

ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN	10
ABSTRACT	11
1. INTRODUCCIÓN	12
1.1 El telurito y sus aplicaciones.....	12
1.2 Toxicidad del telurito.....	13
1.3 Reducción de telurito (Te ⁺⁴) a telurio elemental (Te ⁰).	15
1.4 Análisis <i>in silico</i> de proteínas reductoras de telurito.	17
1.5 Proteínas reductoras de telurito descritas a la fecha.	18
2. HIPÓTESIS DEL TRABAJO Y OBJETIVOS	20
2.1 Hipótesis	20
2.2 Objetivo General:	20
2.3 Objetivos Específicos:	20
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
3.1 Bases de datos.....	21
3.2 Alineamiento de secuencias	24
3.3 El modelado comparativo de proteínas.....	32
3.4 MODELLER	36
3.5 <i>DOCKING</i> molecular.	37
3. Metodología.....	40
3.6 Comparación de todas las enzimas con actividad TelR descrita a la fecha.	40
3.7 Comparación estructural de las flavoproteínas.	41
3.8 Distancia euclidiana.....	42
3.9 Obtención estructura tridimensional de cada flavoproteína.....	43
3.10 Evaluación de la unión de la molécula FAD con la proteína (flavoproteína).....	44
3.11 Evaluación de la unión del telurito con la proteína Glutación reductasa	46
4. RESULTADOS.....	48
4.1 Comparación a nivel de estructura primaria y secundaria, todas las enzimas con actividad TelR descrita a la fecha.....	48
4.2 Identificación de dominios, familias y patrones comunes en bases de datos biológicas.	50
4.2.1 Análisis de <i>PROSITE</i>	50

4.2.2	Análisis de PFAM.....	51
4.2.3	Análisis de CATH y SCOP.....	52
4.3	Predecir y validar otras proteínas que posean la actividad TelR.....	53
4.3.1	Extrapolación y Validación de dominios encontrados.....	53
4.3.2	Predicción y validación de otras proteínas con actividad TelR por medio de BLAST.	54
4.4	Generar modelos por homología de las proteínas de interés.....	57
4.4.1	Modelo comparativo del complejo E3 de la Piruvato deshidrogenasa (LpdA).....	57
4.4.2	Modelo comparativo de la Nitrito reductasa (<i>nirB</i>).....	64
4.4.3	Modelo comparativo de la glutamato sintetasa (<i>gltD</i>).....	65
4.4.4	Modelo comparativo del ORF <i>ykgC</i>	69
4.5	Caracterizar patrones comunes entre todas las enzimas con actividad TelR encontradas durante la investigación.....	73
4.5.1	Comparación de todas las flavoproteínas en la base de datos PROSITE.....	74
4.5.2	Comparación directa de secuencias y estructuras de las flavoproteínas con actividad TelR.....	75
4.5.3	Superposición de la molécula de FAD y estructura de las flavoproteínas.....	76
4.5.4	Caracterización de las distancias relevantes del sitio activode las flavoproteínas.....	78
4.5.5	Aminoácidos que componen las cavidades de las flavoproteínas.....	79
4.6	Postular un posible mecanismo de acción de la reducción de telurito.....	80
5.	DISCUSIÓN.....	81
5.1.	Comparación a nivel de estructura primaria y secundaria, todas las enzimas con actividad TelR descrita a la fecha.....	81
5.2.	Identificar dominios, familias y patrones comunes en diversas bases de datos Biológicas.....	82
5.3.	Predicción y validación de otras proteínas que posean la actividad TelR.....	83
5.4.	Generación de modelos por homología de las proteínas de interés.....	85
5.5	Caracterización de patrones comunes entre todas las enzimas con actividad TelR encontradas en esta investigación.....	86
5.6.	Posible mecanismo de acción de la reducción de telurito.....	87
6.	CONCLUSION.....	89
7.	ANEXOS.....	90
7.1.	La estructura primaria de cada una de las enzimas con actividad Telurito reductasa conocida a la fecha.....	90

7.2. La estructura primaria de las secuencias usadas como query en el modelado comparativo.....	91
7.3. Test de Actividad TelR	92
7.4. Test de Actividad TelR de LpdA silvestre y mutadas purificadas	93
8. REFERENCIAS.....	94

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. RESUMEN DE LOS POSIBLES MECANISMOS DE DESTOXIFICACIÓN A TELURITO.....	15
FIGURA 2. FORMACIÓN DE NANOESTRUCTURAS DE TELURO EN BACTERIAS.....	16
FIGURA 3. LA ECUACIÓN DEL CAMPO DE FUERZA DE AMBER.	35
FIGURA 4. REPRESENTACIÓN SIMPLE DE LA ENERGÍA SUPERFICIAL EN UNA DIMENSIÓN, CON LOS MÍNIMOS DE ENERGÍA LOCAL Y GLOBAL.....	35
FIGURA 5. DETECCIÓN DE ZONAS CONSERVADAS. SE MUESTRA EL ALINEAMIENTO MÚLTIPLE DE SECUENCIAS AMINOACÍDICAS DE LAS PROTEÍNAS CON ACTIVIDAD TELR.....	49
FIGURA 6. ACTIVIDAD TELR DE PROTEÍNAS DE E. COLI PURIFICADAS	53
FIGURA 7. VALIDACIÓN PROTEÍNAS CANDIDATAS A LA ACTIVIDAD TELR Y CONTROLES.	56
FIGURA 8. ALINEAMIENTO USADO PARA EL MODELADO COMPARATIVO DEL COMPLEJO E3 DE LA PIRUVATO DESHIDROGENASA DE E. COLI.	58
FIGURA 9. MODELO DEL COMPLEJO E3 DE LA PIRUVATO DESHIDROGENASA DE E. COLI CREADO POR MODELLER.	59
FIGURA 10. GRAFICO DE RAMACHANDRAN DEL MODELO DE LA PIRUVATO DESHIDROGENASA DE E. COLI OBTENIDA DESDE EL SERVIDOR PROCHECK.....	60
FIGURA 11. PERFIL DE ENERGÍA DEL COMPLEJO E3 DE LA PIRUVATO DESHIDROGENASA OBTENIDO DESDE ANOLEA.	61
FIGURA 12. IMAGEN DEL DOCKING DEL COMPLEJO E3 DE LA PIRUVATO DESHIDROGENASA REALIZADA POR AUTODOCK.	62
FIGURA 13. SUPERPOSICIÓN DEL MODELO POR HOMOLOGÍA VERSUS EL CRISTAL DEL COMPLEJO E3 DE LA PIRUVATO DESHIDROGENASA DE E. COLI.....	63
FIGURA 14. BÚSQUEDA DE PROTEÍNAS HOMÓLOGAS A LA NITRITO REDUCTASA DE E. COLI POR PSI-BLAST.	64
FIGURA 15. ALINEAMIENTO USADO PARA EL MODELADO COMPARATIVO DE LA UNA GLUTAMATO SINTETASA DE E. COLI.	65
FIGURA 16. MODELO DE LA ENZIMA GLUTAMATO SINTETASA DE E. COLI.....	66
FIGURA 17: GRAFICO DE RAMACHANDRAN DEL MODELO DE LA GLUTAMATO SINTETASA DE E. COLI OBTENIDA DESDE EL SERVIDOR PROCHECK.....	67
FIGURA 18. PERFIL DE ENERGÍA DE LA GLUTAMATO SINTETASA OBTENIDO DESDE ANOLEA.....	68
FIGURA 19. ALINEAMIENTO USADO PARA EL MODELADO COMPARATIVO DEL ORF YKGC DE E. COLI.	69
FIGURA 20. MODELO DEL ORF YKGC CREADO POR MODELLER DE E. COLI.....	70
FIGURA 21. GRAFICO DE RAMACHANDRAN DE EL MODELO DEL ORF YKGC DE E. COLI OBTENIDA DESDE EL SERVIDOR PROCHECK.....	71
FIGURA 22. PERFIL DE ENERGÍA DEL OBTENIDO DEL MODELO DEL ORF YKGC.	72
FIGURA 23. SUPERPOSICIÓN DE LA MOLÉCULA FAD DE DIVERSOS CRISTALES.....	76
FIGURA 24. SUPERPOSICIÓN DE LOS SITIOS ACTIVOS DE LAS FLAVOPROTEÍNAS CON ACTIVIDAD TELR.....	77
FIGURA 25. FIGURA DEL DOCKING DEL TELURITO Y GLUTATIÓN REDUCTASA REALIZADO POR ICM.....	80
FIGURA 26. SECUENCIA PRIMARIA DE AMINOÁCIDOS PARA DE LAS DIVERSAS ENZIMAS CON ACTIVIDAD TELURITO REDUCTASA.	91
FIGURA 27. FIGURA DE LOS SECUENCIAS CON ACTIVIDAD TELR, ENCONTRADAS DURANTE LA INVESTIGACIÓN.	92
FIGURA 28. ACTIVIDAD TELR DE LPDA SILVESTRE Y MUTADAS PURIFICADAS.	93

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. TABLA INFORMATIVA DE LAS ENZIMAS CON ACTIVIDAD TELURITO REDUCTASA CONOCIDAS A LA FECHA.	18
TABLA 2: DOMINIOS IDENTIFICADOS EN LA BASE DE DATOS PROSITE DE LAS ENZIMAS CON ACTIVIDAD TELR. .	50
TABLA 3. DOMINIOS IDENTIFICADOS EN LA BASE DE DATOS PROSITE DE LAS ENZIMAS CON ACTIVIDAD TELR. .	51
TABLA 4. TABLA DE LAS PROTEÍNAS CANDIDATAS A LA ACTIVIDAD TELR Y CONTROLES.	55
TABLA 5: TABLA INFORMATIVA DE LOS POTENCIALES DOPE DE LOS MODELOS DE LA ENZIMA PIRUVATO DESHIDROGENASA.	59
TABLA 6: TABLA INFORMATIVA DE LOS POTENCIALES DOPE DE LOS MODELOS DE LA PROTEÍNA GLUTAMATO SINTETASA.	66
TABLA 8. SET DE DATOS DE FLAVOPROTEÍNAS PARA LA CARACTERIZACIÓN DE PATRONES.	73
TABLA 9. TABLA DE LOS DOMINIOS IDENTIFICADOS EN LA BASE DE DATOS PROSITE DE LAS FLAVOPROTEÍNAS CON ACTIVIDAD TELR.	74
TABLA 10. TABLA COMPARATIVA DE SECUENCIA Y ESTRUCTURA DE LAS FLAVOPROTEÍNAS.....	75
TABLA 11. TABLA COMPARATIVA DE DISTANCIAS Y KM DE CADA FLAVOPROTEÍNA CON ACTIVIDAD TELR.....	78
TABLA 12. TABLA DE LOS AMINOÁCIDOS QUE COMPONEN LAS CAVIDADES DE LAS FLAVOPROTEÍNAS CON ACTIVIDAD TELR.	79