del oscilador armónico o anarmónico para describir el enlace molecular empleándolo a distancias de enlaces, al ángulo de enlace e inclusive a los ángulos diedros. A este grupo de funciones de energía potencial se le conoce como "campo de fuerza".[86]

Los campos de fuerza intentan predecir de forma precisa las estructuras moleculares y sus propiedades y también va encaminada a la modelización de grandes moléculas como las proteínas o polímeros, entre ellas tenemos a la familia MM que consta de sus versiones (MM2, MM3 y MM4), éstas son utilizados por la bioinformática para el cálculo de moléculas pequeñas. La MM2 es trabajada en términos cúbicos, la que puede ser la causa de que la función cúbica pase a través de un valor máximo que está lejos a un valor de referencia, esto a llevado a un desastre en la expansión de enlaces en algunos experimentos. Éste defecto a sido superado en el MM3. En el caso de MM4 éste mejora a la MM2 y MM3.

- *AMBER* (aplicable a moléculas biológicas), es usado para analizar proteínas y ácidos nucléicos, también para polímeros; generalmente dan resultados para modelos geométricos de fase de gases, energías libres de solvatación, frecuencias vibracionales y energías conformacionales.[86]

- *CHARMM* es usado extensamente para simulaciones en el rango de moléculas pequeñas a solventes complejos de macromoléculas biológicas largas, incluyen- do el cálculo de las interacciones y de energías comformacionales, geometrías de la molécula, valor mínimo, dinámica de tiempo de dependencia, barreras de rotación, frecuencias vibracionales y energías libres.[86]

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

- *MMFF* es similar al MM3 pero difiere en la aplicación en el proceso de la fase de condensación en la dinámica molecular. Es adecuado para calcular en el estado gaseoso y condensación.[86]

En la mecánica molecular clásica es importante el uso de la alta calidad del campo de fuerza, es por ello que es preciso en la obtención de predicciones moleculares, el uso de campos de fuerza como el OPLS-AA para proteínas y el modificado OPLS- AA/L para lípidos, el cual es extensamente empleado en la simulasión de sistemas biológicos.[87,88]

En el campo de fuerza *OPLS-AA*[89–91], los parámetros no enlazados son optimizados para reproducir experimentalmente propiedades en fase líquida y los parámetros torsionales son ajustados a un experimento o a datos de la Química Cuántica, lo cual permite elevar el nivel de investigación y la posible mejora en el futuro.[88,92]

$$E = E_{enlazante} + E_{noenlanzante} \quad (1.1)$$

$$E_{enlazante} = \sum E_{str} + \sum E_{bend} + \sum E_{tors} \quad (1.2)$$

$$E_{noenlanzante} = \sum E_{vdw} + \sum E_{el} + \sum E_{cross} \quad (1.3)$$

Donde E_{str} es la función de energía para estirar un enlace entre dos átomos, E_{bend} representa la energía requerida para doblar un ángulo, $E_{(tors)}$ es la energía de torsión para la rotación alrededor de un enlace, $E_{(vdw)}$ y $E_{(el)}$ describen las interacciones átomo-átomo no enlazado, y finalmente $E_{(cross)}$ describe acoplamiento entre los tres primeros términos.

Debido a esta función de energía de las coordenadas nucleares, las geometrías y las energías relativas pueden ser calculadas por optimización. Las moléculas estables corresponden a mínimos sobre la superficie energética potencial, y pueden localizarse minimizando las fuerzas entre los átomos, que se hallan asociados al campo de fuerza en función de las coordenadas nucleares. Las transiciones conformacionales se pueden describir localizando la estructura de transición sobre la superficie de energía potencial o también conocido como hipersuperficie de potencial.

- **Energía de Estiramiento** $E(str)$ es la función de energía para estirar un enlace entre dos tipos de átomos A y B. Para describir la tensión de enla- ce o energía de estiramiento es necesario utilizar la ecuación de Morse (ver ecuación1.4).

$$E_p(x) = -D + D(1 - e^{-kx})^2 \quad (1.4)$$

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

Figura 1.9: Definición de Potencial de enlace.
Fuente: Propio

Donde a pequeñas deformaciones del enlace respecto de su valor natural se puede considerar válida la aproximación armónica que corresponde a la "Ley de Hook" (ecuación1.5). [93] Quien nos habla de dos esferas unidas a través de un resorte, y es sencillo calcular la constante asociado al resorte en función de la variación de la longitud que los separa, ver figura1.9.

$$V_r = \frac{1}{2}k(r - r_2)^2 \tag{1.5}$$

En la Figura1.10, se muestra la comparación esquemática de diferentes potenciales con la función armónica (zona punteada). Las pequeñas desviaciones de la longitud representadas por la zona sombreada. La función armónica de- muestra el cumplimiento de la ecuación de Hook la que no indica que "La elongación del enlace se duplica al duplicar la fuerza sobre éste". [94]

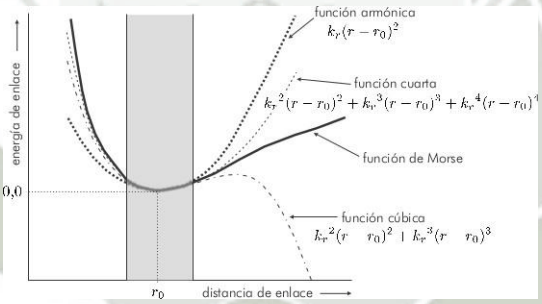


Figura 1.10: Diferentes Potenciales definidos para el enlace en los campos de fuerza.
Fuente: F. Jensen, Introduction to computational chemistry, 1999

- **La energía de flexión.** $E_{(es)}$ la energía necesaria para doblar un ángulo formado por tres átomos A-B-C, donde hay un enlace entre A y B, y entre B y C. Al igual que E_{str}, la curva E generalmente se expande como una serie de Taylor Alrededor de un ángulo de enlace natural y terminado. En el segundo orden, dando la aproximación armónica.

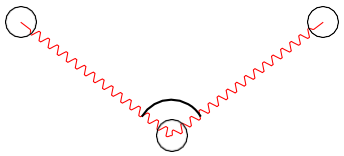


Figura 1.11: Definición del Potencial de enlace.

Fuente: Propio

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

En este caso es frecuente usar un potencial armónico asi como se describe en la ecuación.1.6.

$$V_b = \frac{1}{2} ko(\theta - \theta_0)^2 \qquad (1.6)$$

Donde la V_b es la energía de flexión, k_o es la constante de fuerza de flexión del enlace, θ es el ángulo de enlaces y θ_0 es el ángulo de enlace de referencia. Si bien la expansión armónica simple es adecuada para la mayoría de las aplicaciones, puede haber casos en los que se requiere una mayor precisión. La siguiente mejora es incluir un término de tercer orden, análogo a E_{str}. Esto puede dar una descripción muy buena en un amplio rango de ángulos, como se ilustra en la Figura1.12.

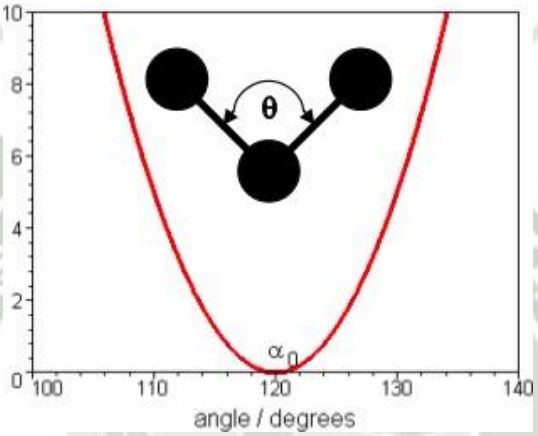


Figura 1.12: Gráfica de la energía de flexión.
Fuente: F. Jensen, Introduction to computational chemistry, 1999

Para el desvío de su equilibrio de un determinado ángulo de enlace la energía necesaria debe ser mucho menor que la energía necesaria para distorcionar longitudinalmente dicho enlace y seguidamente, la k_0 es proporcionalmente mas pequeña que la de tensión de enlace.[95]

- **La energía de torsión.**

La energía de torsión describe parte del cambio de energía asociado con la rotación alrededor de un enlace en las moléculas B-C en una secuencia de cuatro átomos A-B-C-D, donde A-B, B-C y C-D están unidos (ver figura1.13). Las rotaciones intramoleculares (a partir de la rotación y los ángulos dihedros) requieren de energía, por ejemplo la conversión de una conformación de silla o en bote es endotérmica.[96]

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

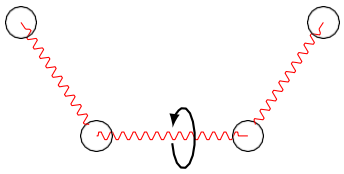


Figura 1.13: Definición del Potencial de Torsión.
Fuente: Propio

Mirando hacia abajo del enlace B-C, el ángulo de torsión se define como el ángulo formado por los enlaces A-B y C-D como se muestra en la Figura1.14. El ángulo *w* se puede tomar para estar en el intervalo $[0^\circ, 360^\circ]$ o $[-180^\circ, 180^\circ]$. La energía de torsión es diferente de la Energía de estiramiento y la Energía de flexión; las cuales se doblan en tres aspectos: Una barrera rotacional que tiene contribuciones tanto de los términos no enlazados (van der Waals como electrostáticos), como de la energía de torsión y de los parámetros de torsión, están por lo tanto íntimamente unidos a los parámetros no enlazados. La función de energía de torsión debe ser periódica en el ángulo w: si el enlace es girado 360° la energía debe volver al mismo valor. El coste en energía para distorsionar una molécula por rotación alrededor de un enlace es a menudo bajo.[86]

Para abarcar la periodicidad, Energía de torsión se escribe como una serie de Fourier que explica todas las relaciones 1-4 a través de enlaces

$$V_t(w) = \sum \frac{1}{2} V_n cos(nw) \qquad (1.7)$$

Donde *w* es el ángulo de torsión, *V* es la constante de fuerzas torsionales y *n* es la variable.

El término $n = 1$ describe una rotación que es periódica por 360°, el término $n = 2$ es periódico por 180°, el término $n = 3$ es periódico por 120°, y así sucesivamente. Las constantes Vn determinan el tamaño de la barrera para la rotación alrededor del enlace $B-C$. Dependiendo de la situación, algunas de estas constantes V_n pueden ser cero. En etano, por ejemplo, la conforma- ción más estable es aquella en la que los hidrógenos están escalonados entre sí, mientras que la conformación eclipsada representa un máximo de energía. Como los tres hidrógenos en cada extremo son idénticos, está claro que hay tres conformaciones energéticamente equivalentes escalonadas y tres equiva- lentes eclipsadas. Por lo tanto, el perfil de energía de rotación debe tener tres mínimos y tres máximos. En la serie de Fourier sólo los términos que tienen

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

n =3, 6, 9, *etc.*, pueden tener V_n constantes diferentes de cero. Para la rota- ción alrededor de enlaces simples en sistemas sustituidos, pueden ser necesarios otros términos. En la molécula de butano, por ejemplo, todavía hay tres mí- nimos, pero las dos conformaciones gauche (ángulo de torsión ±60°) y anti (ángulo de torsión 180°) ahora tienen diferentes energías.[97]

La energía interna del ligando es la sumatoria de los términos torsional y choque. Este último es calculado análogamente a la energía de choque proteína- ligando, pero sólo para los átomos de ligando que estén separados por al menos cuatro enlaces.[98]

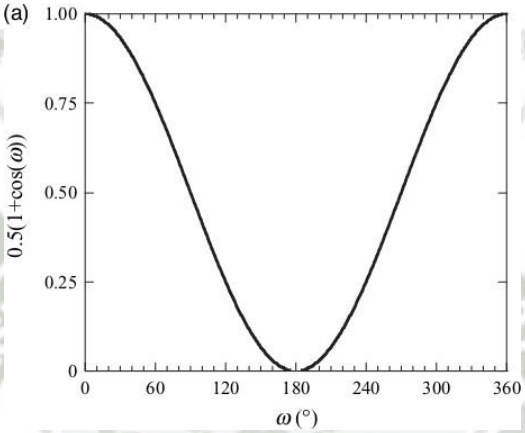


Figura 1.14: Función de la energía torsional.
Fuente: F. Jensen, Introduction to computational chemistry, 1999

- **Interacciones no enlazantes: La energía de van der Waals**

La E_{vdw} es la energía de van der Waals que describe la repulsión o atracción entre los átomos que no están directamente unidos junto con el término electrostático, puede interpretarse como la parte no polar de la interacción que no está relacionada con la energía electrostática debido a cargas (atómicas). E_{vdw} tiende a ser negativo a grandes distancias interatómicas y se vuelve muy positivo para distancias cortas.[99]

A distancias intermedias, sin embargo, existe una ligera atracción entre dos nubes de Momento dipolar permanente, el movimiento de los electrones creará una distribución ligeramente irregular en un momento dado. Este momento dipolar inducirá una polarización de carga en la molécula vecina (u otra parte de la misma molécula), creando una atracción, y puede derivarse teóricamente

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

que esta atracción varía como la sexta potencia inversa de la distancia entre los dos fragmentos.[99]

Las intereacciones electrostáticas son producidas por la diferente distribucion de cargas en la molécula y pueden modelarse teniendo en cuenta las cargas puntuales atómicas por un potencial de Coulomb. Como se ve en la ecuación.1.8. [95]

$$V_{elec} = \frac{1}{4}\pi\varepsilon_0 q_i q_j / r_{ij} \qquad (1.8)$$

donde q_i q_j son cargas atómicas, r_{ij} son las distancias entre i y j , 4 $\pi\varepsilon_0$ es la permitividad del vacío.

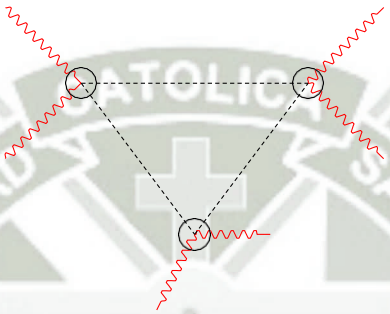


Figura 1.15: Interacciones débiles tipo Lennard–Jones.
Fuente: Propio

Por otra parte las interacciones de Van der Waals son todas las interacciones entre átomos o moléculas que no estan cubiertas por las interacciones electros- táticas como dispersión, repulsión e inducción. Una forma para modelar dichas interacciones es mediante el resultado que nos da el potencial de Lennard Jones como se ve en la ecuación1.9. [95]

$$V_{VW}^{LJ} = \frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{C_{ij}}{r_{ij}^{6}} \qquad (1.9)$$

donde A y C son constantes, r es la distancia, y el superíndice 6 considera la interacción dipolo-dipolo y el superíndice 12 es una exponencial arbitraria, basada en la experiencia computacional que garantiza un buen comportamiento de la ecuación.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

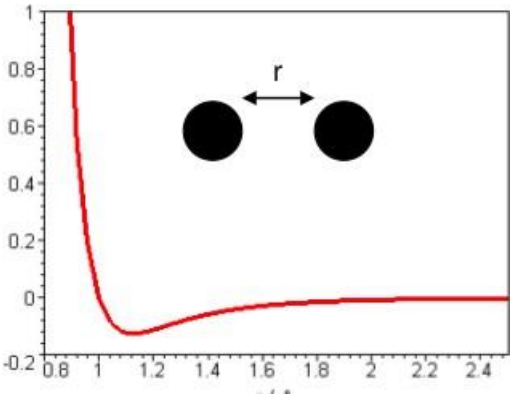


Figura 1.16: Imagen de las energías de Van der Waals.
Fuente: F. Jensen, Introduction to computational chemistry, 1999

No es posible derivar teóricamente la forma funcional de la interacción repulsiva, sólo se requiere que vaya hacia cero cuando *r* va al infinito, y debe acercarse a cero más rápido que el término r^{-6}, ya que la energía debe ir hacia cero desde abajo.[95]

La energía electrostática:

La otra parte de la interacción no enlazada se debe a la redistribución interna de los electrones, creando partes positivas y negativas de la molécula. En la aproximación más baja, esto puede ser modelado asignando cargas (parciales) a cada átomo. Alternativamente, se puede asignar al enlace un momento de dipolo de enlace (ver figura1.17).

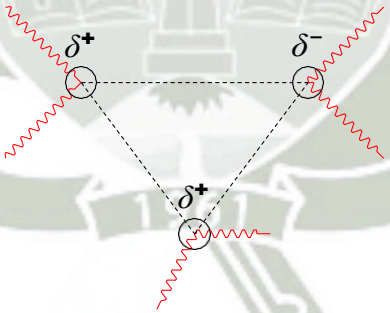


Figura 1.17: Interacción Electrostática.
Fuente: Propio

Estas dos descripciones dan resultados similares (pero no idénticos). Sólo en el límite de larga distancia de interacción entre dichas moléculas las dos descripciones dan resultados idénticos. La interacción entre las cargas puntuales

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

viene dada por el potencial de Coulomb. Siendo una constante dieléctrica.

$$E_{el}(R^{AB}) = \frac{Q^A Q^B}{R^{AB}} \tag{1.10}$$

Podemos darnos cuenta rápidamente que, solo depende de las cargas atómicas y de la distancia de separación entre los centros atómicos, todos estos elementos son fáciles de recolectar para definirlos dentro de un campo de fuerza, por lo general son tomados desde cálculos teóricos, en el caso de las cargas, las cargas de Mulliken son las que se hallan en campos de fuerzas anteriores a 2010, mientras que los mejorados tienen o contienen cargas derivadas del análisis poblacional de Hirshfeld.

Las cargas atómicas pueden ser asignadas por reglas empíricas, pero se asignan más comúnmente ajustándose al potencial electrostático calculado por métodos de estructura electrónica, tal como se discute en la siguiente sección. Dado que el enlace de hidrógeno es en gran medida debido a la atracción entre el hidrógeno deficiente en electrones y un átomo electronegativo tal como oxígeno o nitrógeno, una adecuada elección de cargas parciales puede modelar adecuadamente esta interacción. [86]

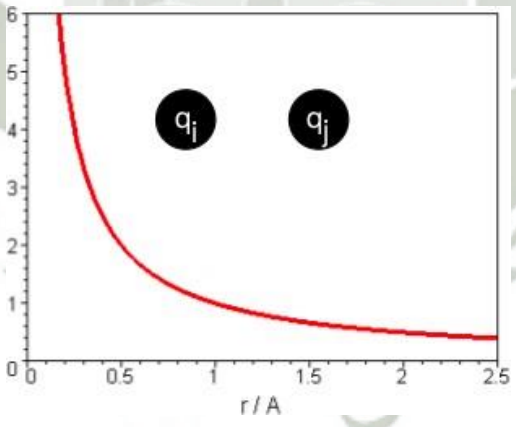


Figura 1.18: Imagen de las energías electrostáticas.
Fuente: F. Jensen, Introduction to computational chemistry, 1999

1.3.2. Dinámica molecular

La dinámica molecular es el método de elección cuando se quiere estudiar las propiedades dinámicas de un sistema en detalle atómico, siempre que las propiedades sean observables dentro de la escala de tiempo accesible a las simulaciones. [100]

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

Otro concepto que explica la Dinámica molecular es que este es una simulación del comportamiento de un sistema molecular dependiente del tiempo, tal como el movimiento vibratorio o el movimiento Browniano. Esta expresión de energía se usa para calcular las fuerzas sobre los átomos para cualquier conformación dada.[101]

Su fundamento radica en las leyes de la mecánica clásica mediante la cual las ecuaciones del movimiento son integradas con la finalidad de generar sucesivas con- figuraciones.[102] El resultado es la trayectoria específica como la posición y velocidad de las partículas en el sistema con tiempos variables. Las leyes de newton con res- pecto al movimiento pueden ser:

1. Un cuerpo continuo de movimiento en línea recta a velocidad constante.

2. Su fuerza es igual a la velocidad de cambio de momento.

3. A cada acción hay una reacción y a cada reacción una acción.

Las interacciones determinan las fuerzas que actúan sobre los átomos y dado que las masas de los átomos son conocidas, sus aceleraciones pueden ser calculadas. Posiciones, velocidades y aceleraciones son suficientes para determinar la evolución temporal del sistema. Una vez que se conoce el estado del sistema (determinado por una lista de posiciones y velocidades, denominada configuración) en un momento determinado, se puede calcular toda otra información sobre el sistema en ese momento. Por ejemplo, la temperatura puede calcularse simplemente determinando la energía cinética promedio de las velocidades.[103]

La trayectoria es obtenida resolviendo la ecuación diferencial de la segunda ley de Newton:

$$F_I = m_i a_i \tag{1.11}$$

$$F_i = m_i \frac{dv_i}{dt} \tag{1.12}$$

$$F_i = m_i \frac{d^2 r_i}{dt^2} \tag{1.13}$$

Esta ecuación describe el movimiento de las partículas de masa (m_i) a lo largo de la coordenada (r_i) con la F_i siendo la fuerza sobre la partícula en esa dirección. En el caso más simple ninguna fuerza actúa sobre cada partícula entre colisiones. Lo que ocurre es que de una colisión a otra la posición de la partícula que cambia la velocidad inicial por la derivada del tiempo, donde la aceleración inicial es constante y la derivada del tiempo (dt) es el tiempo entre colisiones. En la segunda situación la partícula experimenta una fuerza constante entre colisiones.[88]

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

A su vez, la fuerza sobre cada átomo puede también ser expresada como el negativo de la derivada de la energía potencial con respecto a la posición del átomo:

$$F_i = \frac{dV}{dt_i} = -\nabla V \qquad (1.14)$$

Si la energía potencial del sistema es conocida entonces, dadas las coordenadas de una estructura inicial y un conjunto de velocidades, la fuerza que actúa sobre cada átomo puede ser calculado y un nuevo conjunto de coordenadas generadas, a partir de las cuales se pueden calcular nuevas fuerzas. La repetición del procedimiento generará una trayectoria correspondiente a la evolución del sistema en el tiempo. La precisión de las simulaciones está directamente relacionada con la energía potencial, función utilizada para describir las interacciones entre partículas. En la dinámica molecular, se utiliza una función de energía potencial clásica que se define como una función de las coordenadas de cada uno de los átomos. La función de energía potencial está separada en términos que presentan interacciones covalentes e interacciones no covalentes.[103]

Función de Potencial

Las funciones potenciales basadas en el modelo físico (como CHARMM, AMBER, OPLSAA) requieren representaciones de todo el átomo de estructuras de proteínas para modelar las fuerzas físicas detalladas y por lo tanto, son inadecuados para simplificar las representaciones de proteínas.

La forma de una función potencial en este estudio es una combinación lineal de los descriptores:

$$H_c = w * c \qquad (1.15)$$

Es decir el producto interno del vector descriptor C y el vector de peso w. El paisaje energético de una función potencial empírica definida para el modelo de proteína simplificado es inevitablemente diferente del paisaje de verdadera energía de una proteína real. Para tareas tales como la predicción de la estructura de la proteína, el requisito mínimo es que las estructuras conformacionales en el modelo de proteínas simplificado que estén más cerca de la estructura nativa, tengan los valores de energía globalmente mínimos.[104]

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

El algoritmo de Verlet y sus variantes

El algoritmo de Verlet es preciso hasta **dt** es reversible en el tiempo y tiene excelentes propiedades de conservación de energía. Las posiciones se avanzan en un paso en lugar de dos. Uno de los problemas es que un término de valor pequeño (Odt_2) se agrega a la diferencia de dos términos relativamente grandes (Odt), esto puede causar impresión numérica.

Dicho algoritmo ayudó a obtener resultados teóricos interesantes en el crecimien- to de películas delgadas, fatiga de materiales, predicción de estructuras estables en moléculas, cristales líquidos y en un sin fin de aplicaciones a sistemas microscópi- cos. Se planteó un sistema de ecuaciones para solucionar el problema de ecuaciones diferenciales de segundo orden, lo cual aumenta el número de operaciones a realizar en su implementación en un programa de cómputo, de tal modo que el algoritmo de Verlet, al trabajar directamente sobre la segunda derivada, brinda ventajas en la mayoría de las aplicaciones donde interviene la mecánica clásica, pero, tiene limitaciones importantes en cuanto a la dependencia de la fuerza con la primera derivada, lo que reduce de manera importante su aplicación en simulación de movimiento en medios resistivos.[105]

Se propusieron una variedad de algoritmos alternativos e implementados a lo largo de los años; estos incluyen el bien conocido integrador velocidad-Verlet (VV). Este segundo integrador de pedidos está empleado en la gran mayoría de dinámicas moleculares gracias a su simplicidad y su estabilidad excepcional. Por otra parte, el algoritmo VV es simpléctico, tiempo reversible y capaz de alcanzar un alto nivel de precisión con número mínimo de evaluaciones de fuerza por paso de tiempo.[106]

Otra variante del algoritmo de Verlet es el algoritmo de salto-rana o "leap frogs" el cual es equivalente al algoritmo de Verlet, sin embargo no implica tomar la diferencia entre grandes números para estimar una pequeña cantidad.[107]

1.3.3. Acoplamiento molecular

Docking molecular es un procedimiento de la química *in sílico* que se utiliza para explorar e intentar predecir posibles modos de formación de complejos como ligando-receptor, normalmente el receptor es una proteína o también un oligómero y el ligando una molécula de pequeño tamaño u otras proteínas. El conocimiento de la orientación preferida, a su vez se puede usar para predecir la resistencia de asociación o afinidad de unión entre dos moléculas utilizando, por ejemplo, anotaciones de las funciones.[105]

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

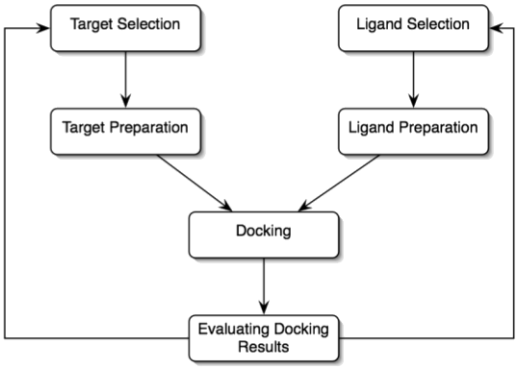


Figura 1.19: Un típico flujo de trabajo de acoplamiento.
Fuente: K. I. Ramachandran, Computational chemistry and molecular modeling: principles and applications, 2008

El objetivo del acoplamiento molecular (ver figura1.19) es generar un conjunto de conformaciones del complejo y así poder clasificarlas de acuerdo a su estabilidad

Las asociaciones entre moléculas biológicamente relevantes, tales como proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos, y lípidos desempeñan un papel central en la transducción de señales. Además, la orientación relativa de los dos socios que interactúan puede afectar al tipo de señal producida. Por lo tanto, el acoplamiento será eficiente ante la fuerza y la clase de señal producida.

El diagrama de flujo muestra los pasos de acoplamiento. Las estructuras 3D para la macromolécula y la molécula pequeña deben ser elegidos, y a continuación, cada estructura debe prepararse de acuerdo con los requisitos del método de acoplamiento que se utiliza. Después del acoplamiento, los resultados deben analizarse, seleccionando los modos de encuadernación con mejores puntuaciones.[105]

Para evaluar varios métodos de acoplamiento, es importante considerar cómo la proteína y el ligando están representados. Hay tres representaciones básicas del receptor: atómica, superficie y rejilla.

Entre estos, la representación atómica generalmente sólo se utiliza en conjunción con una función de energía potencial y, a menudo, solamente durante los procedimientos finales RANKING (debido a la complejidad computacional de evaluar las interacciones atómicas en pares). Los programas de acoplamiento basados en superficie son exclusivamente, del acoplamiento proteína-proteína.

Estos métodos intentan alinear puntos en superficies minimizando el ángulo entre las superficies de moléculas opuestas. Por lo tanto, una aproximación de cuerpo rígido sigue siendo el estándar para muchas técnicas de acoplamiento proteína-proteína.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

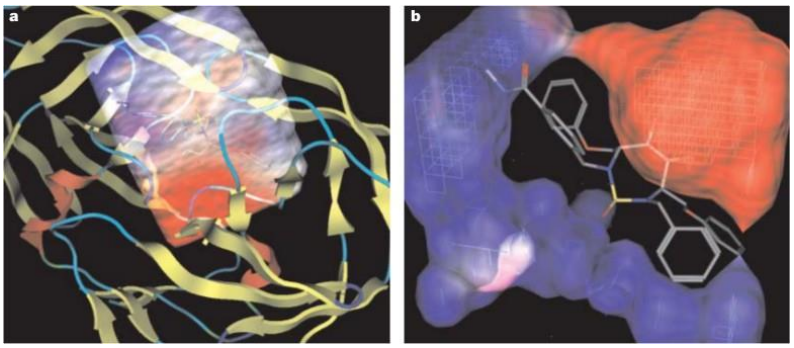


Figura 1.20: Representaciones de la cuadrícula.
Fuente: Douglas B. Kitchen, J. Bajorath. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. 2004

La idea es almacenar información sobre las contribuciones energéticas del receptor en los puntos de la rejilla de modo que sólo necesita ser leído durante el marcado del ligando. En la forma más básica, los puntos de rejilla almacenan dos tipos de potenciales: electrostático y van der Waals (CAJA 2). En la Figura 1.20, se muestra una rejilla representativa para capturar potenciales electrostáticos, en (A) Se muestra un diagrama de superficie de una retícula que captura el potencial electrostático alrededor de su sitio activo. Rojo y azul indican áreas de potencial electrostático negativo y positivo, respectivamente. (B) Muestra una rejilla de potencial electrostático recortada" de la enzima alrededor del inhibidor unido. En la Figura 1.21, se ilustra el potencial electrostático de un inhibidor unido en el sitio del receptor, adicionalmente se ha mapeado su superficie electrostática molecular.[108]

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

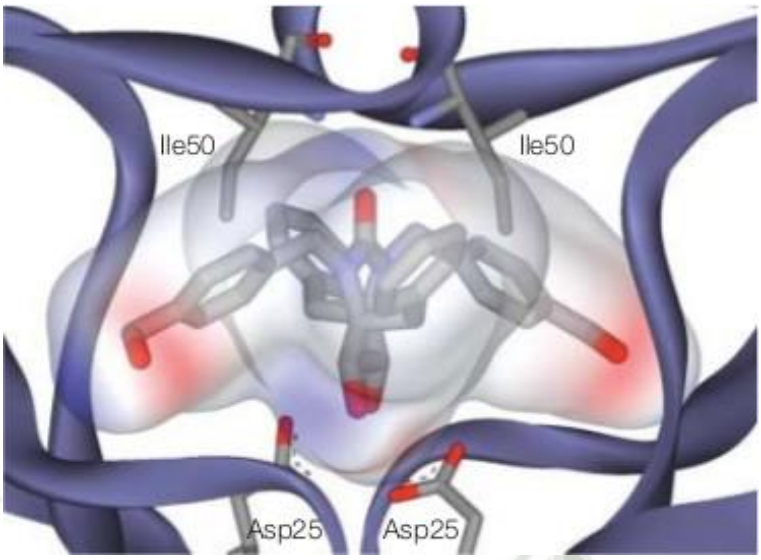


Figura 1.21: Potencial electrostático de un inhibidor unido.
Fuente: Douglas B. Kitchen, J. Bajorath. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. 2004

Función estándar de energía potencial

La energía potencial electrostática es representada como una suma de pares de las interacciones coulombicas, descritas en la ecuación siguiente.

$$E_{coul}(r) = \sum^{N} a_{i=1} \sum^{N} b_j = 1 \frac{q_i q_j}{4\pi\varepsilon_0 r_{ij}} \qquad (1.16)$$

Donde N es el número de átomos, en las moléculas A y B respectivamente, y q es la carga en cada átomo. La energía potencial de van der Waals empleada para las interacciones no enlazadas suele ser modeladas por la función de Lennard-Jones como se muestra en la ecuación:

$$F_{vdw} = \sum_{j=1}^{N} \sum_{i=1}^{N} 4\varepsilon \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{6} \right] \qquad (1.17)$$

Donde s es la profundidad del pozo y σ es el diámetro de colisión de los respectivos átomos i y j. La figura muestra una representación de la función de Lennard-Jones. El término de potencia a la 12 de la ecuación es responsable de la repulsión a pequeña distancia, mientras que la potencia a la 6 proporciona un término atractivo que se aproxima a cero a medida que aumenta la distancia entre los dos átomos.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

1.3.4. Mecánica Estadística

Un concepto de mecánica estadística es la conexión entre propiedades macroscópicas que trata la termodinámica con las propiedades moleculares y atómicas de la materia cuyos principios fundamentales fueron introducidos por James Clerk y Boltzmann.[109]

La mecánica estadística sirve para extrapolar propiedades termodinámicas de materiales a partir de la información molecular de dicho material. En el caso de propiedades en fase condensada que serían realizados por dinámica molecular los cálculos serán necesarios con el fin de realizar un experimento computacional.

El objetivo de la Mecánica Estadística es relacionar las propiedades y los procesos macroscópicos, tales como las ecuaciones mecánicas y térmicas del estado, a las trayectorias subyacentes y mecanismos hamiltonianos.[110]

Las computadoras de hoy en día no sólo son más exactas, sino también diez órdenes de magnitud más rápidas que los humanos. Con estas máquinas podemos seguir trayectorias acopladas no linealmente para millones, o incluso miles de millones de pasos de tiempo. Ya no es difícil calcular el tiempo. Los promedios de tiempo mecánicos de equilibrio y de no equilibrio ahora pueden calcularse con la misma facilidad que los promedios estadísticos alternativos de Maxwell, Boltzmann y Gibbs.[110]

Estados de la Mecánica Estadística.

Desde el punto de vista conceptual, los sistemas de equilibrio más simples son "sistemas aislados", sistemas de energía constante con composición fija y límites definidos. El aislamiento perfecto se puede idealizar mejor en teoría o computación eliminando completamente las interacciones de límites con las paredes físicas del contenedor considerando los límites periódicos. En tal sistema periódico, el momento lineal, así como la masa y la energía, se conserva. El momento angular no lo es. Dadas las condiciones de contorno y la energía, las dos primeras tareas de la mecánica estadística de equilibrio son:

- Identificar los microestados disponibles
- especificar las probabilidades de estado que proporcionan promedios de espacio de fase correspondientes a los promedios de tiempo. Comenzamos suponiendo que el sistema de interés es descrito por un Hamiltonianos $H(q, p)$.[110]

Esta es la única manera de abordar la mecánica estadística dada la limitación de tiempo de este formato de curso, pero el enfoque tiene tres graves inconvenientes: En

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

primer lugar, se aplica sólo a los gases de partículas que no interactúan. Segundo, pretende que los únicos estados cuánticos son estados energéticos propios. En tercer lugar, sugiere que un estado cuántico para, digamos, dos bosones idénticos toma la forma $CA(x1)CB(x2)$ "número de partículas 1 en el nivel A, número de partículas 2 en el nivel B", mientras que de hecho el sistema consistente en dos partículas está en el estado.[111]

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

Capítulo 2

Metodología

2.1. Detalles Computacionales

2.1.1. Hardware

Se hizo uso de una estación de trabajo (*WorkStation*), con un procesador E7 de 3.1 GH, con una memoria RAM de 64Gb, 03 discos duros de 01, 04 y 06TB, dos tarjetas aceleradoras de video, una GTX 980 con memoria dedicada de 4Gb y una Tesla K80 con memoria dedicada de 24 Gb.

2.1.2. Softwares

Gromacs 5.1.3

El programa GROMACS[a] (Groningen máquina para simulaciones químicas) es un paquete de dinámica molecular diseñado principalmente para las simulaciones de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. Fue desarrollado originalmente en el departamento de Biofísica y Química de la Universidad de Groningen, y ahora es mantenido por los contribuyentes de las universidades y centros de investigación en todo el mundo. GROMACS es uno de los paquetes más rápido y popular de software disponibles, y puede ejecutarse en los CPU así como las GPU incrementando su capacidad de paralelización masiva que le da la potencialidad de resolver sistemas cada vez mas grandes, de código abierto liberado bajo la licencia Publica general de GNU, a partir de la versión 4.6, GROMACS es liberado bajo la GNU Lesser general de Licencia pública.[112]

[a]Disponible en: *http://gromacs.org*

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

UCFS Chimera 1.6

El programa UCSF Chimera[b] (o simplemente Quimera) es un programa extensible para la visualización interactiva y análisis de estructuras moleculares y los datos relacionados, incluyendo mapas de densidad, ensamblajes supramoleculares, alineamiento de secuencias, resultados de acoplamiento, trayectorias, y conjuntos de conformación. Se pueden crear imágenes y películas de alta calidad. Quimera incluye documentación completa y se puede descargar de forma gratuita para uso académico. [113] La robustes del programa ayuda en el análisis de los archivos de la simulación de dinámica molecular realizadas en programas como GROMAC's

2.1.3. Servidores

Bases de datos NCBI

El sitio NCBI[c] (Centro Nacional para la Información Biotecnológica) ha creado bases de datos públicas. La NCBI realiza investigaciones sobre problemas biomédicos fundamentales a nivel molecular usando métodos matemáticos y computacionales. Mantiene colaboraciones con varios institutos de NIH, academias, industrias y otras agencias gubernamentales. Así mismo fomenta la comunicación científica patrocinando reuniones talleres y conferencias. Apoya la formación en investigación básica y aplicada en ingeniería computacional. También involucra a miembros de la comunidad científica internacional en investigación y capacitación en informática a través del programa de visitantes científicos, desarrolla, distribuye, apoya y coordina el acceso a una variedad de base de datos y software para comunidades científicas, médicas y finalmente desarrolla y promueve normas para base de datos de posición e intercambio de datos y nomenclatura biológica.

Base de datos PDB

El sitio PDB[d] (Protein Data Bank), es el banco de datos de proteínas (PDB), es una base de datos que contiene estructuras experimentalmente determinadas, muchas de estas estructuras tridimensionales de proteínas, ácidos nucleicos y otras macromoleculas biológicas, todas estas estructuras son en base a experimentos de rayos x y de resonancia magnética nuclear.[114] Los archivos contienen coordenadas

[b]Disponible en *https://www.cgl.ucsf.edu*

[c]Disponible en *http://www.ncbi.nlm.nih.gov/*

[d]Disponible en: *http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do*

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

atómicas citas de estructuras primarias, secundarias, datos expermientales de es- tructuras cristalograficas asi como hipervínculos a muchas otras bases de datos. El interés común compartido por esta comunidad es una necesidad de acceder infro- mación que pueda relacionar las funciones biológicas de las macromoleculas con sus estructuras tridimensionales.[115,116]

Robetta

El sitio Robetta[e], es un servidor de Internet que proporciona herramientas de pre- dicción y análisis de la estructura automatizados que pueden utilizarse para inferir información estructural de proteínas a partir de datos genómicos. El servidor utiliza el primer procedimiento de predicción de estructura completamente automatizado que produce un modelo de secuencia de la proteína completa en la presencia o au- sencia de homología de secuencia con la proteína de estructura conocida. Robetta analiza las secuencias de entrada en dominios y construye modelos para dominios con homología de secuencia con proteínas de estructura conocida utilizando el mo- delado comparativo, y los modelos para los dominios que carecen de dicha homología usando la estructura de novo método de predicción de Rosetta. predicciones de do- minio y las coordenadas moleculares de modelos que abarcan la consulta de larga duración se dan como resultados.[117]

PATCHDOCK

El servidor PATCHDOCK[f] es un algoritmo de docking basado en principios de complementaridad. Está dirigido a encontrar las transformaciones de acoplamiento molecular; cuando se dan dichas transformaciones se inducen áreas de interfaz an- chas como pequeñas cantidades de choques estéricos. La razón principal de la alta eficiencia de PATCHDOCK se debe a que es rápida en cuanto a la búsqueda de las transformaciones que es impulsada por la combinación de caracteres locales en lugar de la fuerza bruta en el espacio de transformación de seis dimensiones el cual acelera aún más el tiempo computacional mediante la utilización de estructuras de datos avanzados y técnicas de detección de patrones espaciales como el hash geo- métrico. Ideal para cualquier tipo de de moléculas como proteínas, ADN, péptidos y fármacos.[118]

[e]Disponible en *http://robetta.bakerlab.org/*
[f]Disponible en *https://bioinfo3d.cs.tau.ac.il/PatchDock/*

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM
UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

FIREDOCK

El método FireDock para el refinamiento flexible y la puntuación de las soluciones de acoplamiento de proteínas fue desarrollado por Andrusier et. al. El servidor web FireDock es el primer servidor web que aborda el problema de la flexibilidad de las proteínas en el acoplamiento y permite un refinamiento de alto rendimiento de los candidatos al acoplamiento. Debido a la alta eficiencia del algoritmo, permite el refinamiento online de un gran número de candidatos en tiempos de ejecución razonables, ayudándonos a predecir la estructura de complejos proteína-proteína.[119]

2.2. Metodología

2.2.1. Análisis de la estructura primaria de las proteínas

En el presente trabajo de investigación se utilizaron las bases de datos confiables NCBI (*National Center of Biotechnology Information*) y PDB (*Protein Data Bank*). En el primero se realizó una búsqueda de información de las proteínas de estudio, las cuales fueron las profilinas humanas y actina Humana.

En el servidor de NCBI, encontramos la secuencia aminoacídica en formato fasta para la Profilina I, como podemos observar en la figura2.1, el cual se recolectó bajo el código P07737.2

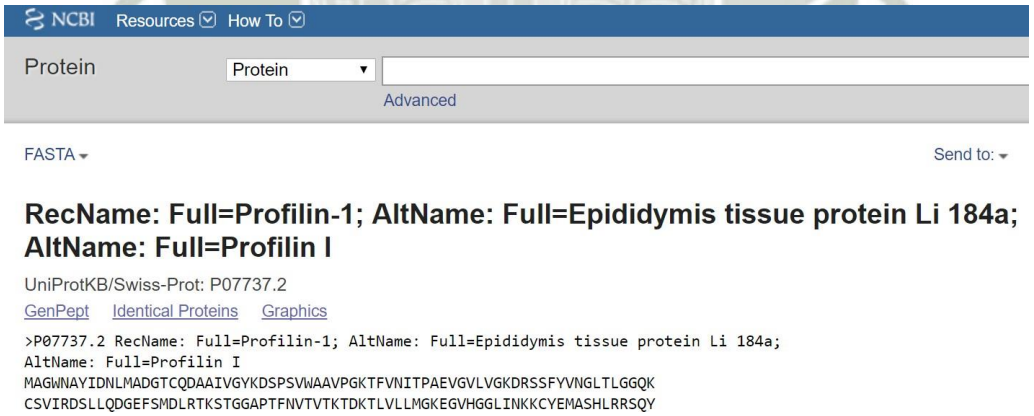


Figura 2.1: Obtención de secuencias de aminoácidos de la Profilina I a partir de la base de datos del NCBI

Del mismo modo, encontramos la secuencia aminoacídica en formato fasta para la Profilina II, como podemos observar en la figura2.2, el cual se recolectó bajo el código P35080.3

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM
UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

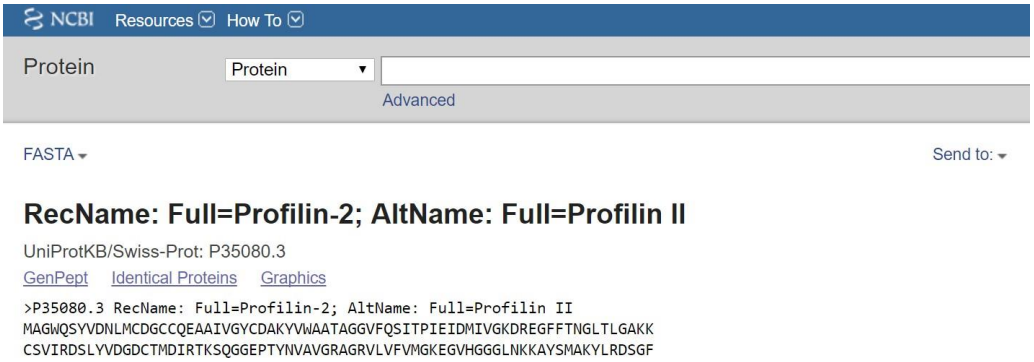


Figura 2.2: Obtención de secuencias de aminoácidos de la Profilina II a partir de la base de datos del NCBI

Por último, encontramos la secuencia aminoacídica en formato fasta para la actina Humana, como podemos observar en la figura2.3, el cual se recolectó bajo el código P60709.1

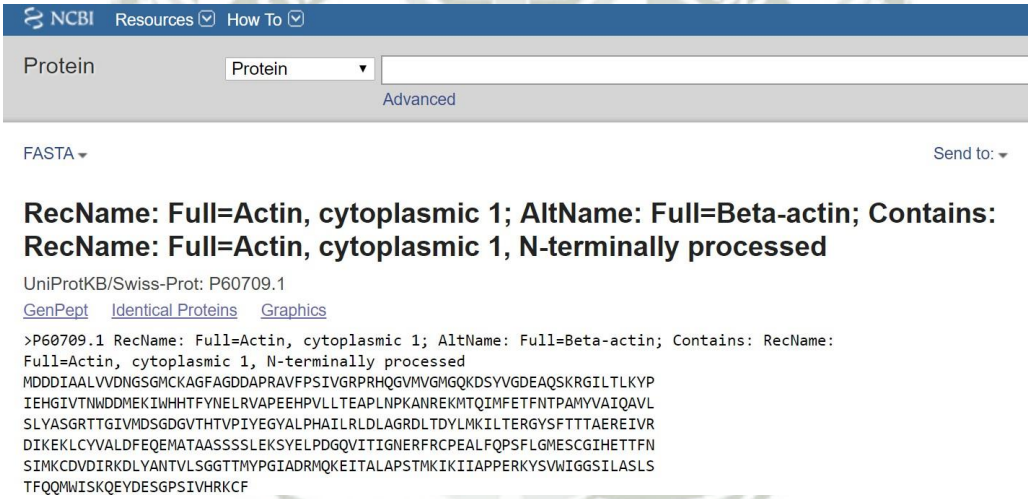


Figura 2.3: Obtención de secuencias de aminoácidos de la Actina Humana a partir de la base de datos del NCBI

La información que nos proveen los archivo de extensión fasta nos indica que en la primera línea se ubica el código de acceso, posteriormente se encuentra el conjunto de letras designadas a identificar los diferentes aminoácidos que corresponden a las estructuras de estudio.

2.2.2. Obtención de las estructuras terciarias

Para la obtención de las estructuras terciarias, se tomó en cuenta la técnica del modelado por homología, para ello se utilizaron las secuencias de proteínas, las cuales

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

fueron ingresadas bajo la extensión $*.fasta$ al servidor Robetta el cual funciona en línea y nos proporciona las herramientas de predicción y análisis de las estructuras que pueden utilizarse para inferir información estructural de proteínas a partir de datos genómicos, en el cual se obtuvieron las primeras predicciones de estructuras terciarias (3D), este sistema nos arrojó unos archivos de extensión $*.pdb$, este proceso nos ayudó a disminuir el tiempo de cálculo de simulación de dinámica molecular. Finalmente con un visualizador gráfico se pudo verificar la estructura tridimensional y los componentes que la conforman; láminas beta, alfas hélices y colas.

2.2.3. Minimización y optimización geométrica de estructuras proteicas.

Para la minimización se contó con las moléculas previamente analizados bajo la técnica del modelado por homología, siendo la profilina I, profilina II y actina huma- na, se procedió a dar inicio a la minimización considerando condiciones periódicas de contorno, para ello se usó el programa computacional Gromacs, con la finalidad de minimizar las fuerzas entre átomos de las estructuras y de este modo reducir las energías al mínimo para así aligerar las tensiones y colisiones sin que se afecten significativamente las estructuras. Esta optimización ayudó a la movilización de los átomos de un mínimo local sin que sea necesario buscar todas las posibles combi- naciones. En el momento de dar inicio al proceso de minimización se utilizó como entrada el archivo de extensión $*.pdb$ que obtuvimos del servidor Robetta; con la ayuda del comando pdb2gmx el cual viene integrado en el paquete de softwar de GROMACS, con la ayuda de éste comando se tomó el archivo $*.pdb$ y se generó dos ficheros, un $*.gro$ que nos indicó los átomos y coordenadas de la estructura x-y-z, así mismo obtuvimos un $*.top$ en donde nos describió las cargas, sus masas atómicas y enlaces de dichas moléculas en estudio. Después de haberse creado los archivos de topología se procedió a preparar el archivo $*.mdp$ el cual contiene parámetros necesarios para la optimización geométrica de nuestra estructura en estudio. En es- te fichero se incluye el algoritmo de integración $steepest - descent$, y un $emtol$ de valor 10 con el campo de fuerza $OP\ LS - AA$.[89–91] (Ver anexo 1). Con la ayuda del comando grompp que toma los ficheros $*.gro$, $*.top$ y $*.mdp$, se generó un fichero $*.tpr$ el cual es la entrada del comando mdrun; una vez obtenido dicho comando (quien es responsable de los desplazamientos de los átomos) se generó un fichero final $*.gro$ que contine el estado final de la solución.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

2.2.4. Dinámica Molecular de estructuras terciarias mediante ensamble canónico, NVT

Luego de minimizar las fuerzas y haber llegado a la conformación estructural con la mínima energía, se procedió a realizar la dinámica molecular, método que es bastante similar al de la optimización de la geometría que indicamos anteriormente. El cual nos dió información del proceso de la simulación de dinámica molecular considerando la posición y velocidad de las partículas de cada sistema en una trayectoria en nanosegundos. Para esta etapa con la ayuda del comando *ediconf* se generó una caja cúbica lo suficientemente grande como para contener a la molécula sin tener mayor dificultad y pueda moverse sin restricciones durante la simulación molecular. Luego se eligió el campo de fuerza $OP\ LS-AA$ mediante el comando *pdb*2*gmx*, y seguidamente se obtuvieron los archivos de topología que son: $*.top$, $*.gro$ e $*.itp$; los cuales nos indicarán los desplazamientos y las coordenadas así como las cargas, masa atómica y lo enlaces de nuestras diferentes estructuras. Después se generó el archivo $*.mdp$ el cual contine en ensamble canónico NVT (número de moles, volú- men y temperatura constante) se consideró dicho ensamble canónico porque tiene la finalidad de estabilizar las moléculas dentro de la caja cúbica sin verse altera- do el volumen, además se usó el algoritmo de Verlet el cual ayuda a la conservación de la energía total del sistema, un integrador de algoritmos de tipo salto-rana ($leap-frog$) que sirve para integrar las ecuaciones de movimiento de Newton, finalmente se consideró un tiempo de cálculo de 100*ns*. Luego con el uso del comando grompp que utiliza los archivos $*.gro$, $*.top$ y $*.mdp$ se generó el archivo necesario para la dinámica molecular el cual es el $*.tpr$. Final- mente con la ayuda del comando *mdrun* se da inicio a la simulación de la dinámica molecular de la estructura. Una vez concluida dicha simulación molecular se obtuvo los siguientes ficheros $*.xtc$, $*.edr$, $*.gro$ y $*.trr$; los cuales nos sirvieron para la determinación de las características moleculares de cada estructura.

2.2.5. Optimización molecular de cuatro modelos de filamento de actina

Se generaron cuatro modelos de complejos de actina, donde: El primer modelo corresponde a un dímero, el segundo a un tetrámero, el tercero a un hexámero y un cuarto modelo correspondiente a un octámero. Todos los modelos fueron diseñados en base a un modelo obtenido por cristalografía de rayos X (P60709.1). Finalmente

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

cada modelo fue optimizado mediante simulación de dinámica molecular en el pro- grama Gromacs con el campo de fuerza *OPLS−AA*[89–91] en ensamble canónico NVT (número de moles, volumen y temperatura constante), hasta llegar al equilibrio.

2.2.6. Acoplamiento molecular (filamento de actina – profilina I y II)

Con los modelos ya optimizados se hizo una predicción de los lugares más favorables de interacción de los diferentes modelos de filamentos de actina frente a los dos tipos de profilinas humanas mediante el servidor PATCHDOCK, el cual realiza la interacción de estructura de complejos proteína-proteína mediante tres pasos; en primer lugar realiza un cómputo de la superficie molecular de la estructura dada; seguidamente detecta los "parches" geométricos utilizando algoritmos; y por último actúa filtrando cada parche geométricamente dándole una puntuación con la cual se obtuvo la mejor interacción entre proteína-proteína o proteína-molécula. Por lo que dicho servidor se tomó en consideración debido a su alta eficiencia en la búsqueda de las transformaciones. Finalmente para nuestro trabajo se tomó en concideranción los modelos de menor energía de interacción.

2.2.7. Validación de Estructuras

Para la validación de las estructuras proteicas se usó el ploteo de Ramachandran con la finalidad de verificar si los modelos moleculares existen en la naturaleza, este método se basa en el uso de modelos bioinformáticos de proteínas los cuales varían sistemáticamente los ángulos φ y ψ con el objetivo de encontrar conformaciones estables. Para cada conformación, se examinó la estructura de las interacciones proteicas para establecer contactos estrechos entre los átomos.

Con las topologías finales de la simulación de la dinámica molecular se estudiaron los ploteos de energía total de las estructuras. Para ello se usaron algunos descriptores moleculares como son: RMSD, el cual compara dos estructuras mediante el cálculo de la raíz cuadrada media de la desviación y los RMSF que calculan la raíz cuadrada de fluctuación, es decir, la desviación estándar de las posiciones atómicas en la trayectoria, estos descriptores vienen incluidos en el paquete de Gromacs. Ambos archivos fueron revisados con el visualizador Xmgrace.

Finalmente se tomó en cuenta los datos proporcionados por el servidor PATCH- DOCK para el análisis de la predicción más favorable entre los diferentes modelos

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

de filamentos de actina y las profilinas humanas.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

Capítulo 3

Resultados y Discusión

3.1. Obtención de las secuencias

Las secuencias de aminoácidos de las profilinas humanas I y II se muestran en la Tabla3.1en el cual se presentan los códigos de acceso, el número de aminoácidos y su correspondiente secuencia de aminoácidos. Los niveles de profilina I y II tienen efectos dramáticamente diferentes en la organización de la actina en el citoesqueleto, lo cual afecta la migración celular. [120]

Tabla 3.1: Secuencia de Aminoácidos de la Profilina Humana I y II

Código	Nom. Científico	AA	Secuencia de aminoácidos
P07737.2	PROF1_HUMAN	140	MAGWNAYIDNLMADGTCQDAAIVGYKD SPSVWAAVPGKTFVNITPAEVGVLVGKD RSSFYVNGLTLGGQKCSVIRDSLLQDGEF SMDLRTKSTGGAPTFNVTVTKTDKTLVL LMGKEGVHGGLINKKCYEMASHLRRSQY
P35080.3	PROF2_HUMAN	140	MAGWQSYVDNLMCDGCCQEAAIVGYCD AKYVWAATAGGVFQSITPIEIDMIVGKDR EGFFTNGLTLGAKKCSVIRDSLYVDGDCT MDIRTKSQGGEPTYNVAVGRAGRVLVFV MGKEGVHGGGLNKKAYSMAKYLRDSGF

La profilina II, se une a la actina y afecta la estructura del citoesqueleto, las altas concentraciones de profilina II previene la polimerización de la actina, así mismo al unirse a PIP2, inhibe la formación de IP3 y DG. Por otro lado en procesos experimentales se ha encontrado que tiene una afinidad cinco veces menor para la actina en comparación con la profilina I.[121]

De forma similar, las secuencias de aminoácidos de la actina humana se muestran en la Tabla 3.2 en el cual se presentan los códigos de acceso, el número de aminoácidos

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM
UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

y su correspondiente secuencia de aminoácidos.

Tabla 3.2: Secuencia de Aminoácidos de la Actina

Código	Nom. Científico	AA	Secuencia de aminoácidos
P60709.1	ACTB_HUMAN	375	MDDDIAALVVDNGSGMCKAGFAGDDA PRAVFPSIVGRPRHQGVMVGMGQKDS YVGDEAQSKRGILTLKYPIEHGIVTN WDDMEKIWHHTFYNELRVAPEEHPVLL TEAPLNPKANREKMTQIMFETFNTPAM YVAIQAVLSLYASGRTTGIVMDSGDGV THTVPIYEGYALPHAILRLDLAGRDLT DYLMKILTERGYSFTTTAEREIVRDIK EKLCYVALDFEQEMATAASSSSLEKSYE LPDGQVITIGNERFRCPEALFQPSFLGM ESCGIHETTFNSIMKCDVDIRKDLYANT VLSGGTTMYPGIADRMQKEITALAPSTM KIKIIAPPERKYSVWIGGSILASLSTFQ QMWISKQEYDESGPSIVHRKCF

Finalmente la actina, en vertebrados se ha identificado 3 grupos principales de isoformas de actina, alfa, beta y gamma. Las actinas alfa se encuentran en los tejidos musculares y son un componente importante del aparato contráctil. Las actinas beta y gamma coexisten en la mayoría de los tipos celulares como componentes del citoesqueleto y como mediadores de la motilidad celular interna.

3.2. Obtención de estructuras terciarias

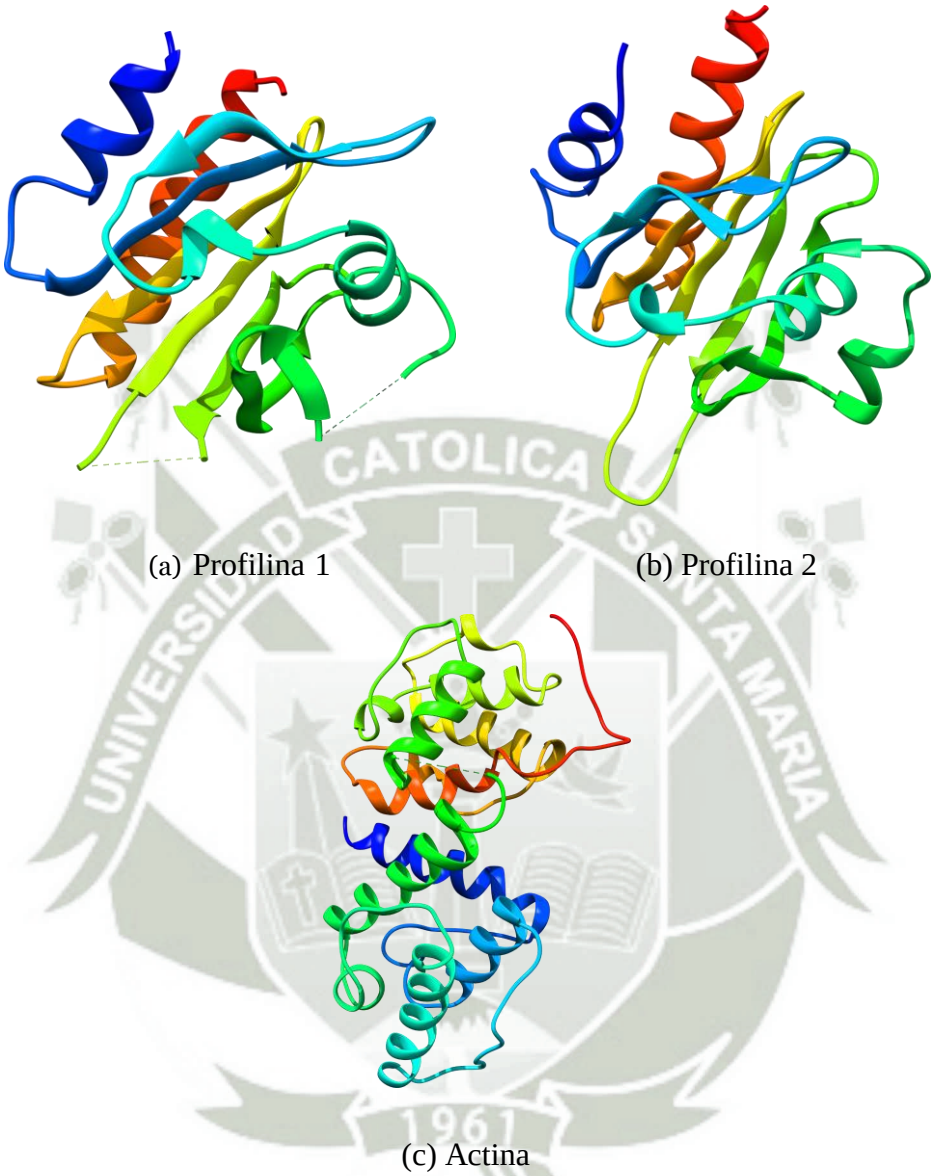
Cuando se indagó en los distintos servidores como el Protein Data Bank, se pudo encontrar las estructuras para la profilina I y II, así como para la actina humana. En el caso de la profilina I, se observa en los reportes que algunos aminoácidos no se hallan presentes en la estructura de la proteína. Sin embargo, para la profilina II, aunque la estructura se halla completa, se han utilizado agentes cristalizantes. Por tanto, su naturaleza en ambos casos, no corresponde a la estructura en fase liquida. Ambas estructuras se muestran en la Figura3.1, para el caso de la profilina I, se la encontró con el código 4X1L, fuente del organismo: Homo sapiens, el método por el cual se extrajo fue por difracción por rayos X obteniéndose una resolución de 2,16 A°, realizado en el año 2015 en el mes de junio. En el caso de la profilina II con el código 1D1J, de la misma forma fue obtenida del homo sapiens, utilizando el método experimental mediante el cual se realizó fue la difracción por rayos X; obteniéndose una resolución de 2,2 A°, realizado en el año 2000 en el mes de diciembre. Y bajo el código 6ANU para la actina humana, la fuente del organismo para esta proteína

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

también fue el Homo sapiens, y el método experimental que se utilizó en este caso fue el de Microscopía Electrónica, obteniéndose una resolución de 7 A˚, realizado en el año 2017 en el mes de agosto.



(a) Profilina 1 (b) Profilina 2

(c) Actina

Figura 3.1: Estructuras Secundarias de la Profilina I, Profilina II y Actina a partir de experimentos de Rayos-X

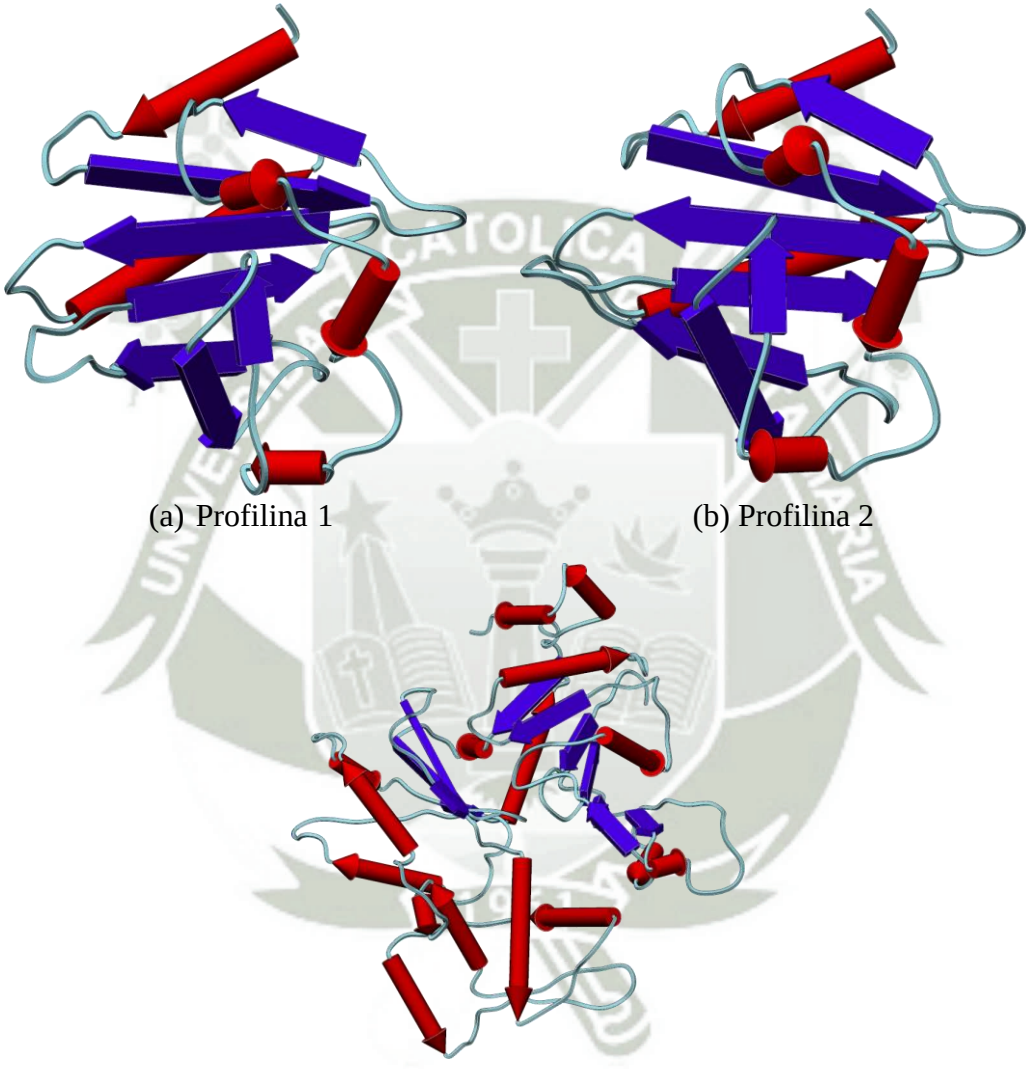
Para acortar los tiempos de cálculo se hizo en un inicio la búsqueda de una estructura tridimensional parecida a las reportadas experimentalmente, para ello se hizo uso de la metodología de la predicción por homología mediante el servidor Robetta, así mismo es importante saber que aparte de este servidor existen otros que nos podrían ayudar a la predicción de las estructuras tridimensionales, tal es el caso del servidor Hhpred, que puede detectar con mayor velocidad proteínas homólogas remotas y por ende su predicción, otro es el caso de Swiss-Model que se usa con

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

el mismo fin, enfocándose en una secuencia de aminoácidos que es sometido a la construcción de su modelo 3D en una plantilla objetivo diseñada por el usuario y otro servidor de predicción que es el LOMETS, que es un subprocesador local para predicciones rápidas y automatizadas de estructuras terciarias de proteínas. Sin embargo, para los estudios en mención se usó el servidor Robetta debido a su gran utilidad y practicidad, haciendo el cálculo a partir de dominios iniciales de proteínas, prediciendo así estructuras tridimensionales como podemos observar en la Figura3.2.



(a) Profilina 1 (b) Profilina 2

(c) Actina

Figura 3.2: Estructuras Secundarias de la Profilina I, Profilina II y Actina, a partir del servidor Robetta.

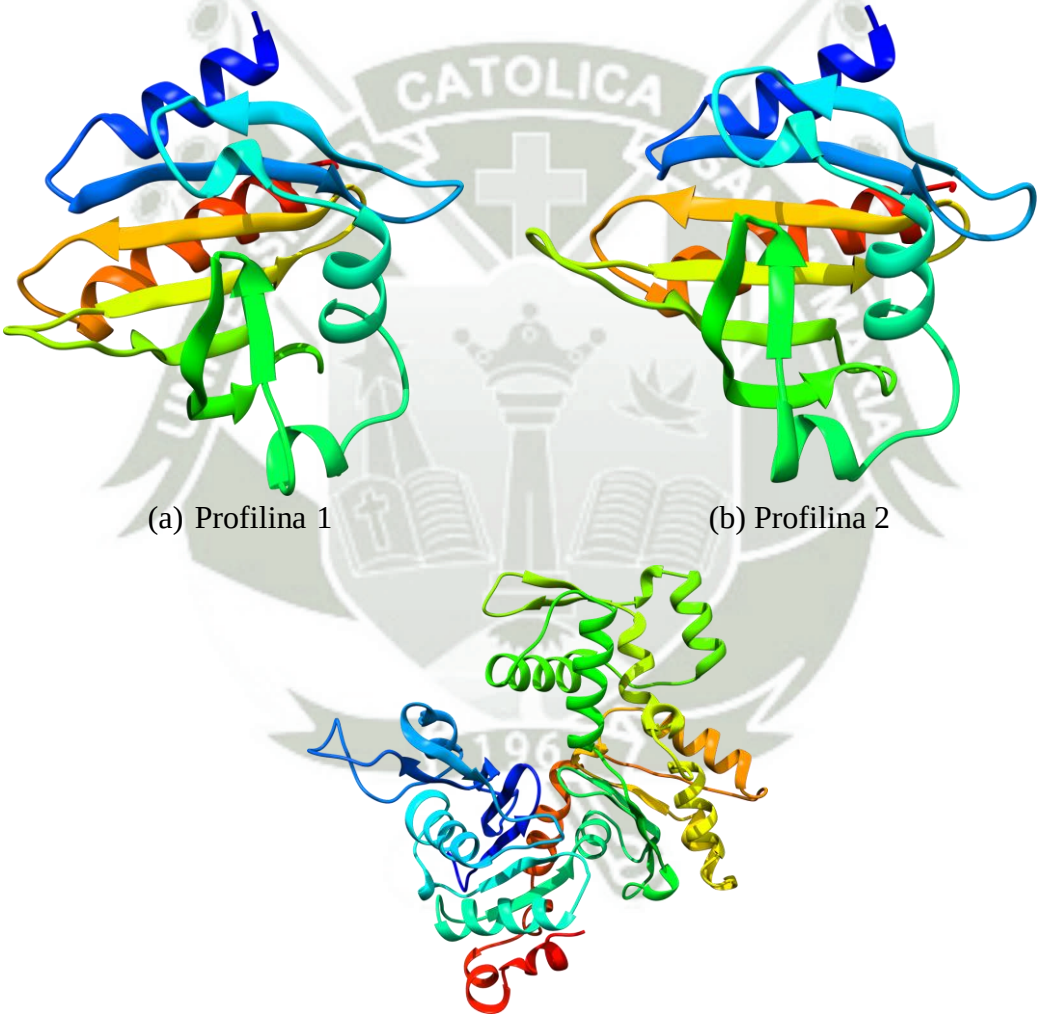
Con ello es que pudimos obtener 5 modelos de predicción para las tres proteínas de estudio (Profilina I, Profilina II y Actina), de cada estructura sometida al sistema, se tomó en consideración para los cálculos al primer modelo, podemos observar que

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

en las imágenes Figura3.2(a), Figura3.2(b)y Figura3.2(c)se puede apreciar la presentación de bastones y cintas, donde: las alfas hélices están representadas por los bastones de color rojo y las láminas beta de color azul. Aquí podemos ver que la conformación estructural se da por la presencia de siete láminas beta, las cuales son las que les da mayor estabilidad a estas estructuras y soportar condiciones de pH y temperaturas altas, teniendo en cuenta que al existir muchas láminas beta está relacionado directamente con la formación de puentes de hidrógeno. Para el caso de la actina se observa que presentan más colas, también denominados sitios alostéricos los cuales juega un papel crucial en muchos procesos biológicos fundamentales, entre los que se incluyen la señalización celular y la regulación del metabolismo.



(a) Profilina 1 (b) Profilina 2

(c) Actina

Figura 3.3: Estructuras Secundarias de la Profilina I, Profilina II y Actina, que usamos para nuestro presente estudio.

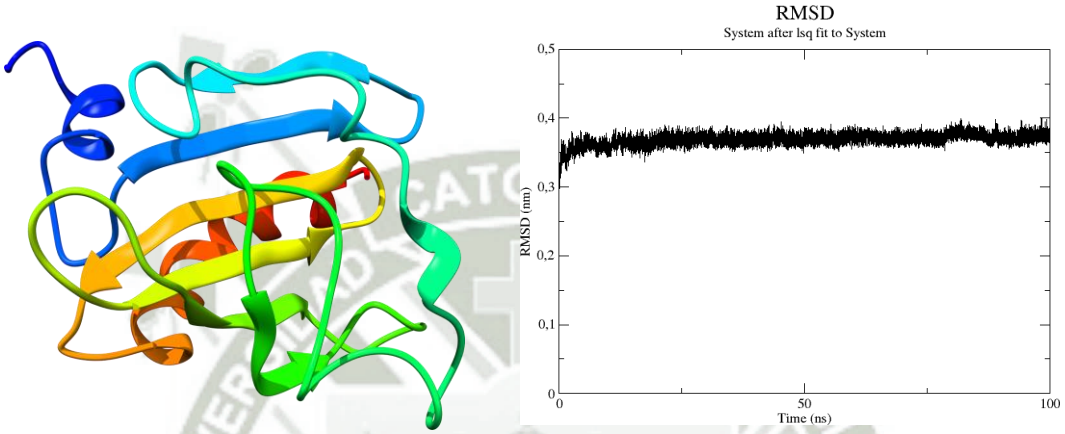
Es claro que, las estructuras predichas por los servidores o diversos programas, no son las estructuras reales, debido a que estas se logran mediante métodos es-

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

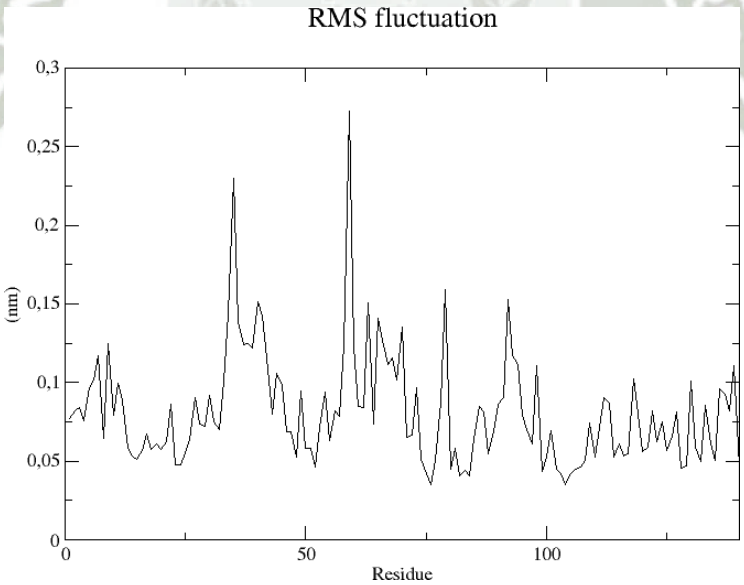
REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

tocásticos para predecir la estructura secundaria, y normalmente están asociadas a datos experimentales extraídos en fase de cristal, por lo que para lograr la estructura terciaria (fase activa) de la proteína, deberemos realizar un proceso de minimización de las fuerzas, seguido de un proceso de simulación de dinámica molecular (método determinístico). En cualquier caso, es realmente necesario visualizar adecuadamente la proteína de inicio, y esto lo observamos en la Figura3.3Los procesos de simulación de dinámica molecular se realizaron considerando solvente implícito, así mismo estos cálculos fueron realizados a temperatura fisiológica (36.5˚C).



(a) Estructura Final (b) RMSD



(c) RMSF

Figura 3.4: Estructura Final, Raíz de la Desviación Media Cuadrática (RMSD) y la Raíz de la Fluctuación Media Cuadrática por residuos (RMSF) para la Profilina I.

En la Figura3.4(a), podemos observar la estructura final de la Profilina I, después de una simulación de dinámica molecular de 100ns. Así mismo, en la Figura3.4(b) se presenta la raíz cuadrada de la desviación media estándar, la cual nos indica que se ha

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

llegado al equilibrio rápidamente, aproximadamente después de los 5ns posteriores al inicio de la simulación molecular. El rango recomendado en la literatura para indicar que nos hallamos en el equilibrio es de 0.2nm, como variación, en nuestro caso de la profilina I, podemos ver que se halla entre 0.32nm – 0.39nm; lo cual nos da una variación de 0.07nm, completamente dentro del rango recomendado para sistemas biológicos. Adicionalmente, se presenta la raíz cuadrada de la fluctuación media estándar (ver Figura3.4(c)), de la cual se desprende que, los residuos aunque se mueven durante la simulación de dinámica molecular, ellos se encuentran dentro del rango adecuado de 0.2nm, pero los centros o residuos que más contribuyen al movimiento son los que se hallan entre 30 – 45 aminoácidos y del 60 – 70 aminoácidos.

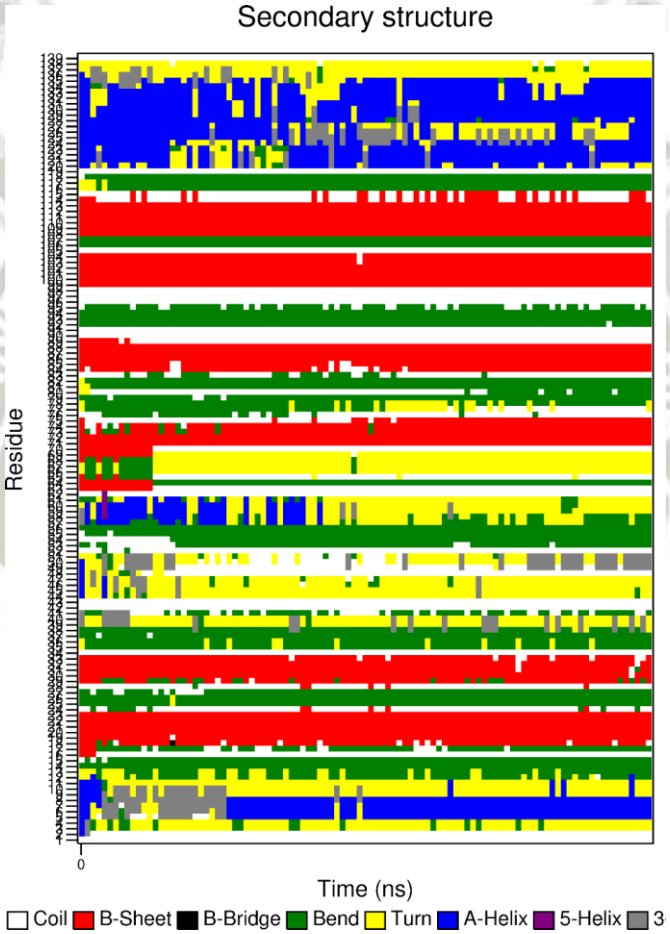


Figura 3.5: Evolución de la estructura secundaria durante el tiempo de simulación de dinámica molecular para la Profilina I.

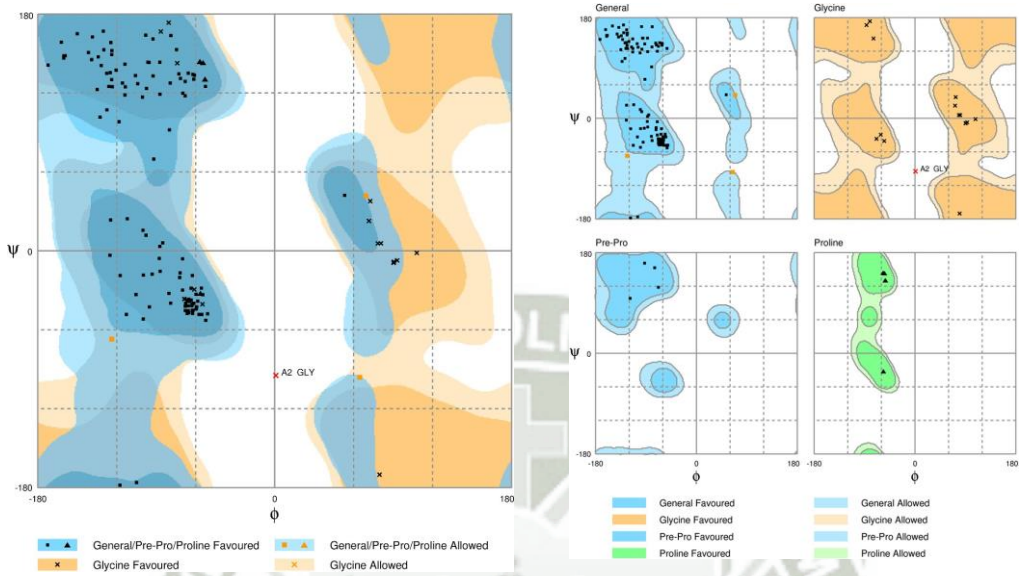
Mediante el programa DSSP (Databases of Secondary Structure Program) inte- grado en Gromac's, podemos analizar el comportamiento de la estructura secundaria de la proteína o resto protéico de interés, por tanto en la Figura 3.5 presentamos la evolución de la estructura secundaria, durante el proceso de simulación de diná-

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

mica molecular, de la cual se desprende claramente que en la zona de los primeros aminoácidos se logra predecir la formación de α-hélice, las regiones de los 62 a 65 aminoácidos se pierde una hoja-β, pero el resto de sistemas se conservan. La conservación de la estructura secundaria, no conduce a pensar que hemos realmente llegado al equilibrio, y que estamos frente a la proteína en su estructura terciaria.



(a) Ramachandran General (b) Ramachandran Desglosado

Figura 3.6: Diagrama de Ramachandran, para la Profilina I, tanto general como desglosado.

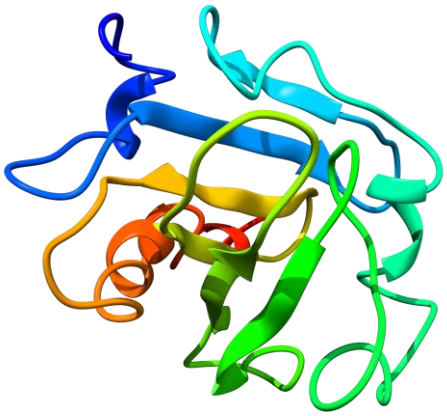
Para comprobar si estamos con una proteína en su fase de estructura terciaria, es necesario corroborarlo mediante los diagramas de Ramachandran, los cuales en el caso de la Profilina I se presentan en la Figura3.6, En el diagrama general (ver Figura3.6(a)), de Ramachandran, podemos observar que el 97.1 % de los residuos que equivale a 133 se hallan en regiones favorecidas, y un 2.2 % de residuos que son un total de 3 residuos se hallan en la región permitida, lo que hace un total de % equivalente a 136 residuos, solamente 1 residuo se halla fuera de las zonas indicadas lo cual equivale a un 0.7 %, esto nos garantiza que nos hallamos frente a una estructura en su fase de estructura terciaria. En la Figura3.6(b), observamos el desglosado del diagrama de Ramachandran, y vemos claramente que es la glicina la que se encuentra fuera de la región favorecida o permitida. Para las pre-prolinas y prolinas todos se hallan en las regiones correspondientes.

Para el caso de la Profilina II, al igual que en el caso anterior se realizó una simulación de dinámica molecular de 100ns, la estructura final la podemos observar en la Figura3.7(a).

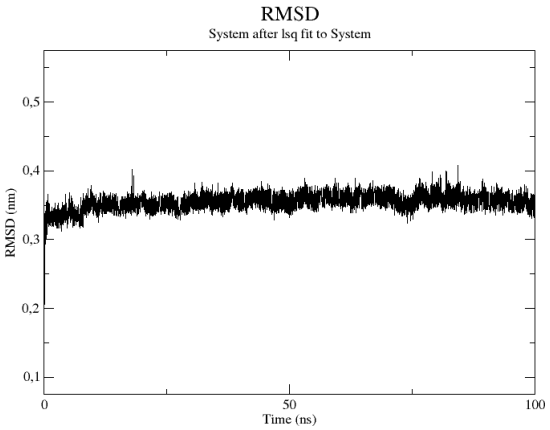
Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

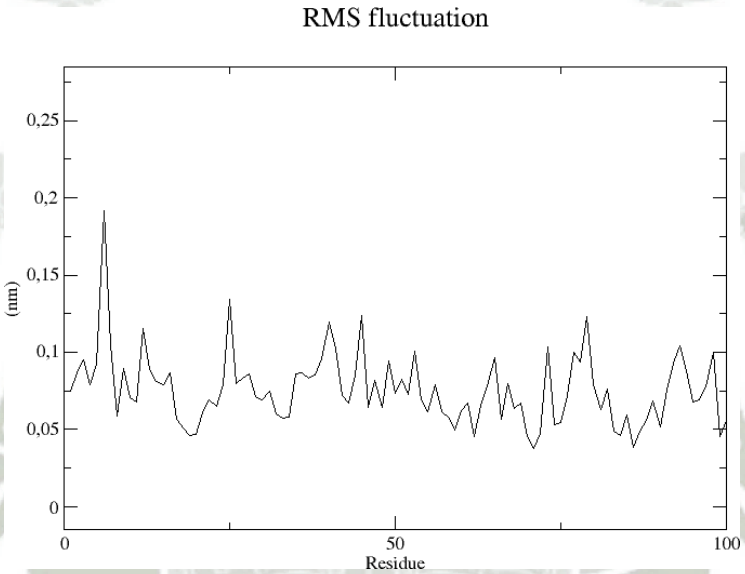
UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA



(a) Estructura Final



(b) RMSD



(c) RMSF

Figura 3.7: Estructura Final, Raíz de la Desviación Media Cuadrática (RMSD) y la Raíz de la Fluctuación Media Cuadrática por residuos (RMSF) para la Profilina II.

En términos generales ha mantenido su estructura secundaria, se ha llegado rápidamente al equilibrio, esto se deriva desde el gráfico del RSMD (ver Figura3.7(b)), que aproximadamente a los 2ns, se estabiliza la proteína, poseyendo una variación no mayor a 0.1nm en casi toda la trayectoria de la simulación molecular, así mismo podemos apreciar en el RMSF donde la variación no es mayor de 0.15nm y es el gru- po de aminoácidos iniciales los que contribuyen a la fluctuación fundamentalmente (ver Figura3.7(c)).

Respecto a la evolución de la estructura secundaria durante la simulación de dinámica molecular, como se aprecia en la Figura3.8, al inicio de la estructura se pierde una sección de α-hélice pero vuelve a resolverse al final de la simulación, pero lo realmente interesante es la aparición de puentes-β, en general las hojas-β se

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

conservan completamente durante la trayectoria.

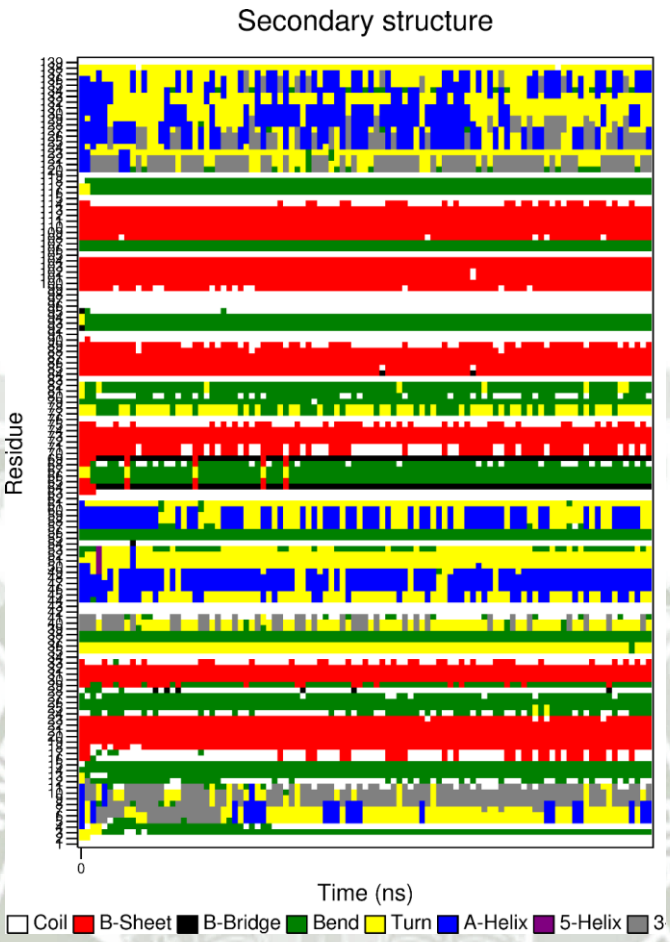


Figura 3.8: Evolución de la estructura secundaria durante el tiempo de simulación de dinámica molecular para la Profilina II.

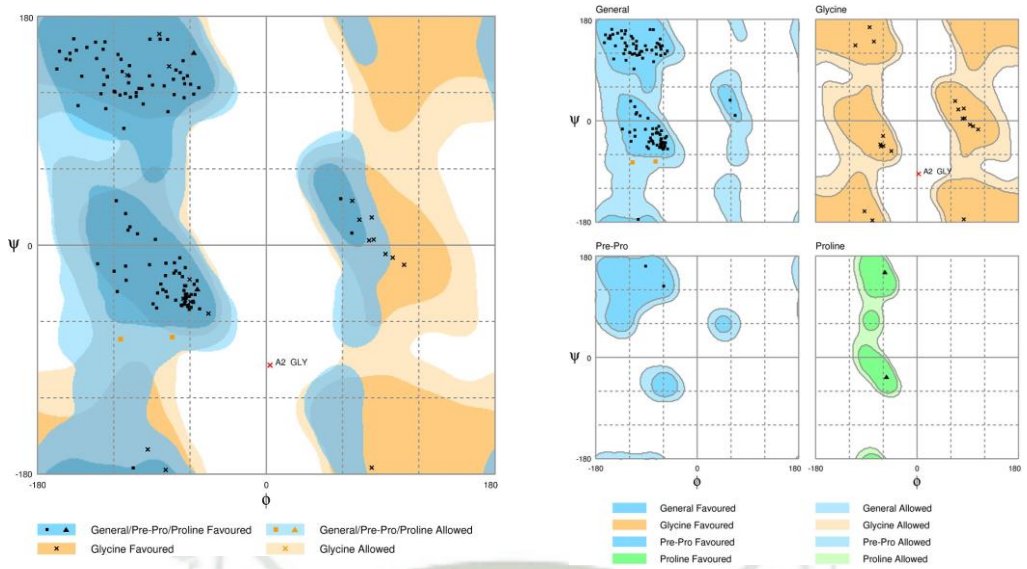
En la región final, podemos observar una pérdida de α-hélice aparente, pero al final encontramos dos secciones de ellas entrecortadas con una cuerda, lo que nos puede sugerir que, con un mayor tiempo de evolución, esta región pueda ser recupe- rada completamente. Las hojas-β, se conservan durante el proceso de la simulación de dinámica molecular, aunque en general las curvaturas o doblamientos en la pro- teína se incrementen respecto a la estructura inicial, otro elemento curioso es el ver que entre los 30 a 70ns, la estructura experimenta un incremento de α-hélices, en la región terminal, cosa que luego se pierde pero dejando regiones definidas.

Del análisis de Ramachandran para la Profilina II, considerando la estructura final promedio, en la Figura3.9(a), se muestra el análisis general, donde podemos apreciar que solamente un aminoácido se halla fuera de las regiones favorecidas o permitidas, lo que corresponde únicamente al 0.7 % de un total de 137 aminoácidos o residuos.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA



(a) Ramachandran General (b) Ramachandran Desglosado

Figura 3.9: Diagrama de Ramachandran, para la Profilina II, tanto general como desglosado

En la Figura3.9(b), mostramos el desglosado respecto a las glicinas, prolinas y pre-prolinas, encontrando que el único aminoácido fuera de las regiones permitidas o favorecidas corresponde a una glicina.

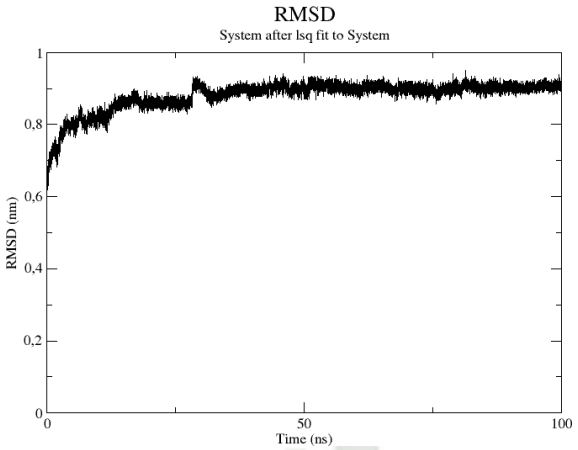
Por último, se procedió a obtener la estructura de equilibrio para la actina humana, la cual, al igual que los casos anteriores fue sometida a una evolución temporal o determinística mediante una simulación de dinámica molecular de 100ns, cuyos resultados se presentan en la Figura3.10. De la estructura final (ver Figura3.10(a)), se aprecia rápidamente a simple vista, que las hojas-β se han conservado durante la simulación de dinámica molecular, y un aparente proceso de compresión estructural. En la Figura3.10(b), observamos que al igual que en los casos anteriores, la actina humana, logra alcanzar el equilibrio tempranamente, esto aproximadamente a los 10ns, y desde este punto hasta el final de la simulación de dinámica molecular, tenemos una variación no mayor a 0.05nm, como se aprecia en la gráfica. Para poder poseer información de los residuos que más movilidad presentaron durante la simulación de dinámica molecular, realizamos la gráfica del RMSF para la actina humana (ver Figura3.10(c)), presentando dos regiones de amplia movilidad, como es de los 220 a 250 aminoácidos, y la de 350 a 400 aminoácidos.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

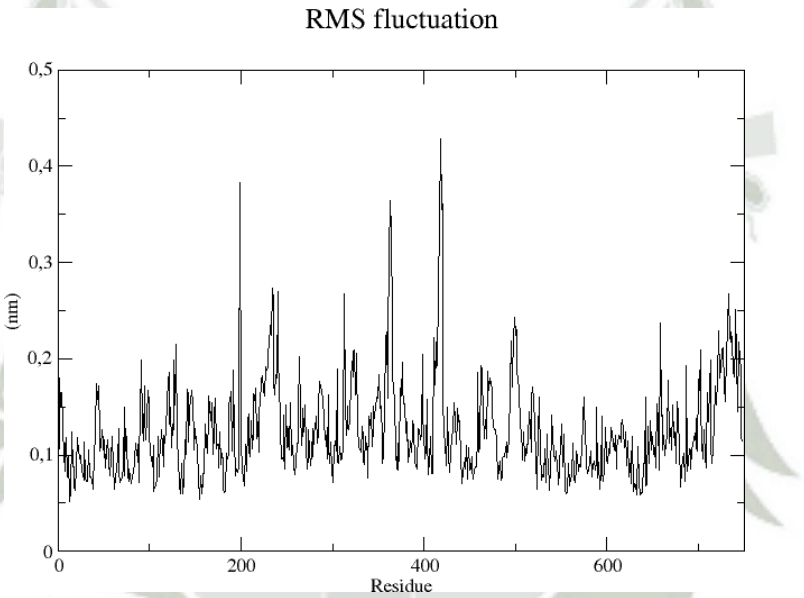
REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

(a) Estructura Final



(b) RMSD



(c) RMSF

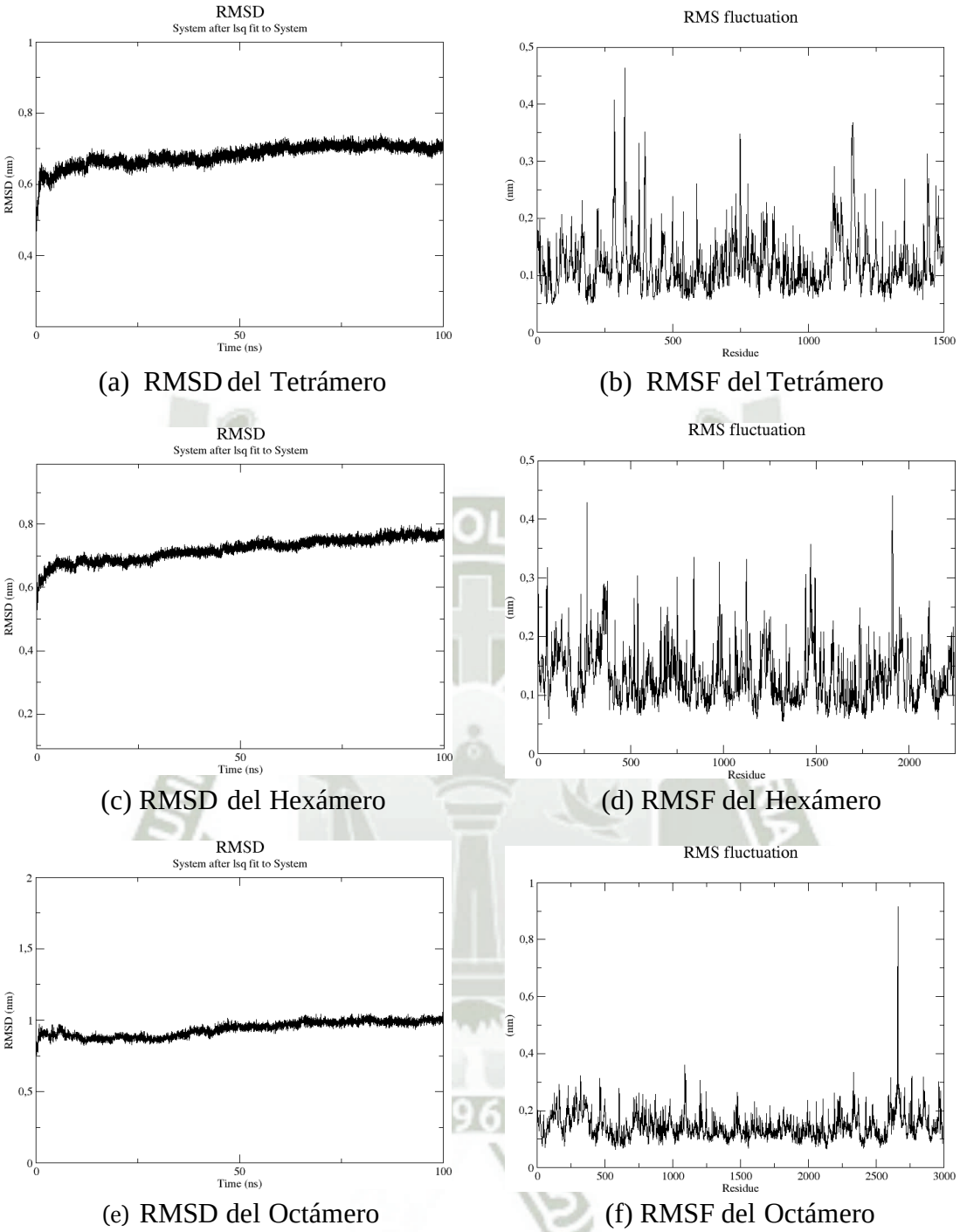
Figura 3.10: Estructura Final, Raíz de la Desviación Media Cuadrática (RMSD) y la Raíz de la Fluctuación Media Cuadrática por residuos (RMSF) para la Actina Humana.

En la Figura3.11, presentamos los RMDS y RMSF de las estructuras de los tetrámeros, hexámeros y octámeros de la actina humana. Podemos observar que, en los tres casos, el RMSD se halla dentro de los valores tolerables para procesos biológicos, pero en el caso del RMSF, para el tetrámero observamos una amplia fluctuación entre los residuos 300 al 400, como del 1100 al 1300, para el hexámero observamos múltiples fluctuaciones, pero por nada que altere la estructura general, en el caso del octámero, se presentó fluctuaciones mayores entre los residuos 2600 al 2750.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA



(a) RMSD del Tetrámero (b) RMSF del Tetrámero

(c) RMSD del Hexámero (d) RMSF del Hexámero

(e) RMSD del Octámero (f) RMSF del Octámero

Figura 3.11: Raíz de la Desviación Media Cuadrática (RMSD) y la Raíz de la Fluctuación Media Cuadrática por residuos (RMSF) para el Tetrámero, hexámero y octámero de la Actina Humana.

Para poder apoyar nuestras observaciones, procedimos a graficar la evolución de la estructura secundaria durante la trayectoria de la simulación de dinámica molecular, la cual se presenta en la Figura3.12, de la cual podemos ver que las hojas- β, se ha conservado e incluso incrementado desde las predicciones de los servidores en línea y de los programas que realizan dichas predicciones, en sus diversos algoritmos.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

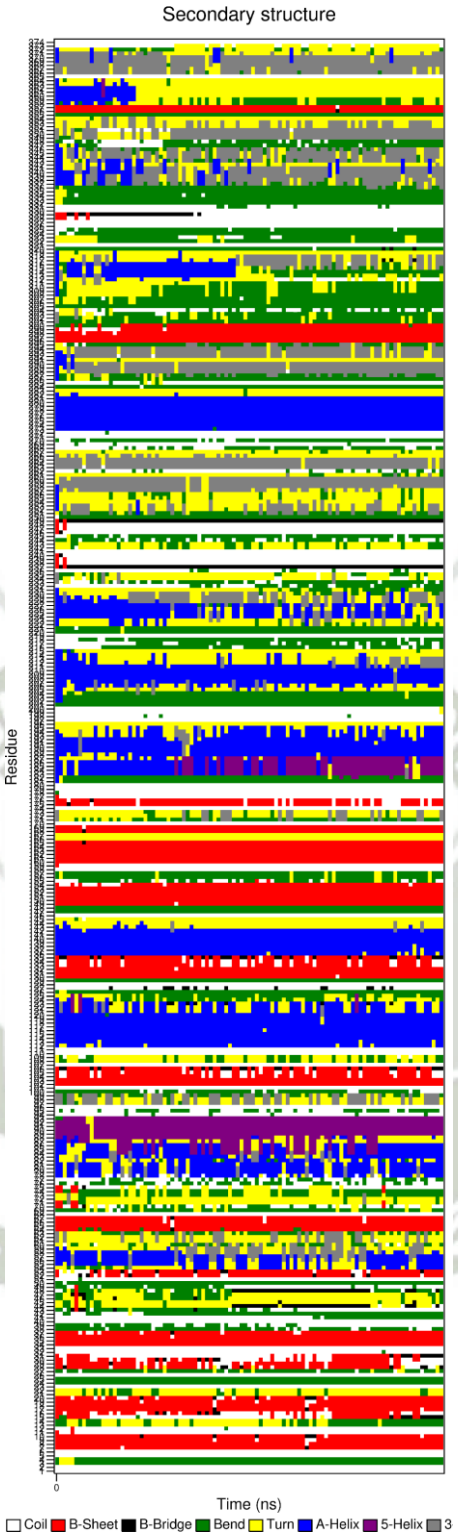


Figura 3.12: Evolución de la estructura secundaria durante el tiempo de simulación de dinámica molecular para la Actina Humana.

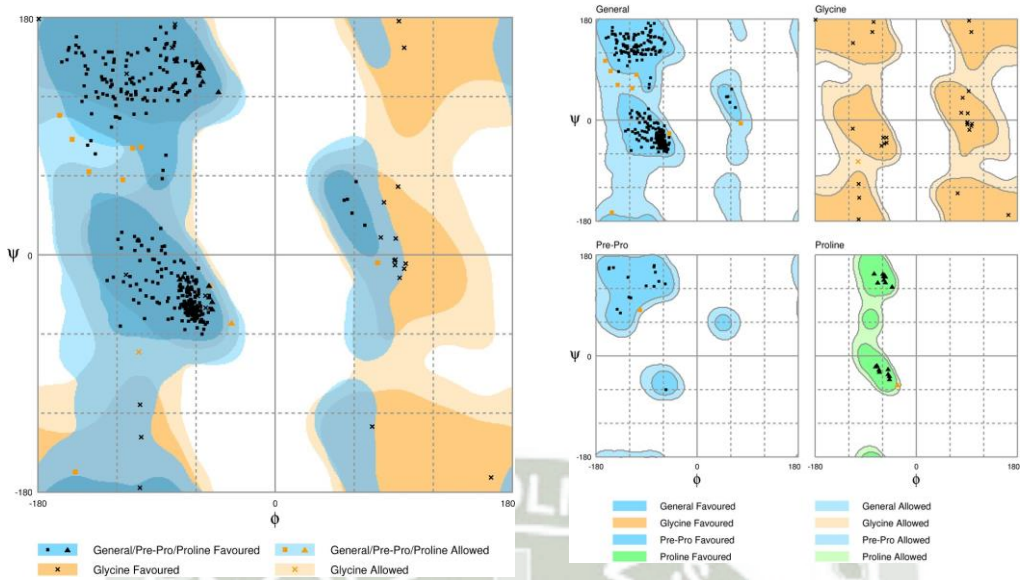
Incluso vemos que puede predecir la aparición de puentes entre las hojas-β, lo que conduce a estructuras más estables, lo que podemos también observar es que perdemos tres regiones que se predecían como α-hélice, pero que después de llegar

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

al equilibrio y nanosegundos adicionales estos se pierden, en la región terminal de la actina humana.



(a) Ramachandran General (b) Ramachandran Desglosado

Figura 3.13: Diagrama de Ramachandran, para la Actina Humana, tanto general como desglosado.

En la Figura3.13 se presentan el análisis general y desglosado de Ramachandran para la actina humana, es así que tenemos que aproximadamente el 97 % de los residuos se hallan en las zonas favorecidas lo cual equivale a un total de 361 aminoácidos, y aproximadamente el 3 % de los residuos se hallan en las zonas permitidas, lo cual es equivalente a un total de 11 aminoácidos, y no tenemos ningún residuo fuera de las zonas permitidas o favorecidas. Esto corrobora por qué se ha llegado tan rápidamente a la región de equilibrio durante la simulación de dinámica molecular a la cual fue sometida la estructura.

Para el caso tanto de Profilina I, Profilina II y la Actina Humana, se ha podido determinar una estructura terciaria, o activa, la cual debe ser analizada desde la superficie hidrofóbica y de la superficie de potencial electrostático.

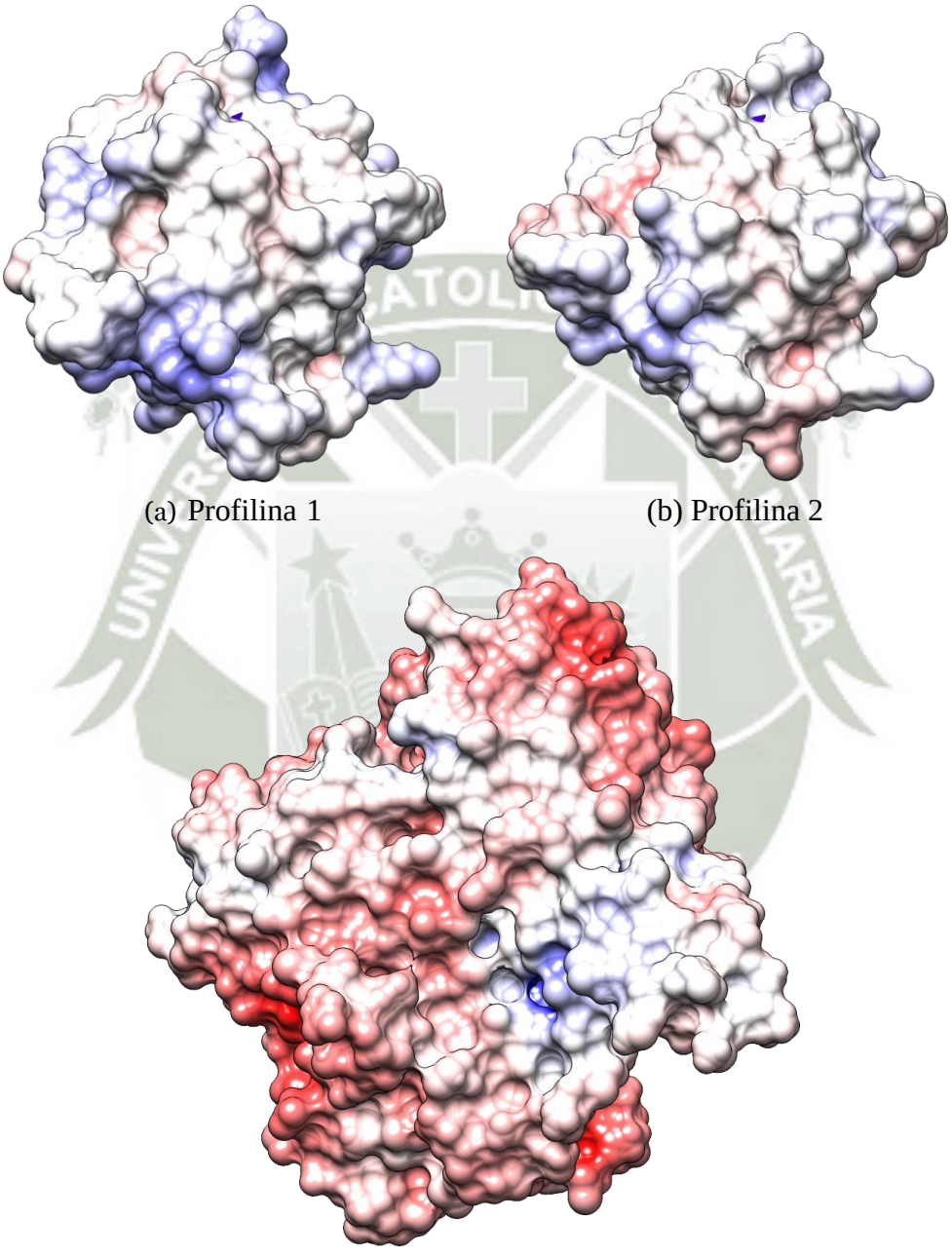
Cuando se realiza la gráfica de la superficie hidrofóbica sobre las estructuras en la fase de equilibrio, tal como se presenta en la Figura3.14, podemos observar que en el caso de las dos profilinas, estas se hallan con una amplia región hidrofóbica sobre las caras laterales mientras que en la zona o región inferior presenta una aparente región hidrofílica, mientras que para el caso de la actina, ella presenta una amplia región hidrofílica y pocas regiones hidrofóbicas, lo que nos conduce a la probabilidad Coulómbica de una aglomeración u polimerización de esta proteína. De esta forma, si es que se lograra estabilizar los agregados de actina, las profilinas tanto

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

I como II, potencialmente podrían ser acopladas a las zonas terminales, debido a la acumulación de zonas o regiones hidrofílicas dentro del complejo. Ahora bien, aunque las superficies hidrofóbicas son ampliamente usadas, debido a una aproximación empírica de los residuos que presenta expuesta la estructura en su potencial fase o estructura terciaria o activa, es importante corroborar esto mediante el cálculo de la superficie del potencial electrostático.



(a) Profilina 1 (b) Profilina 2

(c) Actina

Figura 3.14: Superficie Hidrofóbica de la Profilina I, Profilina II y Actina.

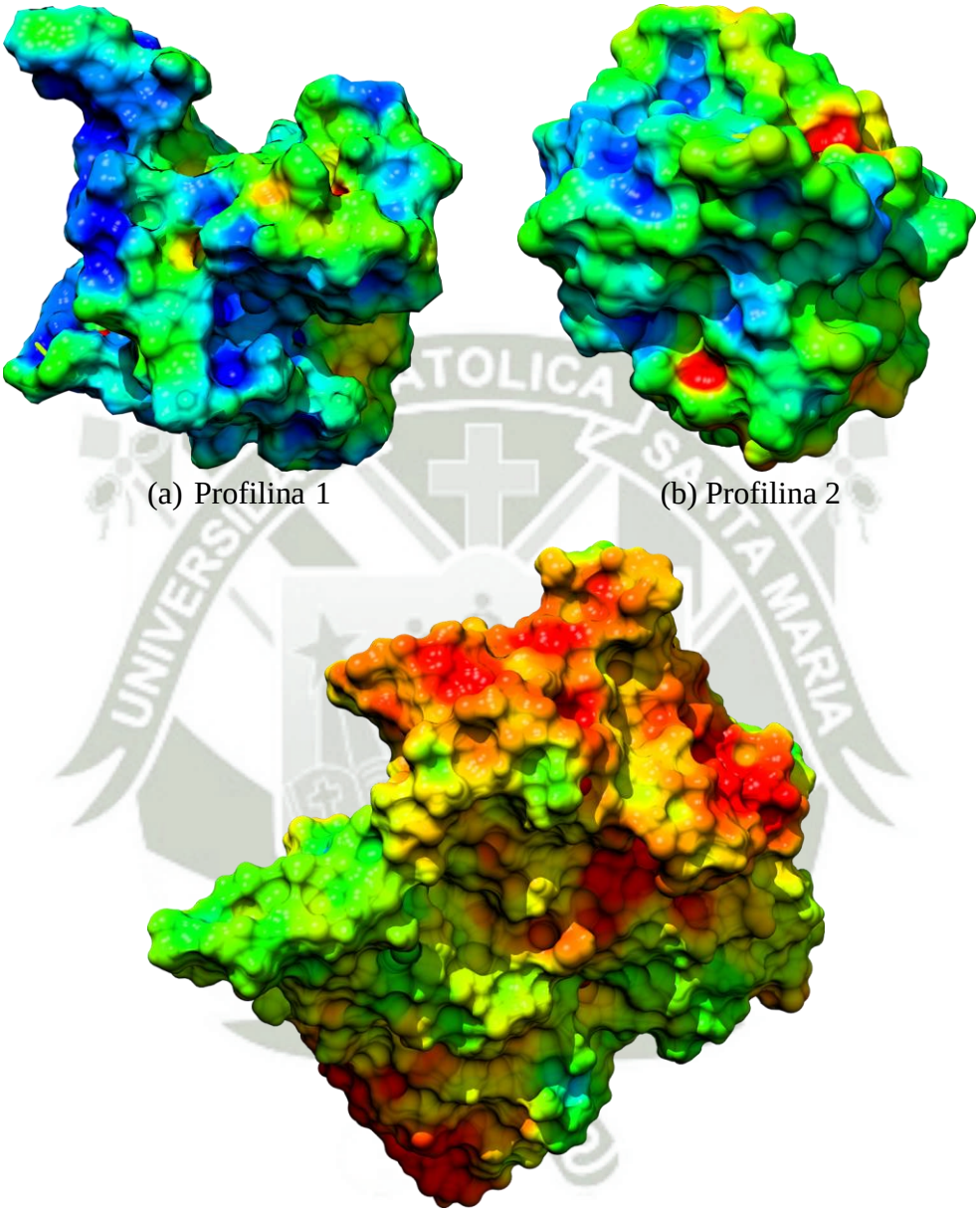
En la Figura3.15, se presentan las superficies de potencial electrostático para

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

las tres estructuras en estudio, para el caso de la Profilina I (ver Figura3.15(a)), podemos apreciar que regiones altamente positivas se acumulan en las caras la- terales de la Profilina I, haciéndola potencialmente interactuante por esta zona o región molecular siempre y cuando estas interacciones estén gobernadas por fuerzas Coulombicas.



(a) Profilina 1 (b) Profilina 2

(c) Actina

Figura 3.15: Superficie del Potencial Electrostático de la Profilina I, Profilina II y Actina.

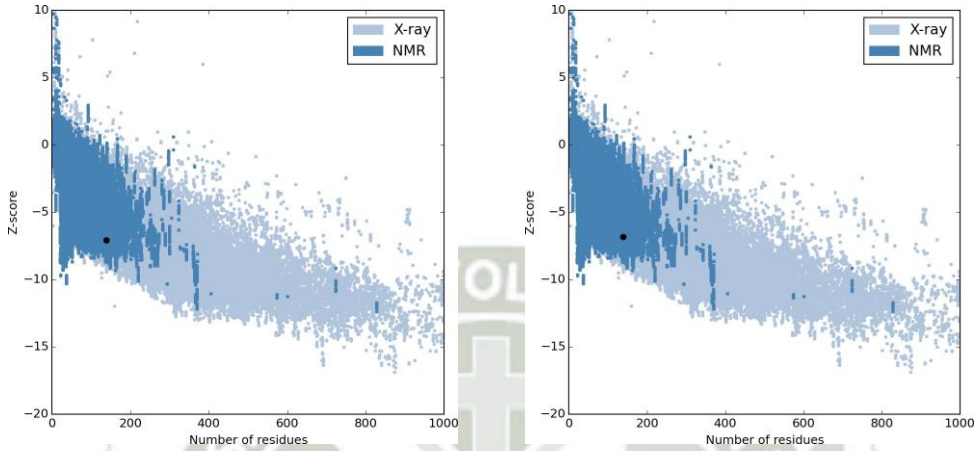
Para el caso de la Profilina II (ver Figura3.15(b)), aunque podemos apreciar una acumulación de regiones positivas sobre la superficie lateral, estas son mucho menores que para el caso de la Profilina II, lo que en términos competitivos respecto

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

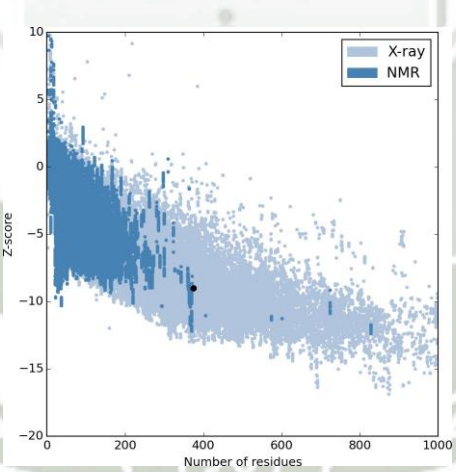
REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

a una interacción Coulombica con la Profilina I, esta tendría un mejor efecto o la energía de interacción sería menor. Para el caso de la actina (ver Figura3.15(c)), presenta una elevada concentración de superficie cargada negativamente, con ligeras zonas intermedias positivas o neutras, esta forma de distribución son generalmente conducentes a aglomeración, todo esto se halla en concordancia con las observaciones empíricas en la literatura.



(a) Profilina 1 (b) Profilina 2



(c) Actina

Figura 3.16: Diagramas del Z-score para las profilinas I y II y Actina.

Con el fin de verificar si la metodología propuesta es la adecuada para determinar la veracidad de la forma estructural más próxima a la realidad, se evaluó mediante un servidor ampliamente citado, en el cual se determinó el Z-score de validación estructural, donde para cada modelo el primero tiene un Z-score de -7.06, para el segundo -6.48 y para el tercero -8.99, con estos datos se ubican dentro de la región permitida indicando que estos modelos estructurales se encuentran cercanos a la naturaleza (ver Figura3.16(a), Figura3.16(b)y Figura3.16(c)). Estos análisis nos

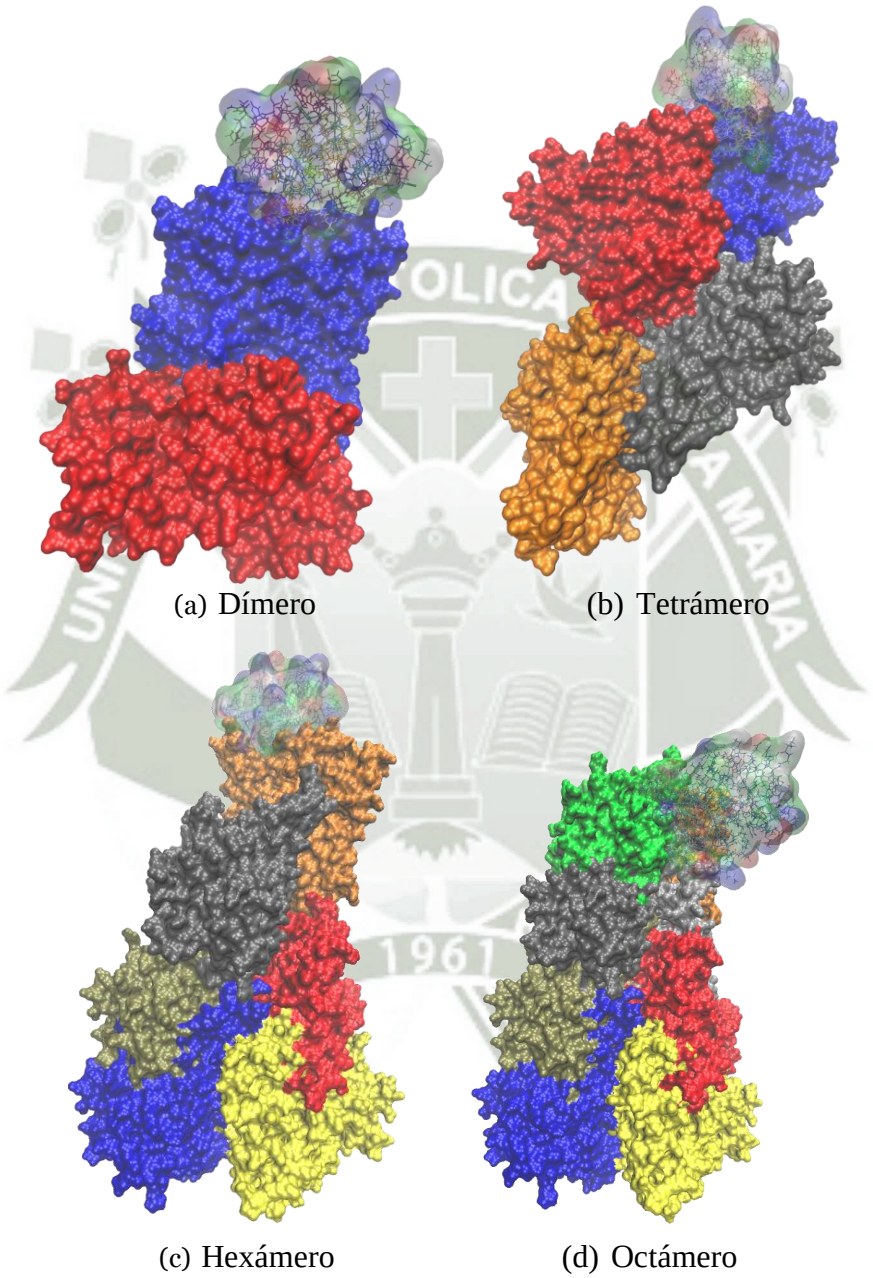
Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

permitieron determinar que se logró encontrar luego de una predicción por homología y el afinamiento mediante los cálculos de dinámica molecular una estructura que existe en la naturaleza.

El acoplamiento molecular que se predijo, se obtuvieron un conjunto de modelos por cada sistema de estudio, cada sistema se eligió en base a la energía de interacción más favorable para las profilinas I y II.



(a) Dímero (b) Tetrámero

(c) Hexámero (d) Octámero

Figura 3.17: Actina y sus polímeros interactuando con la Profilina I.

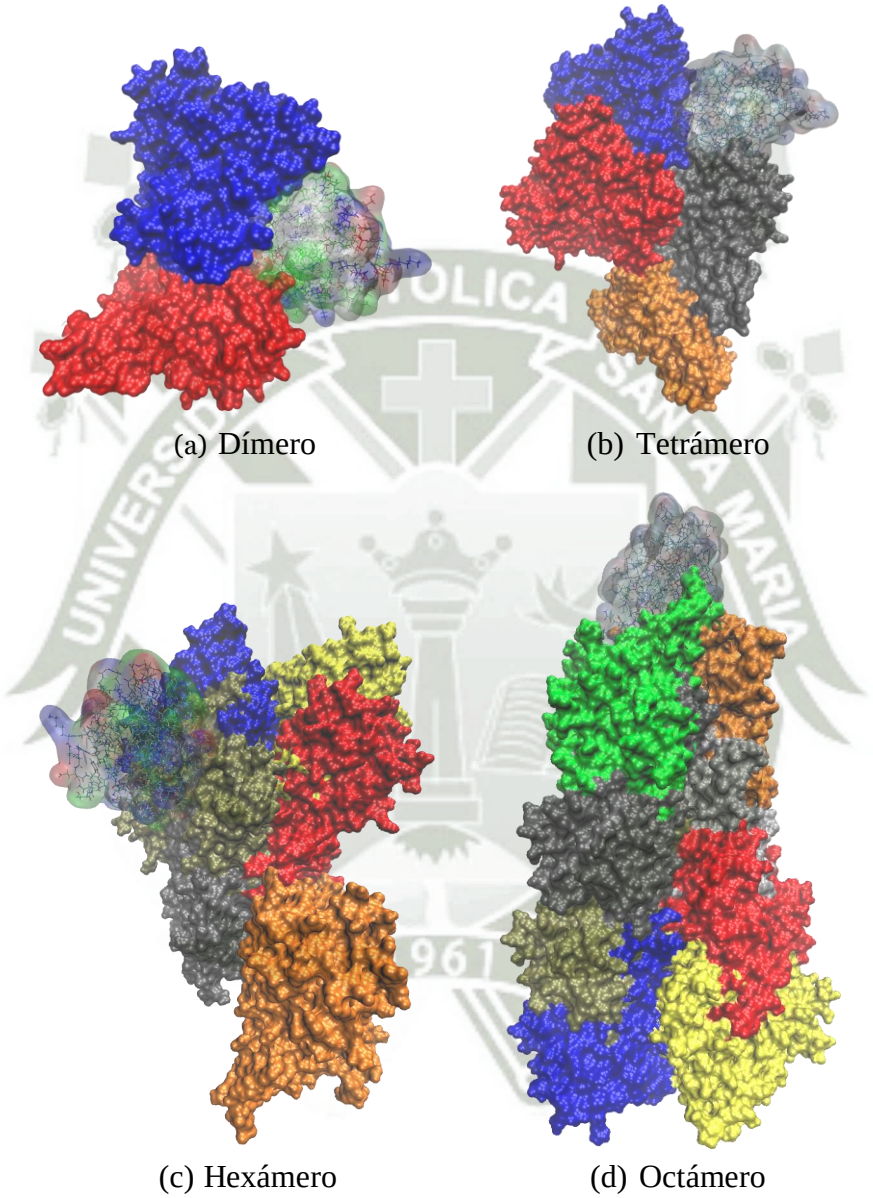
En la Figura 3.17 se presentan a las imágenes tomadas de los modelos más óptimos, así mismo podemos observar que la profilina (modelo de superficie transparen-

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

te) interactúa con un solo monómero de actina (β-actina, siendo la más frecuente en la mayoría de células animales) en los diferentes sistemas, esta afinidad de la profilina I es debido a que ésta se encuentra involucrada en la polimerización de los filamentos, lo cual lo hace al interactuar con un solo monómero, teniendo en cuenta que se une en estequiometría 1:1 a los monómeros de actina G-ATP, facilitando el intercambio de nucleótidos ATP por ADP.



(a) Dímero (b) Tetrámero

(c) Hexámero (d) Octámero

Figura 3.18: Actina y sus polímeros interactuando con la Profilina II

En cuanto a la profilina II, a diferencia de la profilina I (Figura3.18), se une a dos monómeros lo cual es señal que cumple una función distinta a la del ensamblaje de monómeros de actina. Debido a la afinidad que posee, no logra ayudar a la formación del filamento, debido a su ubicación, bloqueando el sitio activo y generando

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

la desestabilización estructural de las células, lo cual podemos ver que en varios reportes se ve un incremento de la profilina tipo II en cáncer.

Para poder extraer la energía de interacción, se procedió a una simulación de dinámica molecular en un ensamble isobárico-isotérmico, por un tiempo de 1ns, con el único propósito de calcular la energía libre de interacción. Estos resultados son presentados en la Tabla3.3que para el caso de los sistemas unidos a la profilina I, la mayor energía de interacción se da cuando la actina se encuentra en forma de dímero, para el caso de la profilina II la mejor energía de interacción se da cuando la actina se encuentra en forma de hexámero. Así mismo vemos que en esta tabla la puntuación y ranking de la fase final en Firedock se clasifica identificando las soluciones refinadas casi nativas, esta clasificación se realiza de acuerdo con una función de energía de enlace que incluye una variedad de términos energéticos como: energía de solvatación (energía de contacto atómica, ACE), interacciones de van der Waals, electrostática parcial, enlaces de hidrógeno y disulfuro, apilamiento π e interacciones alifáticas, rotámeros, probabilidades y más.

Tabla 3.3: Energías Libre de Gibbs para la interacción de sistemas interactuantes en Kcal/mol.

	ΔG de Prof-I	ΔG de Prof-II
Dímero	-62.81	-38.64
Tetrámero	-42.5	-37.67
Hexámero	-40.5	-45.57
Octámero	-43.14	-41.84

Ahora podemos entender mejor que, para el caso de la Profilina I, tanto para el caso de dímero, tetrámero y octámero se ven favorecidos ampliamente y solo en el caso del hexámero, la Profilina II se ve favorecida, por aproximadamente 5 Kcal/mol. Es notorio que, en el caso del dímero, la Profilina I, es casi el doble de estable energéticamente que la Profilina II, pero también es claro que la diferencia entre la Profilina I y II interactuando con el octámero es sólo 2.7 Kcal/mol más estable.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

Conclusiones

1. Se logró identificar y bajo las estructuras de las profilinas I y II en la base de datos NCBI (National Center of Biotechnology Information), bajo la secuencia de aminoácidos en forma lineal (extensión *.fasta), así mismo se verificó que ambas estructuras presentan una alta homología.

2. Mediante diseño molecular, logramos acoplar dímeros, tetrámeros, hexámeros y octámeros de la actina humana.

3. Los procesos de afinamiento mediante técnicas de química computacional, mejoraron la predicción de cada proteína mediante el modelado por homología, teniendo en cuenta que para la optimización de la geometría se hizo uso de la minimización de energías y dinámica molecular con solvente implícito (método para representar el disolvente como un medio continuo en lugar de moléculas presentes *explícitas*), con ello pudimos determinar el promedio estructural que se podría encontrar en la naturaleza, para ello se cuenta con diagramas de validación como el RMSD.

4. Se logró generar cuatro modelos de filamento de actina (dímero, tetrámero, hexámero y octámero) y cada sistema fue acoplado con las profilinas I y II, cada acoplamiento fue afinado con FIREDOCK el cual hizo un barrido de más de mil modelos y determinó el de la mejor energía de acoplamiento. Con ello comprobamos la alta afinidad por un monómero de actina por parte de la profilina tipo I, mientras la profilina tipo II mostró afinidad por dos monómeros en todos los casos, con lo cual suponemos que la presencia de profilina II podría bloquear la polimerización de la actina.

5. Los valores energéticos nos indicaron que para cada sistema los procesos son favorables (energías de unión negativas).

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

Recomendaciones

Es necesario realizar un análisis QM/MM de los lugares de interacción, para verificar la naturaleza de los aminoácidos que se encuentran presentes en las profilinas I y II.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

Referencias Bibliográficas

[1] Yarmola EG, Bubb MR. Profilin: emerging concepts and lingering misconceptions. Trends in biochemical sciences. 2006;31(4):197–205.

[2] Pollard TD, Borisy GG. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. Cell. 2003;112(4):453–465.

[3]Witke W, Podtelejnikov AV, Di Nardo A, Sutherland JD, Gurniak CB, Dotti C, et al. In mouse brain profilin I and profilin II associate with regulators of the endocytic pathway and actin assembly. The EMBO journal. 1998;17(4):967– 976.

[4] Metzler WJ, Farmer BT, Constantine KL, Friedrichs MS, Mueller L, Lavoie T. Refined solution structure of human profilin I. Protein Science. 1995;4(3):450– 459.

[5] Wu CH, Fallini C, Ticozzi N, Keagle PJ, Sapp PC, Piotrowska K, et al. Mutations in the profilin 1 gene cause familial amyotrophic lateral sclerosis. Nature. 2012;488(7412):499.

[6] Adami GR, O'Callaghan TN, Kolokythas A, Cabay R, Zhou Y, Schwartz JL, et al. A loss of profilin-1 in late-stage oral squamous cell carcinoma. Journal of Oral Pathology & Medicine. 2016;.

[7] Alkam D, Feldman EZ, Singh A, Kiaei M. Profilin1 biology and its mutation, actin (g) in disease. Cellular and Molecular Life Sciences. 2016;p. 1–15.

[8] Munsie LN, Truant R. The role of the cofilin-actin rod stress response in neurodegenerative diseases uncovers potential new drug targets. Bioarchitecture. 2012;2(6):204–208.

[9] Tóth MÁ, Majoros AK, Vig AT, Migh E, Nyitrai M, Mihály J, et al. Biochemical activities of the Wiskott-Aldrich syndrome homology region 2 domains

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

of sarcomere length short (SALS) protein. Journal of Biological Chemistry. 2016;291(2):667–680.

[10] Carlier MF, Pantaloni D. Control of actin dynamics in cell motility. Journal of molecular biology. 1997;269(4):459–467.

[11] Watanabe N, Madaule P, Reid T, Ishizaki T, Watanabe G, Kakizuka A, et al. p140mDia, a mammalian homolog of Drosophila diaphanous, is a target pro- tein for Rho small GTPase and is a ligand for profilin. The EMBO journal. 1997;16(11):3044–3056.

[12] Pantaloni D, Carlier MF. How profilin promotes actin filament assembly in the presence of thymosin β4. Cell. 1993;75(5):1007–1014.

[13] Perelroizen I, Didry D, Christensen H, Chua NH, Carlier MF. Role of nu- cleotide exchange and hydrolysis in the function of profilin in actin assembly. Journal of Biological Chemistry. 1996;271(21):12302–12309.

[14] Cooper GM. Structure and organization of actin filaments. Sinauer Associates; 2000.

[15] Luscombe NM, Greenbaum D, Gerstein M, et al. What is bioinformatics? An introduction and overview. Yearbook of Medical Informatics. 2001;1(83-100):2.

[16] Witke W, Sutherland JD, Sharpe A, Arai M, Kwiatkowski DJ. Profilin I is essential for cell survival and cell division in early mouse development. Pro- ceedings of the National Academy of Sciences. 2001;98(7):3832–3836.

[17] Minamida S, Iwamura M, Kodera Y, Kawashima Y, Ikeda M, Okusa H, et al. Profilin 1 overexpression in renal cell carcinoma. International Journal of Urology. 2011;18(1):63–71.

[18] Braun A, Aszódi A, Hellebrand H, Berna A, Fässler R, Brandau O. Genomic organization of profilin-III and evidence for a transcript expressed exclusively in testis. Gene. 2002;283(1):219–225.

[19] Yarmola EG, Bubb MR. How depolymerization can promote polymerization: the case of actin and profilin. BioEssays. 2009;31(11):1150–1160.

[20] Polet D, Lambrechts A, Ono K, Mah A, Peelman F, Vandekerckhove J, et al. Caenorhabditis elegans expresses three functional profilins in a tissue-specific manner. Cell motility and the cytoskeleton. 2006;63(1):14–28.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

[21] Carlsson L, Nyström LE, Sundkvist I, Markey F, Lindberg U. Actin polymerizability is influenced by profilin, a low molecular weight protein in non-muscle cells. Journal of molecular biology. 1977;115(3):465–483.

[22] Zou L, Ding Z, Roy P. Profilin-1 overexpression inhibits proliferation of MDA-MB-231 breast cancer cells partly through p27kip1 upregulation. Journal of cellular physiology. 2010;223(3):623–629.

[23] Braun A, Aszódi A, Hellebrand H, Berna A, Fässler R, Brandau O. Genomic organization of profilin-III and evidence for a transcript expressed exclusively in testis. Gene. 2002;283(1):219–225.

[24] Schlüter K, Jockusch BM, Rothkegel M. Profilins as regulators of actin dynamics. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research. 1997;1359(2):97–109.

[25] Hu E, Chen Z, Fredrickson T, Zhu Y. Molecular cloning and characterization of profilin-3: a novel cytoskeleton-associated gene expressed in rat kidney and testes. Nephron Experimental Nephrology. 2001;9(4):265–274.

[26] Obermann H, Raabe I, Balvers M, Brunswig B, Schulze W, Kirchhoff C. Novel testis-expressed profilin IV associated with acrosome biogenesis and spermatid elongation. Molecular human reproduction. 2005;11(1):53–64.

[27] Honoré B, Madsen P, Andersen AH, Leffers H. Cloning and expression of a novel human profilin variant, profilin II. FEBS letters. 1993;330(2):151–155.

[28] Di Nardo A, Gareus R, Kwiatkowski D, Witke W. Alternative splicing of the mouse profilin II gene generates functionally different profilin isoforms. Journal of cell science. 2000;113(21):3795–3803.

[29] Di Nardo A, Gareus R, Kwiatkowski D, Witke W. Alternative splicing of the mouse profilin II gene generates functionally different profilin isoforms. Journal of cell science. 2000;113(21):3795–3803.

[30] Jockusch B, Murk K, Rothkegel M. The profile of profilins. In: Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology. Springer; 2007. p. 131–149.

[31] Pan Q, Shai O, Lee LJ, Frey BJ, Blencowe BJ. Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequen- cing. Nature genetics. 2008;40(12):1413–1415.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

[32] Somboonwiwat K, Supungul P, Rimphanitchayakit V, Aoki T, Hirono I, Tassanakajon A. Differentially expressed genes in hemocytes of Vibrio harveyi-challenged shrimp Penaeus monodon. BMB Reports. 2006;39(1):26–36.

[33] Di Nardo A, Gareus R, Kwiatkowski D, Witke W. Alternative splicing of the mouse profilin II gene generates functionally different profilin isoforms. Journal of cell science. 2000;113(21):3795–3803.

[34] Honoré B, Madsen P, Andersen AH, Leffers H. Cloning and expression of a novel human profilin variant, profilin II. FEBS letters. 1993;330(2):151–155.

[35] Tilney LG, Bonder EM, Coluccio LM, Mooseker MS. Actin from Thyone sperm assembles on only one end of an actin filament: a behavior regulated by profilin. The Journal of cell biology. 1983;97(1):112–124.

[36] Jiménez-López JC. Caracterización molecular del polimorfismo de las pro- filinas en el polen de olivo y otras especies alergogénicas. Universidad de Granada; 2008.

[37] Murk K, Buchmeier S, Jockusch BM, Rothkegel M. In birds, profilin-2a is ubiquitously expressed and contributes to actin-based motility. Journal of cell science. 2009;122(7):957–964.

[38] Gertler FB, Niebuhr K, Reinhard M, Wehland J, Soriano P. Mena, a relative of VASP and Drosophila Enabled, is implicated in the control of microfilament dynamics. Cell. 1996;87(2):227–239.

[39] Giesemann T, Rathke-Hartlieb S, Rothkegel M, Bartsch JW, Buchmeier S, Jockusch BM, et al. A Role for Polyproline Motifs in the Spinal Mus- cular Atrophy Protein SMN PROFILINS BIND TO AND COLOCALI- ZE WITH SMN IN NUCLEAR GEMS. Journal of Biological Chemistry. 1999;274(53):37908–37914.

[40] Machesky LM, Cole NB, Moss B, Pollard TD. Vaccinia virus expresses a novel profilin with a higher affinity for polyphosphoinositides than actin. Biochemistry. 1994;33(35):10815–10824.

[41] Pederson T, Aebi U. Actin in the nucleus: what form and what for? Journal of structural biology. 2002;140(1-3):3—9. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/S1047-8477(02)00528-2.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

[42] Migocka-Patrzałek M, Makowiecka A, Nowak D, Mazur AJ, Hofmann WA, Malicka-Błaszkiewicz M. β-and γ-Actins in the nucleus of human melanoma A375 cells. Histochemistry and cell biology. 2015;144(5):417–428.

[43] Karp G. Biologia celular y molecular: conceptos y experimentos. McGraw Hill Mexico; 2011.

[44] Otterbein LR, Graceffa P, Dominguez R. The crystal structure of uncomplexed actin in the ADP state. Science. 2001;293(5530):708–711.

[45] Kuroda A, Murphy H, Cashel M, Kornberg A. Guanosine tetra-and pentaphosphate promote accumulation of inorganic polyphosphate in Escherichia coli. Journal of Biological Chemistry. 1997;272(34):21240–21243.

[46] Olave IA, Reck-Peterson SL, Crabtree GR. Nuclear actin and actin- related proteins in chromatin remodeling. Annual review of biochemistry. 2002;71(1):755–781.

[47] Pederson T, Aebi U. Actin in the nucleus: what form and what for? Journal of structural biology. 2002;140(1):3–9.

[48] Bettinger BT, Gilbert DM, Amberg DC. Actin up in the nucleus. Nature Reviews Molecular Cell Biology. 2004;5(5):410–415.

[49] Shumaker DK, Kuczmarski ER, Goldman RD. The nucleoskeleton: lamins and actin are major players in essential nuclear functions. Current opinion in cell biology. 2003;15(3):358–366.

[50] Cooper G. Structure and organization of actin filaments. The cell: a molecular approach. 2000;.

[51] Carlier MF, Wiesner S, Le Clainche C, Pantaloni D. Actin-based motility as a self-organized system: mechanism and reconstitution in vitro. Comptes rendus biologies. 2003;326(2):161–170.

[52] Cristobal G, Deepak C. Actin-Binding Proteins and Disease. Springer Science & Business Media; 2010.

[53] Kabsch W, Mannherz HG, Suck D, Pai EF, Holmes KC. Atomic structure of the actin: DNase I complex. Nature. 1990;347(6288):37–44.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

[54] Flaherty KM, DeLuca-Flaherty C, McKay DB, et al. Three-dimensional struc- ture of the ATPase fragment of a 70 K heat-shock cognate protein. Nature. 1990;346(6285):623–628.

[55] Roeben A, Kofler C, Nagy I, Nickell S, Hartl FU, Bracher A. Crystal structure of an archaeal actin homolog. Journal of molecular biology. 2006;358(1):145– 156.

[56] Hara F, Yamashiro K, Nemoto N, Ohta Y, Yokobori Si, Yasunaga T, et al. An actin homolog of the archaeon Thermoplasma acidophilum that retains the ancient characteristics of eukaryotic actin. Journal of bacteriology. 2007;189(5):2039–2045.

[57] Reisler E, Egelman EH. Actin structure and function: what we still do not understand. Journal of Biological Chemistry. 2007;282(50):36133–36137.

[58] Bettinger BT, Gilbert DM, Amberg DC. Actin up in the nucleus. Nature Reviews Molecular Cell Biology. 2004;5(5):410–415.

[59] Hofmann W, Reichart B, Ewald A, Müller E, Schmitt I, Stauber RH, et al. Cofactor Requirements for Nuclear Export of Rev Response Element (Rre)– And Constitutive Transport Element (Cte)–Containing Retroviral Rnas An Unexpected Role for Actin. The Journal of cell biology. 2001;152(5):895–910.

[60] Flaherty KM, McKay DB, Kabsch W, Holmes KC. Similarity of the three-dimensional structures of actin and the ATPase fragment of a 70-kDa heat shock cognate protein. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1991;88(11):5041–5045.

[61] May LT, Leach K, Sexton PM, Christopoulos A. Allosteric modulation of G protein–coupled receptors. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2007;47:1–51.

[62] Ponte P, Gunning P, Blau H, Kedes L. Human actin genes are single copy for alpha-skeletal and alpha-cardiac actin but multicopy for beta-and gamma- cytoskeletal genes: 3úntranslated regions are isotype specific but are conserved in evolution. Molecular and cellular biology. 1983;3(10):1783–1791.

[63] Junqueira LCU, Carneiro J, Bustos E. Biología celular y molecular. McGraw- Hill Interamericana; 1998.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

[64] Oda T, Iwasa M, Aihara T, Maéda Y, Narita A. The nature of the globular-to fibrous-actin transition. Nature. 2009;457(7228):441–445.

[65] Paniagua R, Nistal M, Sesma P, Álvarez-Uría M, Fraile B, Anadón R, et al. Biología celular. MacGraw-Hill. 2003;.

[66] Alberts B, Johnson A, Lewis J, Morgan D, Raff M, Roberts K, et al. Biologia molecular da célula. Artmed Editora; 2010.

[67] Stradal TE, Rottner K, Disanza A, Confalonieri S, Innocenti M, Scita G. Regulation of actin dynamics by WASP and WAVE family proteins. Trends in cell biology. 2004;14(6):303–311.

[68] Sheterline P, Clayton J, Sparrow JC. Actin. OUP Oxford; 1999.

[69] Grummt I. Actin and myosin as transcription factors. Current opinion in genetics & development. 2006;16(2):191–196.

[70] Gunning PW, Ghoshdastider U, Whitaker S, Popp D, Robinson RC. The evolution of compositionally and functionally distinct actin filaments. J Cell Sci. 2015;128(11):2009–2019.

[71] Sedeh RS, Fedorov AA, Fedorov EV, Ono S, Matsumura F, Almo SC, et al. Structure, evolutionary conservation, and conformational dynamics of Homo sapiens fascin-1, an F-actin crosslinking protein. Journal of molecular biology. 2010;400(3):589–604.

[72] Goldschmidt-Clermont PJ, Machesky LM, Doberstein SK, Pollard TD. Mechanism of the interaction of human platelet profilin with actin. J Cell Biol. 1991;113(5):1081–1089.

[73] Price CJ. Molecular interactions and cellular functions of the vasodilator stimulated phosphoprotein (VASP). Surgery; 2000.

[74] Saarikangas J, Zhao H, Lappalainen P. Regulation of the actin cytoskeleton-plasma membrane interplay by phosphoinositides. Physiological reviews. 2010;90(1):259–289.

[75] Lu J, Pollard TD. Profilin binding to poly-L-proline and actin monomers along with ability to catalyze actin nucleotide exchange is required for viability of fission yeast. Molecular biology of the cell. 2001;12(4):1161–1175.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

[76] Bearer E, Prakash J, Li Z. Actin dynamics in platelets. International review of cytology. 2002;217:137–182.

[77] Pollard TD, Blanchoin L, Mullins RD. Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells. Annual review of biophysics and biomolecular structure. 2000;29(1):545–576.

[78] Skare P, Karlsson R. Evidence for two interaction regions for phosphatidylino- sitol (4, 5)-bisphosphate on mammalian profilin I. FEBS letters. 2002;522(1- 3):119–124.

[79] Ren H, Xiang Y. The function of actin-binding proteins in pollen tube growth. Protoplasma. 2007;230(3-4):171–182.

[80] Goldschmidt-Clermont PJ, Machesky LM, Doberstein SK, Pollard TD. Mechanism of the interaction of human platelet profilin with actin. J Cell Biol. 1991;113(5):1081–1089.

[81] McLachlan GD, Cahill SM, Girvin ME, Almo SC. Acid-induced equilibrium folding intermediate of human platelet profilin. Biochemistry. 2007;46(23):6931–6943.

[82] Moens PD, Bagatolli LA. Profilin binding to sub-micellar concentrations of phosphatidylinositol (4, 5) bisphosphate and phosphatidylinositol (3, 4, 5) trisphosphate. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes. 2007;1768(3):439–449.

[83] Pascual ESE. El uso de los compuestos clásicos en bioinformática. LSP Journal-Language for special purposes, professional communication, knowled- ge management and cognition. 2010;1(1).

[84] Sanz-Serna J. Matemáticas y medicina. La Gaceta de la RSME. 2008;11(4):665–677.

[85] Lewars EG. Computational chemistry: introduction to the theory and applications of molecular and quantum mechanics. Springer; 2016.

[86] Frank J. Introduction to computational chemistry. Editorial Offices October. 1999;.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

[87] Baker CM, Anisimov VM, MacKerell Jr AD. Development of CHARMM polarizable force field for nucleic acid bases based on the classical Drude oscillator model. The journal of physical chemistry B. 2010;115(3):580–596.

[88] Leach AR. Molecular modelling: principles and applications. Pearson educa- tion; 2001.

[89] Kaminski G, Friesner R, Tirado-Rives J, Jorgensen W. Evaluation and reparametrization of the OPLS-AA force field for proteins via comparison with accurate quantum chemical calculations on peptides. Journal of Physical Che- mistry B. 2001 JUL 19;105(28):6474–6487. Symposium on Molecular Dyna- mics - The Next Millennium, COLUMBIA UNIV, NEW YORK, NEW YORK, JUN 02-03, 2000.

[90] Price M, Ostrovsky D, Jorgensen W. Gas-phase and liquid-state properties of esters, nitriles, and nitro compounds with the OPLS-AA force field. Journal of Computational Chemistry. 2001 OCT;22(13):1340–1352.

[91] Sambasivarao SV, Acevedo O. Development of OPLS-AA Force Field Parameters for 68 Unique Ionic Liquids. Journal of Chemical Theory and Compu- tation. 2009 APR;5(4):1038–1050.

[92] Bjelkmar P, Larsson P, Cuendet MA, Hess B, Lindahl E. Implementation of the CHARMM force field in GROMACS: Analysis of protein stability effects from correction maps, virtual interaction sites, and water models. Journal of Chemical Theory and Computation. 2010;6(2):459–466.

[93] Pieffet GP. The Application of Molecular Dynamics Simulation Techniques and Free Energy Calculations to Predict Protein-protein and Protein-ligand Interactions. University Library Groningen][Host]; 2005.

[94] Sanz-Serna J. Matemáticas y medicina. La Gaceta de la RSME. 2008;11(4):665–677.

[95] Ramachandran K, Deepa G, Namboori K. Computational chemistry and mo- lecular modeling: principles and applications. Springer Science & Business Media; 2008.

[96] Lewars EG. Computational chemistry: introduction to the theory and applications of molecular and quantum mechanics. Springer; 2016.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

[97] Tsoli M. Molecular modelling and experimental studies of the interactions between biomolecules and nanostructured inorganic materials. Universität Duisburg-Essen, Fakultät für Chemie; 2004.

[98] Verdonk ML, Cole JC, Hartshorn MJ, Murray CW, Taylor RD. Improved protein–ligand docking using GOLD. Proteins: Structure, Function, and Bio- informatics. 2003;52(4):609–623.

[99] González-díaz H, Saíz-urra L, Molina R, González-díaz Y, Sánchez-gonzález A. Computational chemistry approach to protein kinase recognition using 3D stochastic van der Waals spectral moments. Journal of computational chemistry. 2007;28(6):1042–1048.

[100] Lehn JM. Dynamers: dynamic molecular and supramolecular polymers. Pro- gress in polymer science. 2005;30(8):814–831.

[101] Young D. Computational chemistry: a practical guide for applying techniques to real world problems. John Wiley & Sons; 2004.

[102] Borrego MR. Estudio teórico sobre la influencia del solvente en la estructura y dinámica del ADN. Universitat de Barcelona; 2006.

[103] Pieffet GP. The Application of Molecular Dynamics Simulation Techniques and Free Energy Calculations to Predict Protein-protein and Protein-ligand Interactions. University Library Groningen][Host]; 2005.

[104] Zhang J, Chen R, Liang J. Empirical potential function for simplified protein models: Combining contact and local sequence–structure descriptors. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics. 2006;63(4):949–960.

[105] Kukol A, et al. Molecular modeling of proteins. vol. 443. Springer; 2008.

[106] Omelyan I, Mryglod I, Folk R. Optimized Verlet-like algorithms for molecular dynamics simulations. Physical Review E. 2002;65(5):056706.

[107] Maginn EJ. Molecular Theory and Modeling Chemical Engineering, 698D. Notas de aula Diponível em:<http://www nd edu/ ed/Teaching/molecular_theory_notes pdf>Acesso em. 2007;13.

[108]Kitchen DB, Decornez H, Furr JR, Bajorath J. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. Nature reviews Drug discovery. 2004;3(11):935–949.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

[109] Gratton J. Termodinámica Introducción a la Mecánica Estadística. Departa- mento de Física, Buenos Aires. 2003;.

[110] Hoover WG. Computational statistical mechanics. Elsevier; 2012.

[111]Carter AH. Classical and statistical thermodynamics. AAPT; 2000.

[112] Berendsen HJ, van der Spoel D, van Drunen R. GROMACS: a message-passing parallel molecular dynamics implementation. Computer Physics Communica- tions. 1995;91(1-3):43–56.

[113] Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, et al. UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. Journal of computational chemistry. 2004;25(13):1605–1612.

[114] Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, et al. The protein data bank. Nucleic acids research. 2000;28(1):235–242.

[115] Sussman JL, Lin D, Jiang J, Manning NO, Prilusky J, Ritter O, et al. Pro- tein Data Bank (PDB): database of three-dimensional structural information of biological macromolecules. Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography. 1998;54(6):1078–1084.

[116] Berman HM, Battistuz T, Bhat T, Bluhm WF, Bourne PE, Burkhardt K, et al. The protein data bank. Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography. 2002;58(6):899–907.

[117] Kim DE, Chivian D, Baker D. Protein structure prediction and analysis using the Robetta server. Nucleic acids research. 2004;32(suppl_2):W526–W531.

[118] Schneidman-Duhovny D, Inbar Y, Nussinov R, Wolfson HJ. PatchDock and SymmDock: servers for rigid and symmetric docking. Nucleic acids research. 2005;33(suppl_2):W363–W367.

[119] Mashiach E, Schneidman-Duhovny D, Andrusier N, Nussinov R, Wolfson HJ. FireDock: a web server for fast interaction refinement in molecular docking. Nucleic acids research. 2008;36(suppl_2):W229–W232.

[120] Mouneimne G, Hansen SD, Selfors LM, Petrak L, Hickey MM, Gallegos LL, et al. Differential remodeling of actin cytoskeleton architecture by profilin isoforms leads to distinct effects on cell migration and invasion. Cancer cell. 2012;22(5):615–630.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

[121] Gieselmann R, Kwiatkowski DJ, Janmey PA, Witke W. Distinct biochemi- cal characteristics of the two human profilin isoforms. The FEBS Journal. 1995;229(3):621–628.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis