



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS Y MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y BIOTECNOLOGÍA

MODELAMIENTO MATEMÁTICO DE LA INTERACCIÓN ENTRE PÉPTIDOS SEÑUELOS
PENETRANTES TIPO TIR (BBP'S) Y RECEPTORES TIPO TOLL TLR4

MEMORIA PARA OPTAR A LOS TÍTULOS DE
INGENIERO CIVIL QUÍMICO E INGENIERO CIVIL EN BIOTECNOLOGÍA

CAMILO FABIÁN PATIÑO SALAS

SANTIAGO DE CHILE
OCTUBRE 2012



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS Y MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y BIOTECNOLOGÍA

MODELAMIENTO MATEMÁTICO DE LA INTERACCIÓN ENTRE PÉPTIDOS SEÑUELOS
PENETRANTES TIPO TIR (BBP'S) Y RECEPTORES TIPO TOLL TLR4

MEMORIA PARA OPTAR A LOS TÍTULOS DE
INGENIERO CIVIL QUÍMICO E INGENIERO CIVIL EN BIOTECNOLOGÍA

CAMILO FABIÁN PATIÑO SALAS

PROFESOR GUÍA:
J. CRISTIAN SALGADO HERRERA

MIEMBROS DE LA COMISIÓN:
GERALD ZAPATA TORRES
ORIANA SALAZAR AGUIRRE

Este trabajo forma parte del proyecto de investigación FONDECYT 11080016 y su desarrollo contó con financiamiento a través de los fondos asociados al cumplimiento del proyecto.

SANTIAGO DE CHILE
OCTUBRE 2012

RESUMEN DE LA MEMORIA
PARA OPTAR A LOS TÍTULOS DE
INGENIERO CIVIL QUÍMICO E INGENIERO CIVIL EN BIOTECNOLOGÍA
POR: CAMILO FABIÁN PATIÑO SALAS
FECHA: OCTUBRE 2012
PROF. GUÍA: J. CRISTIAN SALGADO HERRERA

MODELAMIENTO MATEMÁTICO DE LA INTERACCIÓN ENTRE PÉPTIDOS SEÑUELOS PENETRANTES TIPO TIR (BBP'S) Y RECEPTORES TIPO TOLL TLR4

Resumen

Los receptores TLR4, participantes de la respuesta innata inmune, son capaces de reconocer patrones exógenos altamente conservados, además de otros ligandos de carácter endógeno. Dicho reconocimiento repercute en la formación del homodímero de TLR4, lo cual da inicio a una cadena de señalización celular que finaliza en la expresión de citoquinas pro-inflamatorias e interferones que inducen la síntesis de prostaglandinas, potentes mediadores pro-inflamatorios. Su producción sobre los niveles normales es un factor común en enfermedades autoinmunes tales como sepsis y artritis reumatoide cuyo tratamiento actual en base a drogas antiinflamatorias trae efectos secundarios perjudiciales en su uso prolongado.

Estudios previos han identificado que los *loops* BB, secuencias ubicadas entre la hélice α B y la lámina β B presentes tanto en el receptor TLR4 como en las proteínas adaptadoras MyD88, TRAM y MAL, son fundamentales en la formación de los complejos proteicos necesarios para la vía de señalización celular. El diseño de péptidos bloqueadores en base a estas secuencias ha sido presentado en la literatura como un mecanismo inocuo e innovador para el tratamiento de este tipo de patologías.

En el presente trabajo se identifican los sitios de acoplamiento y el tipo de interacciones proteína-ligando generadas entre el homodímero de TLR4 y diferentes péptidos de bloqueo basados en los *loops* BB mediante el uso de programas de acoplamiento y dinámica molecular, estableciendo paralelamente su energía libre a través de la metodología MM-PBSA para determinar su factibilidad termodinámica. Los resultados obtenidos señalan que los péptidos estudiados establecen interacciones de elevada permanencia con los sitios de unión del homodímero descritos para las proteínas MAL y TRAM, pudiendo ser calificados como $\text{pepMAL} > \text{pepTRAM} > \text{pepTLR4} > \text{pepMyD88}$. Específicamente, si bien todos establecen contactos hidrofóbicos con los *loops* BB del homodímero con diferentes tiempos de permanencia, pepMAL y pepTRAM presentan un comportamiento más estable producto de la formación de puentes de hidrógeno, puentes salinos e interacciones catión- π adicionales de carácter estable con otras regiones del homodímero, destacándose la participación del aminoácido E24 perteneciente a la hélice α A de la cadena A. En lo que respecta a sus valores absolutos, la energía libre de unión de los complejos proteína-ligando presentan errores asociados principalmente a la extensión insuficiente de las simulaciones de dinámica molecular y la estimación de la variación de entropía y variación de energía libre de solvatación del sistema. Sin embargo, sus diferencias relativas son consistentes con el estudio de interacciones realizado, asignándole a dicha metodología una labor netamente de comparación de factibilidad termodinámica.

Los péptidos de bloqueo lograron representar en gran medida los contactos reportados para las proteínas MAL y TRAM en estudios de acoplamiento y pruebas experimentales. Sin embargo, la jerarquización realizada en este trabajo presenta discrepancias con respecto a la evidencia experimental reportada en los estudios de Toshchakov y cols., lo cual es atribuible a tiempos insuficientes de simulación en la etapa de dinámica molecular y las diferencias de carácter puntual que existen en las secuencias que definen los péptidos. Según esto, este trabajo introduce nueva evidencia acerca del tipo de interacciones y regiones del homodímero involucradas en el efecto inhibitorio que ejercen estos péptidos.

De esta manera, se establece como conclusión que la metodología aplicada logra establecer resultados confiables acerca del efecto inhibitorio de dichos péptidos de bloqueo, pudiendo proceder a etapas posteriores de búsqueda computacional de otros estados conformacionales y pruebas de carácter experimental. Específicamente, este trabajo sienta un precedente importante en la integración exitosa de varias herramientas de modelamiento molecular que puede ser aplicada en el estudio de otros sistemas bioquímicos, destacándose la influencia de otros dominios en las vías de señalización.

*”When things go wrong, as they sometimes will,
When the road you’re trudging seems all up hill,
When the funds are low and the debts are high,
And you want to smile, but you have to sigh,
When care is pressing you down a bit,
Rest! if you must; but don’t you quit.*

*Life is queer with its twists and turns,
As everyone of us sometimes learns,
And many a failure turns about
When he might have won had he stuck it out;
Don’t give up, though the pace seems slow;
You might succeed with another blow.*

*Often the goal is nearer than
It seems to a faint and faltering man,
Often the struggler has given up
When he might have captured the victor’s cup.
And he learned too late, when the night slipped down,
How close he was to the golden crown.*

*Success is failure turned inside out;
The silver tint of the clouds of doubt;
And you never can tell how close you are,
It may be near when it seems afar;
So stick to the fight when you’re hardest hit;
It’s when things seem worst that you mustn’t quit.”*

(“Don’t quit”, Rudyard Kipling)

Agradecimientos

Durante muchos años, fui conociendo personas con quienes he forjado amistades duraderas. A pesar de que esta investigación partió hace aproximadamente un año y medio, consideraría imperdonable no dedicar algunas palabras a todos quienes, bajo diversas circunstancias, han compartido conmigo a lo largo de mi vida eventos gratos y otros agrídulces. Evidentemente, quisiera mencionar aquí a muchas personas, sin embargo, por exigencias de formato no tengo más remedio que agradecerles de manera general a todos quienes han influido positivamente en mi desarrollo como persona: familiares, amigos más cercanos del colegio y la universidad. Tanto Uds. como yo sabemos a quienes van dirigidas estas palabras, así que espero no herir sus sentimientos por el solo hecho de que su nombre no aparezca explícitamente.

Esta memoria de título representa el último gran esfuerzo de una hermosa etapa que partió el año 2005. El compromiso demostrado durante toda una vida académica como escolar y el esfuerzo permanente de mis padres por entregarme una educación de calidad me permitieron ingresar a la prestigiosa Universidad de Chile, institución que ha recibido a varias generaciones de mi familia en múltiples especialidades cuya formación les ha permitido sobresalir en el ámbito profesional y humano. Para muchos, este último aspecto podría parecer una falacia, más bien una exageración. Sin embargo, cada día que transcurre me convengo aún más de mi postura.

Esta universidad me permitió constatar realidades que jamás había tenido la oportunidad de presenciar. Ingresé a un mundo nuevo caracterizado por una heterogeneidad de pensamientos, convicciones y anhelos que, lejos de ser incómodo, trajo consigo un proceso grato de madurez. Comprendí que no todos vemos la vida desde una misma perspectiva, pero más allá de eso lo importante está en el debate de ideas al que conduce. Logré salir de aquella burbuja escolar, reflejo intrínseco de la realidad que rige en la educación privada chilena, para entrar a un paisaje extenso que incluía personas que trabajaban para financiar sus estudios, que mostraban un interés conmovedor por el trabajo social, que mostraban una tenacidad admirable al enfrentar situaciones personales complicadas paralelamente a sus obligaciones académicas, que tenían un deseo ineludible por ser partícipes y gestores de los cambios que nuestra facultad y nuestro país necesitan, entre otros casos. Esta universidad, a través de sus estudiantes, académicos y funcionarios, han mostrado durante generaciones un sello único representado por una comunidad integrada, participativa y, por sobre todo, con ganas de enfrentar los desafíos venideros, a través de nuestra formación profesional, con soluciones que velen por el bienestar económico y social de una comunidad, una ciudad, una región, un país inclusive. Luego de casi ocho años en Beauchef, agradezco enormemente a Dios y mi familia por haberme permitido vivir esta experiencia de vida única donde conocí gente de una calidad humana sobrecogedora, personas solidarias que siempre tuvieron la intención de tender una mano, beauchefianos concientes de que una sociedad más fraterna es tarea de todos, futuros colegas que serán consecuentes con sus principios y valores.

En este paso por las aulas y pasillos de Beauchef 850, logré hacer amistades en plan común que no me cabe duda que las mantendré por siempre, compañeros de estudio que luchaban hasta altas horas de la madrugada para pasar los ramos, compañeros de parranda que iban desde una partida de pool en Almirante Latorre, partidos de babyfútbol en la Escuela, unas cervezas en la esquina de Tupper con Beauchef hasta viajes recorriendo Chile y Perú, amigos de un apoyo incondicional. A pesar de que no nos veamos tan seguido, siempre habrán oportunidades para volver a reunirnos y recordar antiguas épocas de estudiante. Les agradezco especialmente a Felipe Aguilera, Darío Vargas, Cristian Solís, Roberto Riquelme, Diego Miranda, Ignacio Abarca, Marcelo Ruiz, Felipe Contreras, Ignacio Eguillor y Pablo Junyent por haber sido parte de este período.

El Departamento de Ingeniería Química y Biotecnología (DIQBT) no fue la excepción a la regla. Quisiera agradecer profundamente a todos quienes he tenido el gusto de conocer dentro de este espacio. Me voy con la imagen de una comunidad triestamental afiatada, especialmente sus estudiantes quienes nos

preocupábamos de saludarnos, entablar por algunos minutos conversaciones de pasillo para saber cómo estábamos acompañado de un café, convertir la hora de almuerzo en un momento agradable e instar siempre a la participación en actividades extraprogramáticas. Por esto y mucho más, me saco el sombrero por este departamento. Espero poder representar fielmente este espíritu de integración en el futuro y seguir colaborando desde afuera al desarrollo de este lugar que, por momentos, fue mi segundo hogar.

Aprovecho la instancia para dar las gracias a las grandes amistades que se gestaron alrededor del estudio y las actividades extracurriculares, personas de una calidad humana innegable que siempre han demostrado entusiasmo por reunirse y compartir alrededor de un asado y unas cervezas. Por ese aliento permanente, les agradezco sinceramente a Uds., Juan Ignacio Ávila, Cristian Rodríguez, María Teresa Buldrini, Ricardo Harris, Werner Houzvic, Cristina Stevenson, Francisco Contreras, Diego Bracho y Rodrigo Varela.

A modo de cierre, quisiera dedicar estas palabras de agradecimiento a todo el grupo humano que conforma el Laboratorio de Modelamiento de Procesos y Computación Distribuida (PMDC Lab) del Departamento de Ingeniería Química y Biotecnología de la Universidad de Chile quienes, a través de sus apreciaciones, permitieron mejorar la calidad de este trabajo. Quisiera agradecer especialmente a Eduardo Rossel, una gran persona y amigo, con quien tuve el placer de trabajar codo a codo en el desarrollo del proyecto FONDECYT 11080016 (Mathematical modeling of the interaction between cell-penetrating TIR BB loop decoy peptides (BBPs) and toll-like receptor 4 and 2 (TLR4 and TLR2)). Junto con esto, quisiera agradecer a los miembros de la comisión evaluadora, Prof. J. Cristian Salgado, Prof. Gerald Zapata Torres y Prof. Oriana Salazar, por su permanente disposición a colaborar en su desarrollo. Finalmente, quería agradecer a CONICYT por el apoyo económico suministrado a esta investigación a través de los proyectos FONDECYT 1120280 (Searching for possible deprotonation sites for substrates and inhibitors of human MAO-A) y FONDECYT 11080016 (Mathematical modeling of the interaction between cell-penetrating TIR BB loop decoy peptides (BBPs) and toll-like receptor 4 and 2 (TLR4 and TLR2)).

Índice general

1. Introducción	8
1.1. Antecedentes Generales	8
1.1.1. Sistema Inmune y Receptores TLR4	8
1.1.2. TLR4: Estructura, expresión, ligandos y vía de señalización	9
1.1.3. Péptidos penetrantes celulares: herramientas para la entrega intracelular	10
1.1.4. Péptidos señuelos: herramientas para la interrupción de cadenas de señalización	11
1.2. Descripción del proyecto	11
1.3. Motivación y justificación del proyecto	12
2. Objetivos y Limitaciones	13
2.1. Objetivo General	13
2.2. Objetivos Específicos	13
2.3. Limitaciones	13
3. Discusión Bibliográfica y Metodológica	14
3.1. Vías de señalización TLR4-TLR4: características y elementos constituyentes	14
3.1.1. Descripción de las vías de señalización TLR4-TLR4	14
3.1.2. Receptores TLR4	16
3.1.3. Vía dependiente de MyD88	18
3.1.3.1. MyD88	20
3.1.3.2. MAL	22
3.1.4. Vía independiente de MyD88	22
3.1.4.1. TRIF	23
3.1.4.2. TRAM	24
3.2. Péptidos de Bloqueo	25
3.3. Programas de <i>docking</i> : criterios y análisis de selección	26
3.4. Dinámica molecular	29

3.4.1.	Etapas estándar de las simulaciones de dinámica molecular	29
3.4.2.	Programas de dinámica molecular	30
3.4.3.	Métodos de cálculo de energía libre	31
3.5.	Modelación matemática con herramientas estadísticas	35
4.	Metodología	37
4.1.	Descripción general de la metodología	37
4.1.1.	Pre-procesamiento de estructuras	38
4.1.2.	Selección de algoritmo de acoplamiento	38
4.1.3.	Características del algoritmo de acoplamiento	40
4.1.4.	Descripción de la metodología de acoplamiento	40
4.1.5.	Determinación de contactos preliminares a partir de los complejos obtenidos de las etapas de <i>docking</i>	42
4.1.6.	Selección de programa de dinámica molecular	43
4.1.7.	Descripción del protocolo de dinámica molecular	44
4.1.7.1.	Etapas de minimización	45
4.1.7.2.	Etapas de posición restringida	47
4.1.7.3.	Etapas de estabilización de temperatura y presión	47
4.1.7.4.	Etapas de producción	48
4.2.	Análisis de datos	48
4.2.1.	Definición de contactos	48
4.2.2.	Cálculo de energía libre de unión	49
4.3.	Materiales y equipos utilizados	52
5.	Resultados	53
5.1.	Caracterización de los péptidos de bloqueo	54
5.2.	Modelos preliminares obtenidos de la etapa de <i>docking</i>	55
5.2.1.	Elección de los modelos	55
5.2.2.	Contactos identificados	58
5.2.2.1.	pepMAL-TLR4	59
5.2.2.2.	pepMyD88-TLR4	60
5.2.2.3.	pepTLR4-TLR4	62

5.2.2.4.	pepTRAM-TLR4	63
5.3.	Etapas de dinámica molecular	65
5.3.1.	Homodímero TLR4-TLR4	65
5.3.2.	pepMAL-TLR4	66
5.3.3.	pepMyD88-TLR4	69
5.3.4.	pepTLR4-TLR4	71
5.3.5.	pepTRAM-TLR4	73
5.4.	Estimación de la energía libre de unión mediante metodología MM-PBSA	75
5.4.1.	Elección de los <i>frames</i> para el cálculo de $\Delta G_{\text{Unión,Solv}}$	76
5.4.2.	Cálculo de la energía libre de unión según complejo	79
5.4.2.1.	pepMAL-TLR4	79
5.4.2.2.	pepMyD88-TLR4	82
5.4.2.3.	pepTLR4-TLR4	84
5.4.2.4.	pepTRAM-TLR4	87
6.	Discusión	90
6.1.	Docking y estudio preliminar de interacciones	90
6.2.	Contactos determinados a través de la dinámica molecular	92
6.3.	Análisis de las herramientas de dinámica molecular	103
6.4.	Cálculo de energía libre de unión	105
6.5.	Análisis de la metodología MM-PBSA	105
6.6.	Discusiones finales	107
7.	Conclusiones	108
7.1.	Recomendaciones	109
	Bibliografía	110
A.	Definición de parámetros de las simulaciones de dinámica molecular	I

Índice de figuras

3.1. Esquema general de las vías de señalización donde interviene el homodímero de TLR4	15
3.2. Esquema detallado de las vías de señalización donde interviene el homodímero de TLR4 . .	16
3.3. Estructura tridimensional del receptor TLR4	17
3.4. Estructura tridimensional del homodímero de TLR4	18
3.5. Alineamiento de las secuencias de los dominios TIR de las proteínas MyD88, TLR4 y MAL utilizadas por Salgado y cols.	19
3.6. Estructura tridimensional de MyD88 en asociación a MAL	21
3.7. Alineamiento de las secuencias de los dominios TIR de las proteínas TRAM y TRIF	23
3.8. Estrategia de cálculo de energía libre a través de la metodología MM-PBSA basado en la trayectoria única del complejo	32
3.9. Estrategia de cálculo de energía libre a través de la metodología MM-PBSA basado en la generación de trayectorias independientes para cada uno de sus componentes	33
4.1. Diagrama de bloques de la metodología aplicada	38
4.2. Estrategia de <i>docking</i> basada en el barrido discreto sobre la superficie del homodímero . . .	41
4.3. Diagrama de bloques del protocolo de dinámica molecular	45
4.4. Diagrama de bloques del protocolo de dinámica molecular	50
5.1. Alineamiento de secuencias entre los péptidos de bloqueo diseñados por Salgado a través del programa Clustal X	55
5.2. Mejores conformaciones identificadas para el complejo pepMAL-TLR4 según región de búsqueda	56
5.3. Mejores conformaciones identificadas para el complejo pepMyD88-TLR4 según región de búsqueda	56
5.4. Mejores conformaciones identificadas para el complejo pepTLR4-TLR4 según región de búsqueda	57
5.5. Mejores conformaciones identificadas para el complejo pepTRAM-TLR4 según región de búsqueda	57
5.6. Conformaciones elegidas de la etapa de <i>docking</i>	58
5.7. Conformación representativa del complejo pepMAL-TLR4 extraída de la dinámica molecular	69

5.8. Conformación representativa del complejo pepMyD88-TLR4 extraída de la dinámica molecular	71
5.9. Conformación representativa del complejo pepTLR4-TLR4 extraída de la dinámica molecular	73
5.10. Conformación representativa del complejo pepTRAM-TLR4 extraída de la dinámica molecular	75
5.11. Comparación de los valores de RMSD obtenidos de las trayectorias de los complejos estudiados	77
5.12. Comparación de los valores de RMSD obtenidos de las trayectorias de los complejos estudiados	77
5.13. Alineamiento de secuencias entre los péptidos de bloqueo diseñados por Salgado y por Toshchakov llevado a cabo a través del programa Clustal X	78
5.14. Superficie electrostática de pepMAL obtenido desde su trayectoria en solitario y la trayectoria del complejo pepMAL-TLR4	80
5.15. Superficie electrostática del homodímero obtenido desde su trayectoria en solitario y la trayectoria del complejo pepMAL-TLR4	81
5.16. Superficie electrostática del homodímero obtenido desde su trayectoria en solitario y la trayectoria del complejo pepMyD88-TLR4	83
5.17. Superficie electrostática de pepMyD88 obtenido desde su trayectoria en solitario y la trayectoria del complejo pepMyD88-TLR4	84
5.18. Superficie electrostática del homodímero obtenido desde su trayectoria en solitario y la trayectoria del complejo pepTLR4-TLR4	85
5.19. Superficie electrostática de pepTLR4 obtenido desde su trayectoria en solitario y la trayectoria del complejo pepTLR4-TLR4	86
5.20. Superficie electrostática del homodímero obtenido desde su trayectoria en solitario y la trayectoria del complejo pepTRAM-TLR4	88
5.21. Superficie electrostática de pepTRAM obtenido desde su trayectoria en solitario y la trayectoria del complejo pepTRAM-TLR4	89
6.1. $ \Delta\text{RMSD} $ del aminoácido de arginina conservado en la región RD según péptido de bloqueo	93
6.2. $ \Delta\text{RMSD} $ del aminoácido de ácido aspártico conservado en la región RD según péptido de bloqueo	94
6.3. $ \Delta\text{RMSD} $ del aminoácido de prolina conservado en la región PG según péptido de bloqueo .	95
6.4. $ \Delta\text{RMSD} $ del aminoácido de glicina conservado en la región PG según péptido de bloqueo .	95
6.5. Alineamiento de secuencias entre los receptores TLR4 utilizados por Salgado y por Toshchakov llevado a cabo a través del programa Clustal X	97
6.6. Alineamiento de secuencias entre los péptidos de bloqueo diseñados por Salgado y por Toshchakov llevado a cabo a través del programa Clustal X	98

Índice de tablas

4.1. Estructuras proteicas utilizadas	39
4.2. Selección de programas de <i>docking</i>	39
4.3. Descripción de parámetros de la región de simulación	46
4.4. Criterios para la definición de interacciones identificadas en la etapa de producción	49
4.5. Herramientas computacionales usadas en el proyecto	52
4.6. Software especializado utilizado para el desarrollo del proyecto	53
5.1. Matriz identidad de los péptidos de bloqueo utilizados obtenida a través de Clustal X	55
5.2. Interacciones preliminares del complejo pepMAL-TLR4	60
5.3. Interacciones preliminares del complejo pepMyD88-TLR4	61
5.4. Interacciones preliminares del complejo pepTLR4-TLR4	63
5.5. Interacciones preliminares del complejo pepTRAM-TLR4	64
5.6. Interacciones proteína-ligando identificadas en el homodímero de TLR4	66
5.7. Interacciones proteína-ligando identificadas en complejo pepMAL-TLR4	68
5.8. Interacciones proteína-ligando identificadas en complejo pepMyD88-TLR4	70
5.9. Interacciones proteína-ligando identificadas en complejo pepTLR4-TLR4	72
5.10. Interacciones proteína-ligando identificadas en complejo pepTRAM-TLR4	74
5.11. Comparación de estrategias en el cálculo de energía libre de unión establecidas por la metodología MM-PBSA para cada complejo proteína-ligando	76
5.12. Estrategia MT+NM aplicada al complejo pepMAL-TLR4	81
5.13. Estrategia UT+QH aplicada al complejo pepMAL-TLR4	82
5.14. Estrategia MT+NM aplicada al complejo pepMyD88-TLR4	84
5.15. Estrategia UT+QH aplicada al complejo pepMyD88-TLR4	84
5.16. Estrategia MT+NM aplicada al complejo pepTLR4-TLR4	86
5.17. Estrategia UT+QH aplicada al complejo pepTLR4-TLR4	86
5.18. Estrategia MT+NM aplicada al complejo pepTRAM-TLR4	89
5.19. Estrategia UT+QH aplicada al complejo pepTRAM-TLR4	89

6.1. Interacciones descritas para el complejo TLR4-MAL	100
6.2. Interacciones descritas para el complejo TLR4-TRAM	101
6.3. Similitud entre los contactos identificados para los complejos TLR4-MAL y TLR4-péptido .	102
6.4. Similitud entre los contactos identificados para los complejos TLR4-TRAM y TLR4-péptido	102
A.1. Parámetros del archivo de configuración (.mdp) para cada una de las etapas de MD	I

Capítulo 1

Introducción

1.1. Antecedentes Generales

1.1.1. Sistema Inmune y Receptores TLR4

El sistema de defensa contra microorganismos patogénicos incluye la inmunidad innata y adquirida. A pesar de generar diferentes tipos de respuestas, ambos son activados en secuencia durante la infección y, bajo condiciones normales, asegura la eliminación del patógeno. Mientras el sistema inmune innato se activa dentro de los primeros minutos luego de la invasión del huésped y es responsable de la defensa durante las horas y días iniciales de la infección, la inmunidad adquirida requiere de, al menos, siete a diez días para que se genere una respuesta celular o humoral apropiada [1]. A pesar de la efectividad del sistema inmune innato, su acción no es específica sobre los patógenos invasores, debiendo ser la activación secundaria de la inmunidad adquirida específica mediada por los linfocitos T y B quien resuelva su eliminación. No obstante, los estudios recientes acerca de la naturaleza inespecífica de la inmunidad innata derivaron en el descubrimiento de una clase de receptores, receptores tipo Toll (*Toll-like receptors*, TLR's en inglés), que han resultado ser cruciales para el reconocimiento de microbios por el sistema inmune innato y la conexión entre la respuestas inmunes innatas y adquiridas. [1]

Los receptores TLR se expresan en diversas estructuras celulares inmunes y no inmunes tales como monocitos, macrófagos, células dendríticas, células epiteliales, mastocitos y neutrófilos [2, 3], las cuales cumplen una función de protección particular. Pertenecen a un grupo denominado receptores de reconocimiento de patrones (*pattern-recognition receptors*, PRR's en inglés) ya que son capaces de identificar estructuras microbianas altamente conservadas conocidas como patrones moleculares asociados a patógenos (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMP's en inglés), los cuales son esenciales para la supervivencia del microorganismo y son, por lo tanto, difícil de alterar. Entre estos, destacan péptidoglicanos, lipopéptidos, ARN de doble cadena, lipopolisacáridos (LPS), ADN bacteriano, entre otros. [2, 4, 5]

Si bien algunos se expresan en la superficie celular y otros en compartimentos intracelulares, estos receptores son glicoproteínas integrales de membrana tipo I caracterizados por dominios extracelulares N-terminal constituidos por un número variable de motifs de repeticiones ricas en leucina (*leucine-rich-repeat*, LRR en inglés), un región transmembrana y un dominio de señalización citoplasmático homólogo al descrito en el receptor Interleucina I (IL-1R) denominado dominio Toll/IL-1R (TIR). El dominio LRR está compuesto por 19-25 motifs de LRR en tándem, estando cada uno definido por 24-29 aminoácidos que forman una lámina β y una hélice α unidas por *loops* [2]. Este dominio es el responsable del reconocimiento de PAMP's de bacterias, parásitos, hongos y virus. [6]

Los avances logrados durante los últimos años en el área de la inmunología han puesto en duda el paradigma de las señales foráneas como agentes causantes únicos de la respuesta inmune. En efecto, la acción inmunológica se centra en el daño y se produce por señales de alarma provenientes de tejidos dañados en lugar del reconocimiento de lo foráneo. Las señales de alarma pueden ser constitutivas o inducibles,

intracelulares o excretadas, o incluso ser parte de la matriz extracelular. Esto encuentra sustento en que la respuesta inmune a través de los receptores TLR no sólo es producto del reconocimiento de PAMP's, sino que puede ser causada por señales de alarma de carácter endógeno tales como ADN mamífero, ARN, proteínas de choque térmico (*heat shock proteins*, HSP's en inglés) [7, 8], interferón α , interleucina 1 β , CD40-L y productos de la degradación del ácido hialurónico. [9]

Los avances científicos llevados a cabo en los últimos años han permitido establecer las vías de señalización inducidas por este tipo de receptores. Si bien algunas de estas vías son compartidas por todos los receptores TLR, existen diferencias considerables entre ellas y, en consecuencia, en los patrones de expresión génica. Todos los receptores TLR activan una vía de señalización celular común que culmina en la activación de factores de transcripción NF- κ B y de diversos tipos de quinasas tales como las activadas por mitógeno (*mitogen-activated protein kinases*, MAPK's en inglés), reguladas por señales extracelulares (*extracellular signal-regulated kinases*, ERK's en inglés) y JNK. Los primeros eventos de esta vía común depende de una serie de interacciones entre dominios de señalización modulares. Uno de estos corresponde a la región citosólica de todos los receptores TLR llamado dominio TIR (*Toll/Interleukin (IL)-1*, el cual rige la heterodimerización u homodimerización entre los receptores TLR y la asociación entre estos y proteínas adaptadoras que contienen dominios TIR. [10]

De acuerdo al conocimiento vigente, la activación de la vía de señalización a través de estos receptores está condicionada al entrecruzamiento de dos receptores TLR, derivando en la formación de un dímero resultante de contactos moleculares a nivel extracelular y citoplasmático [11]. Junto con esto, se postula que el dímero permanece en una configuración inactiva hasta que el reconocimiento del ligando apropiado desencadena los cambios conformacionales necesarios para su activación [12], causando una reorganización en el dominio citoplasmático C-terminal que permite la asociación de adaptadores que contienen un dominio TIR [13]. El entrecruzamiento de receptores puede generar homodímeros o heterodímeros cuya formación y respuestas responden al tipo de ligando. [2, 3, 5]

1.1.2. TLR4: Estructura, expresión, ligandos y vía de señalización

De acuerdo a la secuencia de ADNc, el receptor TLR4 está constituido por 841 aminoácidos de los cuales los primeros 23 corresponden al péptido señal predicho. Los siguientes 620 aminoácidos corresponden al dominio extracelular, 20 al segmento transmembrana y los restantes 178 al dominio intracelular. Su dominio extracelular contiene 21 LRR en tándem separadas por una región no-LRR. En el extremo N-terminal del dominio LRR existe una región protectora de 31 aminoácidos de largo que está presente en varias proteínas que presenten tal dominio, mientras que en su extremo C-terminal está protegido por un dominio rico en cisteína que también está presente en otras proteínas transmembrana. [14]

Este receptor se expresa en macrófagos, células dendríticas y endoteliales [15]. Estos son capaces de reconocer diversos PAMP's tales como LPS de bacterias Gram-negativas, proteína F del virus respiratorio sincicial y estructuras constituyentes de las cápsides de diversos virus [3]. Sin embargo, también es capaz de reconocer elementos de la matriz extracelular tales como el sulfato de heparán y los productos de la degradación del ácido hialurónico, y moléculas endógenas tales como HSP's y β -defensina 2. [16]

La cadena de señalización mediante TLR4 involucra un serie de interacciones con varias proteínas a nivel extracelular, incluyendo la proteína de unión a lipopolisacáridos (*LPS binding protein*, LBP en inglés), CD14 [17, 18] y MD-2 [19]. Luego del reconocimiento del ligando, se producen las interacciones proteína-proteína entre los receptores TLR4 y las proteínas adaptadoras de transducción de señales en tres regiones altamente conservadas de los dominios TIR. Se han descrito cinco proteínas adaptadoras que contienen dominios TIR: MyD88 (*myeloid differentiation primary response gene 88* en inglés), TIRAP o Mal (*TIR domain-containing adaptor protein or MyD88-adaptor-like* en inglés), TRIF o TICAM1 (*TIR domain-*

containing adaptor inducing IFN- β en inglés), TRAM o TICAM2 (*TRIF-related adaptor molecule* en inglés) y SARM (*sterile α and HEAT-Armadillo motifs-containing protein* en inglés). Todas estas moléculas, a excepción de SARM, participan en la activación de la cadena de señalización en alguna de las dos vías posibles: la vía dependiente de MyD88 y la vía independiente de MyD88 [5, 16, 18, 20, 21]. Dado que la estimulación de los receptores TLR4 puede inducir respuestas potentes tales como la sepsis, son necesarias vías inhibitorias para proteger al huésped del daño inducido por inflamación. Según esto, la cadena de señalización está regulada en múltiples niveles por varios reguladores negativos [5, 16, 21]. Entre estos, destacan el complejo RP105/MD-1 a nivel extracelular que, en asociación con TLR4/MD-2, es capaz de inhibir la asociación de LPS a este último. Por otro lado, en el medio intracelular destaca la molécula SIGIRR (*single immunoglobulin IL-1R-related molecule* en inglés), la cual es capaz de asociarse al homodímero de TLR4 e inhibir la asociación de MyD88 gracias a la presencia de un dominio TIR en su estructura [16]. ST2L, proteína transmembrana homóloga a los receptores IL-1, puede interactuar con MyD88 y MAL promoviendo el secuestro de tales proteínas adaptadoras y, en consecuencia, inhibir la vía de señalización dependiente de MyD88 [16]. Si bien se ha podido demostrar *in vitro* que SARM actúa como inhibidor de la vía de señalización independiente de MyD88, su funcionamiento *in vivo* aún no está definido completamente [16].

En lo que respecta a las proteínas adaptadoras, la presencia de dominios TIR en sus estructuras permiten que se generen las interacciones receptor-receptor y receptor-adaptador cruciales para la cadena de señalización. En general, los dominios TIR intracelulares de estos adaptadores están compuestos por ciento sesenta aminoácidos aproximadamente, los cuales se caracterizan por contar con tres regiones conservadas conocidas como *boxes*. El *box* 1 es considerado como la secuencia característica de la familia, mientras que los *box* 2 y 3 contienen residuos funcionalmente importantes involucrados en la señalización. Específicamente, el *box* 2 está caracterizado por definir una zona conocida como BB loop, región contenida entre la hélice α B y la lámina β B. [22]

A pesar de lo anterior, la arquitectura de los complejos de señalización en los que participan los receptores TLR4 no está descrita cabalmente debido a la falta de métodos confiables para estudiar tales interacciones, así como las debilidades inherentes de las interacciones intra e inter-proteína en los complejos transitorios. [22]

1.1.3. Péptidos penetrantes celulares: herramientas para la entrega intracelular

Durante los últimos años, se ha visto incrementada sustancialmente la producción de moléculas con fines terapéuticos de mayor tamaño tales como proteínas, péptidos y ácidos nucleicos. Sin embargo, su desarrollo está restringido a aspectos muy específicos tales como su baja estabilidad *in vivo*, falta de absorción celular y capacidad insuficiente para alcanzar su objetivo. Esto está asociado con la pérdida total de su potencia farmacéutica o, al menos, con el requerimiento de dosis elevadas y un mayor riesgo de efectos secundarios. Según esto, el desarrollo de sistemas eficientes de entrega apunta a superar tales barreras. [23, 24]

Si bien se han intentado implementar estrategias no virales tales como formulaciones lipídicas, poliméricas [25] y otras basadas en nanopartículas y péptidos, sólo una pequeña porción de ellas son aplicadas en forma eficiente *in vivo* tanto en pruebas pre-clínicas como clínicas. Una de ellas corresponde al uso de péptidos celulares penetrantes (*cell-penetrating peptides*, CPP's en inglés), los cuales corresponden a péptidos sintéticos de una extensión no superior a 30 aminoácidos capaces de desencadenar el movimiento de la carga a través de la membrana celular hacia el citoplasma de las células y mejorar su trayecto intracelular, facilitando la interacción con su objetivo. Pueden transportar ADN plasmidial, oligonucleótidos, ARN pequeño de interferencia (*small interfering RNA*, siRNA en inglés), proteínas, péptidos y liposomas dependiendo de la estrategia de unión que se utilice [23]. Existen diversos tipos de CPP's entre los cuales destacan los basados en proteínas con dominios de transducción (*protein transduction domains*, PTD's en

inglés). En esta categoría, se encuentran el péptido penetratina extraído del homeodominio de la proteína Antennapedia descrita en la especie *Drosophila* y el péptido TAT derivado del virus de inmunodeficiencia humano tipo I (HIV-1) [25]. No obstante, existen otros péptidos de señalización basados en el rol importante que ejerce la presencia de cargas positivas en el proceso de traslocación tales como las polilisinas, polihistidinas y poliargininas [25]. Por último, la existencia de una correspondencia entre la eficiencia de internalización y el carácter anfipático de los péptidos de señalización ha contribuido al uso experimental de estos últimos, destacándose las familias MAP, MPG y Pep. [25]

1.1.4. Péptidos señuelos: herramientas para la interrupción de cadenas de señalización

Los péptidos señuelos son pequeñas secuencias de aminoácidos que representan zonas específicas de una proteína que participa de algún proceso de señalización celular. Si bien se han utilizado con el propósito de identificar zonas de importancia biológica [26, 27], su principal aplicación está orientada al bloqueo que inducen sobre la vía de señalización al competir por la unión al sitio de interacción de otras proteínas requeridas en dicho proceso. [28, 29]

El diseño de péptidos señuelos corresponde a un acercamiento racional para el desarrollo de inhibidores de los receptores TLR en los que péptidos derivados de las proteínas de señalización actúan como competidores de la proteína parental previniendo la transducción de la señal por una vía de señalización específica. [30]

1.2. Descripción del proyecto

El presente trabajo consistió en desarrollar el modelamiento matemático de la interacción entre péptidos señuelos penetrantes tipo TIR (BBP's) y el receptor TLR4, lo cual forma parte de los objetivos del proyecto de investigación FONDECYT de iniciación 11080016 dirigido por el académico José Cristian Salgado Herrera, perteneciente a la Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas de la Universidad de Chile.

El proyecto contempló una duración de dos semestres de trabajo en que fue utilizado, en primer término, Autodock Vina para determinar las interacciones moleculares, proceso conocido como *docking*, entre proteína y ligando cuyo objetivo consistió en determinar los sitios de unión preliminares entre los receptores TLR4 y los péptidos de bloqueo. Posteriormente, los resultados obtenidos fueron sometidos a simulaciones de dinámica molecular realizadas a través del programa GROMACS para describir su comportamiento bajo condiciones intracelulares estándar y caracterizar los sitios de unión y tipos de contactos establecidos en el tiempo.

En base a los resultados de estas simulaciones, se realizó un proceso de estimación de la variación de energía libre de los complejos proteína-ligando basado en la metodología MM-PBSA cuyo objetivo estuvo centrado en analizar la factibilidad termodinámica de los contactos evidenciados durante la dinámica molecular.

La simulación de los fenómenos de interacción proteína-ligando es un proceso de alta complejidad, requiriendo de una elevada cantidad de recursos computacionales y largos períodos de tiempo para obtener sus resultados. Debido a lo anterior, el desarrollo del proyecto fue llevado a cabo en el cluster "Eowyn" perteneciente al Laboratorio de Modelamiento de Procesos y Cómputo Distribuido (PMDC en inglés) del Departamento de Ingeniería Química y Biotecnología (DIQBT) de la Universidad de Chile.

1.3. Motivación y justificación del proyecto

Existen diversas patologías que involucran respuestas no controladas de carácter inflamatorio. Tal es el caso de la sepsis, enfermedades autoinmunes, aterosclerosis, artritis reumatoide, entre otros. Los estudios vigentes señalan que un elemento común en el desarrollo de tales patologías es la síntesis de prostaglandinas, autacoides derivados de lípidos generados a partir del metabolismo secuencial del ácido araquidónico por enzimas ciclooxigenasas y prostaglandin sintetasas luego de su liberación de la membrana celular por la acción de la enzima fosfolipasa A2. Según la vía de síntesis, pueden generarse cinco tipos de prostaglandinas cuya producción en un cierto tipo de célula está condicionada al perfil de expresión individual de las enzimas prostaglandin sintetasas. [31–33]

Las prostaglandinas son permanentemente producidas y actúan localmente en forma autocrina o yuxtacrina, obteniéndose un conjunto diverso de efectos farmacológicos que modulan sistemas fisiológicos tales como el sistema nervioso central, cardiovascular, gastrointestinal, genitourinario, endocrino, respiratorio e inmune. Además, su síntesis está implicada en una amplia gama de enfermedades que incluyen cáncer, enfermedades cardiovasculares e hipertensión y producen, entre otros efectos, vasodilatación, facilitación de la transmisión de dolor por inflamación, aumento de la permeabilidad microvascular e hiperalgesia inflamatoria. Su importancia fisiológica, al ser potentes mediadores pro-inflamatorios, está destacada por el uso de drogas antiinflamatorias no esteroideas inhibidoras de ciclooxigenasa (*NSAID's* en inglés) en el tratamiento clínico de varias enfermedades. [31–33]

La enzima ciclooxigenasa existe en dos formas principales que difieren en su distribución en los tejidos y la regulación de su expresión [32, 33]. Si bien existen excepciones, la enzima COX-1 se expresa en forma constitutiva en varios tejidos, mientras que la expresión de la enzima COX-2 es inducible principalmente en respuesta a citoquinas pro-inflamatorias y estímulos tales como LPS. De acuerdo a esto, las prostaglandinas generadas a partir de COX-1 están suscritas al rol de la homeostasis fisiológica, mientras que las provenientes de COX-2 son responsables de los efectos inflamatorios.(21) [32]

Si bien los *NSAID's* son efectivos frenando la síntesis de prostaglandinas, su uso prolongado o la ingesta de altas dosis puede traer efectos colaterales gastrointestinales [34,35] como disminución del apetito, náuseas, vómitos, úlceras estomacales y duodenales, diarreas, entre otros. También puede inducir fallas cardíacas [36,37] y aumento de la presión sanguínea [38], alergias cutáneas [39] y fallas renales [40], eventos que alteran aún más la calidad de vida del paciente.

Teniendo estos antecedentes, sumado al hecho de que la cadena de señalización vía receptor TLR4 genera los estímulos necesarios para la expresión de la enzima COX-2 y la consecuente generación de prostaglandinas, representa un desafío emplear péptidos señuelos acoplados a péptidos celulares penetrantes como terapia para controlar las respuestas inflamatorias sin generar los efectos adversos propios del uso de *NSAID's*.

El desarrollo del proyecto se justifica por los resultados obtenidos experimentalmente en otras investigaciones asociadas al uso de péptidos señuelos en el bloqueo de la cadena de señalización vía receptor TLR4 [26–30]. Estos indican la efectividad de su uso, sin embargo, no explican a cabalidad las razones del por qué logran tal objetivo. Esta es la principal razón por la cual se requiere, además del entendimiento biológico del fenómeno de interacción molecular, la aplicación de ingeniería en la construcción de modelos que permitan vincular propiedades específicas de los péptidos de bloqueo, tales como su composición aminoacídica, características electrostáticas, distribución hidrofóbica y geometría, con las propiedades del sitio de unión. El éxito de este proyecto puede conducir a explicar la efectividad de diversos péptidos de bloqueo y, en el futuro, ser piedra fundamental en su optimización.

En este sentido, la formación que reciben los ingenieros civiles en biotecnología hace factible la concreción del proyecto, por cuanto tienen conocimiento acerca de las bases biológicas y moleculares

que rigen el fenómeno de interacción proteína-ligando, las bases matemáticas y computacionales para el entendimiento y uso de los programas requeridos para simular las interacciones y construir el modelo de optimización basado en el análisis estadístico de los resultados obtenidos.

Capítulo 2

Objetivos y Limitaciones

2.1. Objetivo General

Comprender los mecanismos fisicoquímicos que permiten el funcionamiento de los péptidos BBP's como bloqueadores de la cadena de señalización del receptor TLR4.

2.2. Objetivos Específicos

Con la idea de alcanzar el principal objetivo planteado, es que se han definido los siguientes objetivos específicos.

- Comprender el funcionamiento de las cadenas de señalización en la generación de la respuesta inmune donde participa el receptor TLR4.
- Determinar ventajas y desventajas de los distintos programas y algoritmos para la realización del docking.
- Determinar las conformaciones más estables para la interacción proteína-ligando utilizando los programas y algoritmos seleccionados.
- Refinar los resultados del docking mediante técnica de dinámica molecular.
- Identificar patrones de interacción.
- Estudiar el efecto de la presencia de solvente acuoso en la interacción proteína-ligando.

2.3. Limitaciones

El proyecto se centra en la construcción de un modelo matemático en base al análisis estadístico de los resultados obtenidos a partir de la interacción de péptidos de bloqueo confeccionados a partir de las secuencias aminoacídicas de los adaptadores MyD88, Mal, TRIF y TRAM. Según esto, no serán estudiados

otros péptidos de bloqueo de características virales o de una procedencia diferente de las vías de señalización involucradas.

En cuanto al tipo de receptor estudiado, se ha definido en primer término estudiar la vía de señalización que involucra la formación del homodímero de receptores TLR4 dado los tiempos de trabajo previamente establecidos. Sin embargo, el estudio podría contemplar el análisis de otros receptores tales como TLR2 si es que se cuenta con tiempo suficiente para realizar la búsqueda de antecedentes bibliográficos y las simulaciones necesarias.

Capítulo 3

Discusión Bibliográfica y Metodológica

3.1. Vías de señalización TLR4-TLR4: características y elementos constituyentes

3.1.1. Descripción de las vías de señalización TLR4-TLR4

El proceso de generación de respuestas inflamatorias (figura 3.1) se inicia con el reconocimiento de un ligando específico facilitado por proteínas presentes en el medio extracelular y otras proteínas transmembrana que genera un proceso de dimerización tanto de los dominios extracelulares como citoplasmáticos de dos receptores TLR4 [41]. Esto último es un evento trascendental en la vía de señalización ya que permite continuar con el proceso de señalización [42, 43] al generar nuevas superficies de interacción donde son capaces de interactuar otras proteínas adaptadoras [20, 44], lo cual también ha sido observado en otras clases de receptores denominados IL-1R [45] con quienes presentan un alto grado de homología [14].

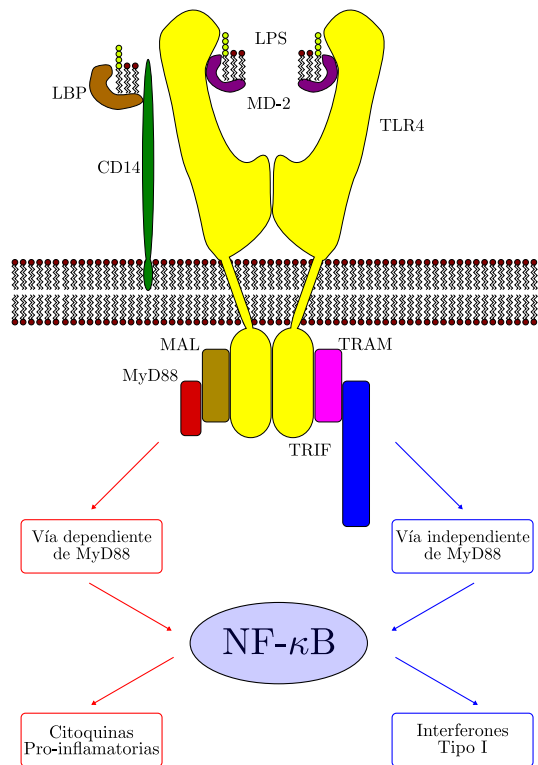


Figura 3.1: Esquema general de las vías de señalización donde interviene el homodímero de TLR4 (adaptado de [16])

Se han descrito dos vías de señalización independientes por las cuales se generan las respuestas inflamatorias [16] (figura 3.1). Uno de ellas, denominada vía dependiente de MyD88, involucra inicialmente a las proteínas adaptadoras MAL y MyD88 [16, 46, 47]. MAL interactúa directamente con el homodímero de TLR4, facilitando el acoplamiento de MyD88 a dicho complejo [47]. Esto desencadena una serie de acontecimientos que, en conjunto con otras moléculas, deriva en la activación de factores de transcripción tales como IRF5, AP-1 y NF- κ B, los cuales están asociados a la expresión de genes ligados a la síntesis de citoquinas pro-inflamatorias e interferones tipo I (figura 3.2). [16]

Por su parte, la vía independiente de MyD88 requiere de las proteínas TRAM Y TRIF como puntos de partida de la señalización [16]. TRAM, análogamente a la función de MAL, se asocia directamente al homodímero de TLR4 y permite al acoplamiento posterior de TRIF a dicho complejo [48]. Los eventos sucesivos que ocurren repercuten finalmente en la activación de los factores de transcripción NF- κ B, AP-1 y IRF3 que son capaces de inducir la expresión de genes ligados a la síntesis de interferones tipo I [49] y citoquinas pro-inflamatorias (figura 3.2). [16]

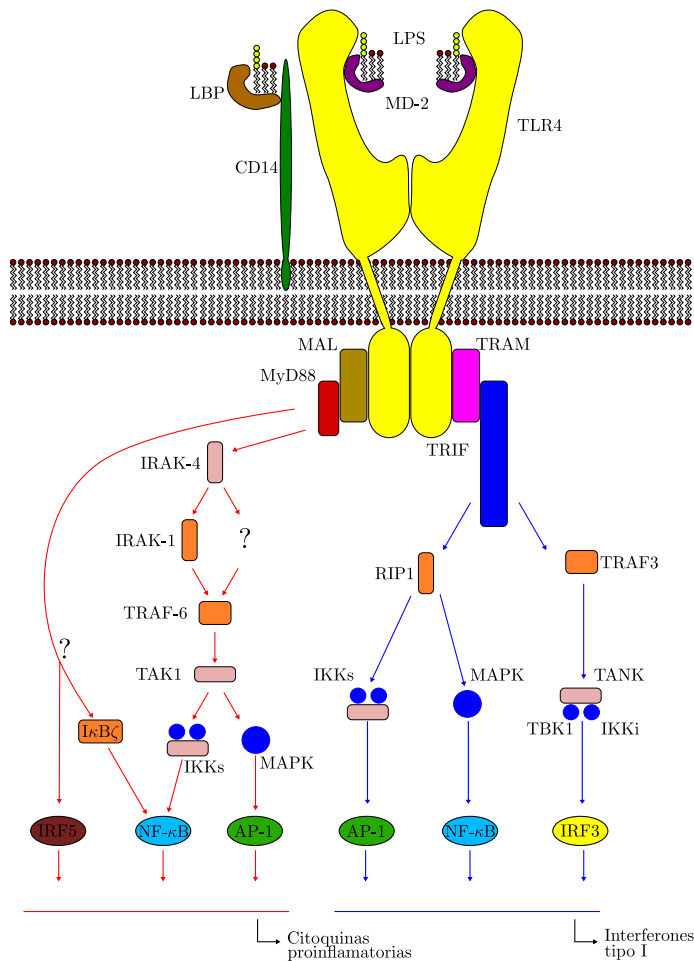


Figura 3.2: Esquema detallado de las vías de señalización donde interviene el homodímero de TLR4 (adaptado de [16])

3.1.2. Receptores TLR4

Los receptores TLR4, identificados por primera vez a través del estudio realizado por Medzhitov [14], son proteínas transmembrana tipo I que cuentan con un dominio extracelular definido por secuencias ricas en leucina ubicadas en tándem y un dominio citoplasmático homólogo a la proteína Toll identificada en la especie *Drosophila*, comúnmente conocido como dominio TIR. El mismo estudio [14] establece que es capaz de inducir la expresión del factor de transcripción NF- κ B, elemento responsable de la expresión de genes asociados a la síntesis de citoquinas pro-inflamatorias tales como IL-1, IL-6 e IL-8, asignándole de esta manera una función como componente importante del sistema inmune en humanos.

A pesar de contar con su secuencia, no existe a la fecha una estructura completa y precisa obtenida a través de cristalografía o resonancia magnética nuclear del receptor TLR4, disponiéndose únicamente de modelos parciales de su ectodominio unidos a determinados ligandos [50]. Esta información, aunque representa un aporte para los fenómenos que ocurren en el medio extracelular, no establece directrices acerca del carácter dinámico de sus interacciones ni de los eventos que induce en su dominio citoplasmático, específicamente sobre eventuales cambios conformacionales y/o interacciones entre los dominios citoplasmáticos de dos receptores TLR4 según lo observado en los ectodominios.

Según lo anterior, a partir de receptores TLR diferentes cuyas estructuras sí se han obtenido a partir de estudios cristalográficos en calidad de monómero (TLR1 y TLR2) [51] y homodímero (TLR10) [52],

se han elaborado modelos por homología de los dominios TIR de los receptores TLR4 [20, 22, 53, 54] así como estudios de acoplamiento orientados a definir su homodimerización [20, 22, 54]. Todos los modelos resultantes se caracterizan por contener cinco láminas β paralelas (βA - βE) rodeadas por un total de cinco hélices α (αA - αE), los cuales guardan similitud con las estructuras de referencia. En concordancia con el estudio desarrollado por Xu y cols. [51], la mayoría de los residuos conservados de TLR4 con respecto a otros receptores TLR descritos están ubicados en su núcleo hidrofóbico constituido por las láminas β centrales que no representan zonas de interacción con otras moléculas [54]. Las regiones expuestas al medio intracelular están determinadas por las hélices α y los *loops* correspondientes a las regiones localizadas entre una hélice α y una lámina β (figura 3.3).

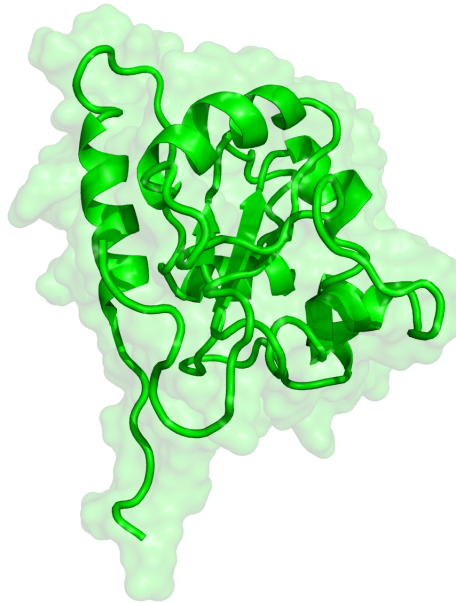


Figura 3.3: Estructura tridimensional del receptor TLR4
(modelo presentado por Salgado y cols.)

Si bien los modelos del homodímero de TLR4 presentan ciertas diferencias [20, 22, 54], todos ellos presentan una simetría axial en donde la interacción entre ambos dominios TIR se da a través de sus respectivos *loop* BB y la hélice αC . El estudio efectuado por Basith y cols. [22] identifica que la interfase generada representa un núcleo hidrofóbico rodeado por una red de puentes de hidrógeno. Dicha región hidrofóbica está constituida principalmente por aminoácidos del *loop* BB, los cuales intervienen en forma importante en la estabilidad de dicha zona del dominio TIR, fenómeno observado en otros receptores TLR tales como TLR1 y TLR2. [51]

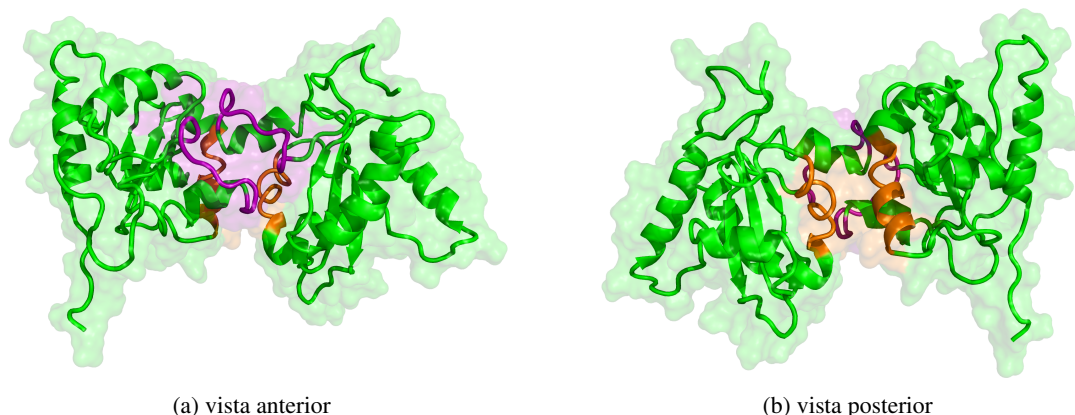


Figura 3.4: Estructura tridimensional del homodímero de TLR4
(modelo presentado por Salgado y cols.)

■ : hélice αC ■ : *loop* BB

De acuerdo a los estudios de mutagénesis sitio dirigido sobre los receptores TLR4 [20, 55, 56], se pudo identificar que las mutaciones realizadas sobre la hélice αC y el *loop* BB por residuos de alanina inciden directamente en la generación de receptores no funcionales. Específicamente, el impacto de las mutaciones en esta última zona resultan ser críticas en la funcionalidad de la vía de señalización. [20, 55, 56]

El estudio de Núñez y cols. [20] establece que las regiones L705-S730, sector que incluye la lámina βB , el *loop* BB y la hélice αB , e I734-F759, sector que incluye la lámina βC , el *loop* CC y la hélice αC , están involucrados en el proceso de homodimerización de TLR4. Junto con esto, establece que las regiones F677-E698, sector que comprende principalmente el *loop* AA y la hélice αA , e I734-F759 participan en la generación de interacciones con MAL, mientras que la región L705-S730 representa una zona de interacción con TRAM. De igual forma, postula que la región L795-L815, sector que incluye la lámina βE , el *loop* EE y la hélice αE , puede corresponder a una zona de interacción con otras proteínas adaptadoras tales como MyD88. Tales sitios de interacción guardan similitud con los descritos en el estudio de Basith y cols. [22].

3.1.3. Vía dependiente de MyD88

En su etapa inicial, esta vía de señalización es dependiente de los receptores TLR4 y de las proteínas adaptadoras MAL y MyD88. La figura 3.5 muestra el alineamiento de secuencias entre estas proteínas, dejando de manifiesto la existencia de regiones altamente conservadas en sus dominios TIR conocidas como *boxes*. La proteína MyD88 está compuesta por un dominio DD (*Death Domain* en inglés) en su extremo N-terminal, una región interior y un dominio Toll en su extremo C-terminal [45]. A diferencia de MyD88, la proteína MAL cuenta con una región N-terminal más corta y carece de un dominio DD, sin embargo, su extremo C-terminal corresponde a un dominio TIR, el cual cuenta con las regiones *box* 1 y *box* 2, careciendo del *box* 3 presente tanto en MyD88 como en TLR4. [47]

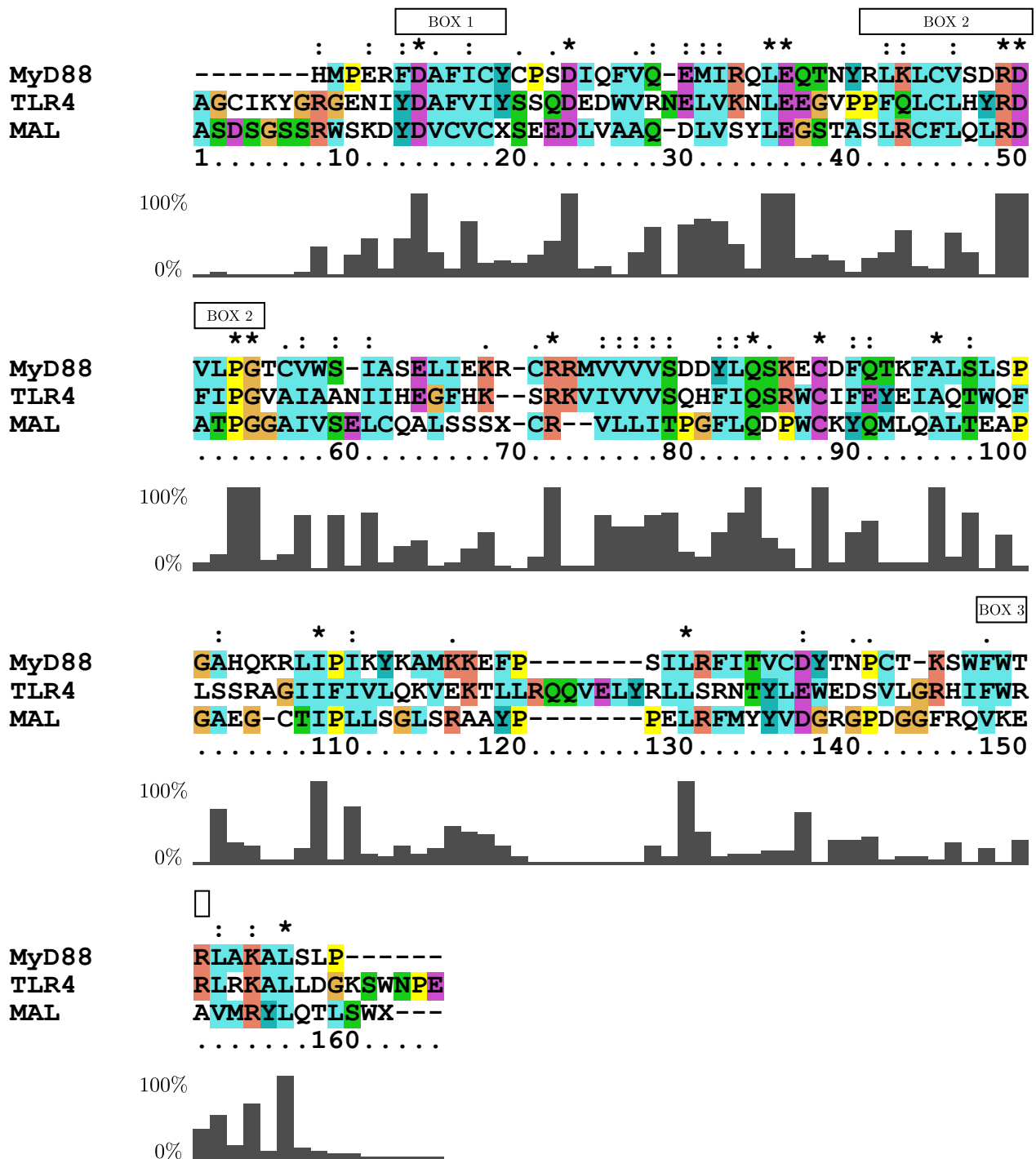


Figura 3.5: Alineamiento de las secuencias de los dominios TIR de las proteínas MyD88, TLR4 y MAL utilizadas por Salgado y *cols.*

Color definidos según programa

Símbolos adicionales indican grados de conservación: * : idénticos; :: sustitución conservada; : sustitución semi-conservada

Barras señalan conservación del aminoácido en la ubicación correspondiente

3.1.3.1. MyD88

A través del estudio de Burns y *cols.* [45], se pudo constatar que MyD88 es capaz de formar homodímeros a través de interacciones entre sus dominios DD y TIR, planteando como hipótesis que ambos dominios podrían permitir la formación de estructuras homo-oligoméricas más complejas a través de fenómenos de agregación. A pesar de demostrarse su participación en otras vías de señalización celular [45], su influencia en las que participan los receptores TLR4 fue descrita a través del estudio de Medzhitov y *cols.* [46] que evaluó la influencia de los dominios DD y TIR de MyD88 en la señalización mediante estos receptores, observándose que la sobreexpresión de este último bloqueaba considerablemente su activación, mientras que el dominio DD sólo lograba un efecto atenuado sobre el bloqueo.

Adicionalmente, a partir de pruebas de inmunodetección y expresión de MyD88 carentes de su dominio TIR, se pudo detectar que sólo la proteína completa lograba asociarse con el receptor TLR4, evento que no fue posible verificar utilizando sólo el dominio DD. Esto trajo como conclusión del estudio que el dominio citoplasmático de los receptores TLR4 está involucrado en la asociación con el dominio TIR de MyD88 mediante interacciones homofílicas [46]. Esta información fue recogida por el estudio de Gong y *cols.* [54], el cual estableció modelos de interacción que involucraban la formación del homodímero de MyD88, el homodímero de TLR4 y el tetrámero resultante.

Un aspecto clave que recogen estos modelos está ligada a la evidencia experimental acerca de la importancia del *loop* BB de MyD88, región fundamental en su homodimerización y en la continuidad de la vía de señalización que involucra a los receptores IL-1R [57,58] que, como ya fue mencionado anteriormente, presentan un alto grado de homología con los receptores TLR4.

Mientras que los estudios de Burns [45] y Medzhitov [46] establecen sus conclusiones en ausencia de ligandos reconocidos por los receptores TLR4, el estudio elaborado por Laird y *cols.* [59] considera la presencia de LPS en algunas pruebas experimentales, el cual es capaz de activar la vía de señalización TLR4-TLR4. Junto con corroborar que los dominios DD y TIR de MyD88 están involucrados en su homodimerización, atribuye a sus primeros treinta aminoácidos del extremo N-terminal del dominio TIR pertenecientes a la hélice α B una función estabilizadora que fortalece su interacción con el homodímero de TLR4. De esta manera, propone un modelo de interacción en que el homodímero de MyD88 se produce sin requerir la activación de los receptores TLR4 y, al ocurrir este último evento, su unión al homodímero de TLR4 es posible en presencia de MAL y es estabilizada por una proteína denominada PI3K. [59]

El trabajo de Ohnishi y *cols.* [60] logró describir la estructura del dominio TIR de MyD88 en solución a través de espectroscopía por resonancia nuclear magnética. Caracterizado por cinco láminas β paralelas (β A - β E) rodeado por cuatro hélices α (α A - α C y α E), presenta un plegamiento similar al observado en las estructuras cristalográficas de los dominios TIR de TLR1, TLR2 y TLR10. [60]

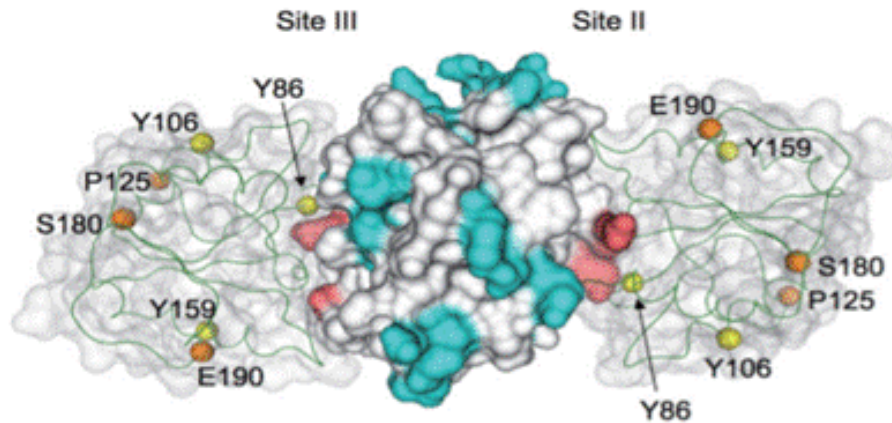


Figura 3.6: Estructura tridimensional de MyD88 en asociación a MAL
(extraído de [60])

A través de estudios de mutagénesis de aminoácidos asociados fuertemente a los *boxes* 1, 2 y 3 por alaninas, se pudo identificar una disminución considerable de la señalización inducida por LPS. Mediante ensayos de *pull down*, se pudo demostrar que dichas mutaciones inducidas en el loop BB (sitio II) y la hélice α E (sitio III) de MyD88, específicamente en el reemplazo de los residuos de arginina presentes en dichos sitios, contribuyen a una disminución moderada de la afinidad de los dominios TIR de MyD88 y MAL. No obstante, la presencia de ambas mutaciones trae consigo una pérdida total de la dicha interacción, situación que no se observa para el residuo de arginina presente en la hélice α C (sitio I). De acuerdo a estas observaciones, ambos sitios son fundamentales en establecer la interacción con MAL. [60]

Los residuos de arginina y ácido aspártico que forman parte del *loop* BB de MyD88 son fundamentales en su asociación con MAL, sin embargo, el residuo de arginina que forma parte de la hélice α C no presenta interacciones con MAL, TLR4 e IRAK4, estableciendo que dicha región puede servir como superficie de contacto con una proteína adaptadora distinta o bien con la membrana plasmática. Por otro lado, dado que los sitios II y III están ubicados distantes entre sí y en superficies moleculares opuestas, se plantea la posibilidad de que MyD88 es capaz de formar trímeros con dos moléculas de MAL cuyo modelo establecido mediante técnicas de *docking* indica que los residuos de dichos sitios están ubicados en los centros de las interfases generadas, manteniendo la correspondencia con evidencia experimental acerca de polimorfismos y fosforilación de residuos específicos que afectan la interacción entre estas proteínas y otras que forman parte de la vía de señalización dependiente de MyD88 mediada por TLR4. Dado que este estudio no utiliza elementos que forman parte de otras vías de señalización alternativas, plantea como hipótesis la existencia de una vía de señalización independiente de MAL en virtud de evidencia experimental que señala la existencia de interacciones débiles entre MyD88 fusionado a un dominio PIP2 de integración a la membrana plasmática con TLR4. [60]

El estudio de Basith y cols. [22] considera la formación de hexámeros TLR4-MAL-MyD88 a través de herramientas de *docking*. A través de estas, logra asignarle una importancia a los *loops* BB de MyD88 que, a través de la formación de puentes salinos, logra establecer interacciones con las láminas β E del homodímero. Adicionalmente, le asigna importancia a la hélice α A de MyD88 en la generación de puentes salinos con el homodímero.

3.1.3.2. MAL

El estudio de Fitzgerald y cols. [47] permitió establecer vínculos entre la activación de la vía de señalización TLR4-TLR4, MAL y MyD88, demostrando que MAL participa en dicha vía a través de la formación de un heterodímero con MyD88, favoreciendo la generación de una respuesta óptima y rápida a la estimulación con LPS. Uno de los aspectos clave de este estudio [47] corresponde a la importancia del residuo de prolina presente en el *box 2* de MAL que, al ser mutado por histidina, no es capaz de generar la activación del factor de transcripción NF- κ B.

El estudio de Valkov publicado recientemente logró establecer la estructura cristalográfica del dominio TIR de MAL, el cual indica la existencia de cinco láminas β paralelas ($\beta A - \beta E$) rodeado por cuatro hélices α (αA y $\alpha C - \alpha E$). De acuerdo a los antecedentes previamente presentados, el plegamiento observado difiere de las estructuras de otros dominios TIR ya que carece de un segmento correspondiente a la hélice αB entre las láminas βB y βC , trayendo como consecuencia la existencia de un loop AB extenso que conecta la hélice αA y la lámina βB . Según esto, si bien no existe el loop BB en forma separada, el loop AB presenta las particularidades de dicha región. [61]

De igual manera, tal cual fue demostrado por el estudio de Fitzgerald y cols. [47], se pudo constatar la existencia de homodímeros de MAL, los cuales fueron identificados en dos estados de conformación. Uno de ellos, definido como modelo N°1, es de carácter simétrico en donde los aminoácidos que componen la interfase pertenecen a la hélice αC y al loop DD, mientras que el loop AB de ambos monómeros no participan en la formación de la interfase, encontrándose expuestos en lados opuestos del complejo. Por su parte, el modelo N°2 es asimétrico y en cuya interfase participa el región N-terminal y el loop AB de uno de los monómeros. Sin embargo, dada su mayor superficie de interacción y la orientación de sus extremos N-terminal hacia la misma dirección que permitiría la asociación a la membrana, el modelo N°1 representa de mejor manera lo que ocurre en proteínas que interactúan con la membrana plasmática caracterizadas por una direccionalidad que conduce a interacciones proteína-lípido termodinámicamente más favorables [61]. Junto con esto, el análisis de mutagénesis sitio dirigida efectuado sobre MAL estableció que el residuo D96, perteneciente al loop AB, y la región LQALT correspondiente a la hélice αC son fundamentales en la asociación con MyD88. [61]

El estudio de Núñez y cols. [20], a través de la identificación de sitios funcionales, establece que las regiones de MAL C89-V104, sector correspondiente al *loop AA* y regiones parciales de la lámina βA y la hélice αA , R121-S139, sector que contempla en forma sustancial el *loop BB* y la totalidad de la hélice αB , y L146-P169, región que contempla principalmente la hélice αC y parte del *loop CD*, establecen interacciones directas con el homodímero de TLR4.

3.1.4. Vía independiente de MyD88

La vía independiente de MyD88 considera inicialmente a las proteínas TRAM y TRIF. De forma general, la proteína TRIF cuenta con un dominio TIR localizado seguido por un dominio rico en prolina hacia el extremo C-terminal y con tres *motifs* asociados a la unión de la proteína TRAF6 hacia su extremo N-terminal [48]. La estructura de la proteína TRAM está determinada por un dominio rico en serina y treonina en su extremo N-terminal, un dominio TIR y un extremo C-terminal de veinte aminoácidos [48]. Específicamente, su dominio TIR presenta mayor grado de homología con el dominio TIR de TRIF en comparación a los mismos dominios de MyD88 y MAL, careciendo de las secuencias conservadas presentes en estas dos últimas proteínas mencionadas [62]. Adicionalmente, el residuo de prolina localizado en el loop BB, indicado como esencial en la señalización mediada por dominios TIR, está localizado en la posición anterior al sitio conservado, ubicándose en dicha posición un residuo de cisteína. [48]

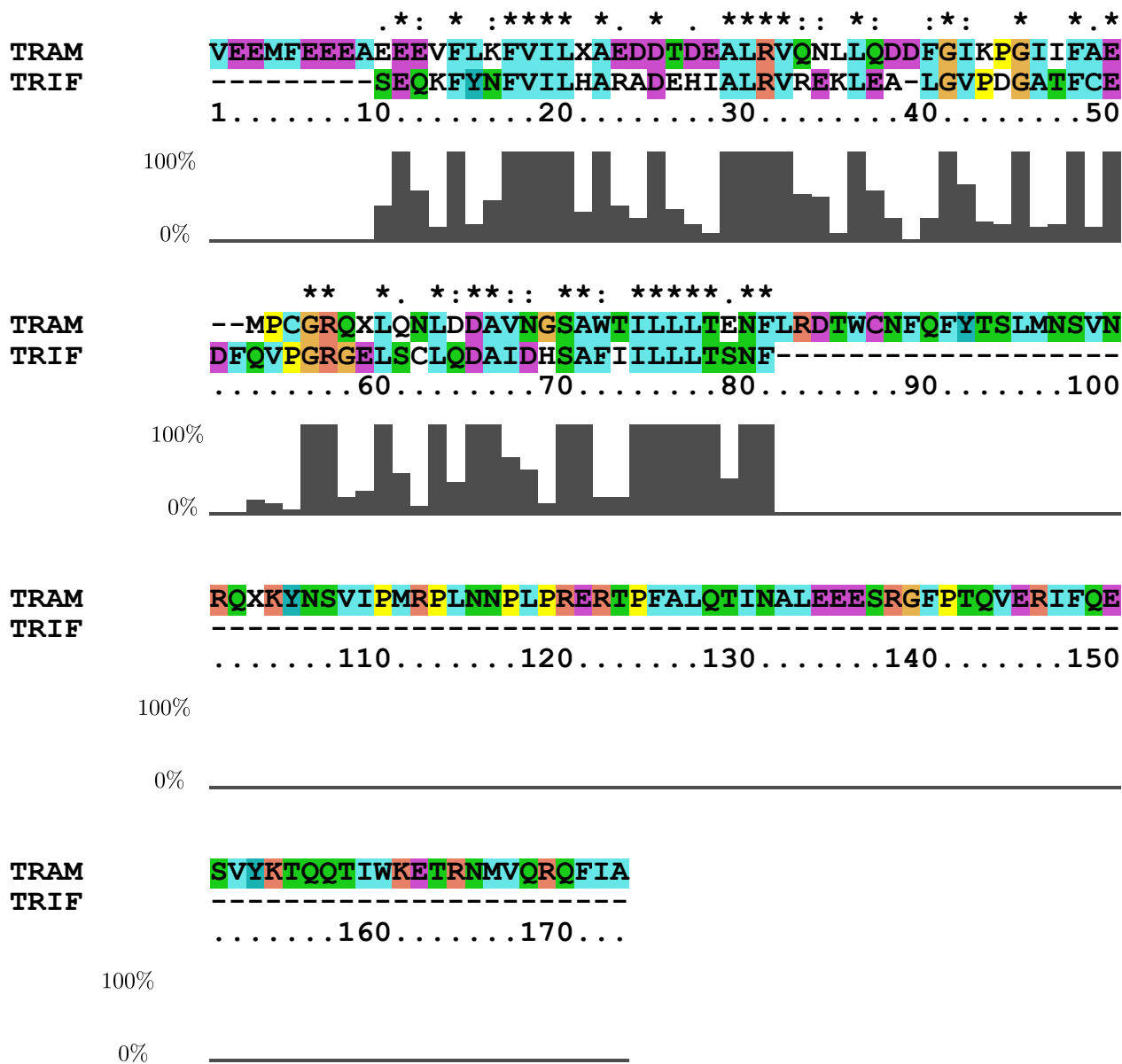


Figura 3.7: Alineamiento de las secuencias de los dominios TIR de las proteínas TRAM y TRIF

Color definidos según programa

Símbolos adicionales indican grados de conservación: * : idénticos; : : sustitución conservada; . : sustitución semi-conservada

Barras señalan conservación del aminoácido en la ubicación correspondiente Secuencia del dominio TIR de TRAM presentada por Salgado y cols. Secuencia del dominio TIR de TRIF extraída de base de datos UNIPROT (Q8IUC6[390-460])

3.1.4.1. TRIF

A través de estudios realizados por Yamamoto, se pudo corroborar que la activación de la vía de señalización de los receptores TLR4 con LPS en presencia de TRIF indujo la expresión de IFN- β y otros genes inducibles por interferones independiente de la acción de MyD88 que derivan en la síntesis de proteínas tales como RANTES, IP-10 y MCP-1. En efecto, la deficiencia de TRIF en ratones logró demostrar una expresión muy reducida de dichos genes, generando respuestas inflamatorias muy débiles al LPS. [49]

No obstante, la evidencia experimental más relevante es que la vía dependiente de MyD88 conduce a

una activación temprana de NF- κ B y las quinasas MAP, mientras que la vía independiente de MyD88 es capaz de activarlas en un proceso más lento. Esto pudo ser corroborado gracias al bloqueo de la expresión de TRIF que no logró impedir la activación casi normal de NF- κ B y JNK, situación que tampoco pudo detenerse en estudios previos del bloqueo de la expresión de MyD88. Sin embargo, el bloqueo de la expresión de ambas proteínas logró inhibir completamente la activación de NF- κ B y JNK, además de la anulación en la expresión de RANTES, IP-10 y MCP-1, demostrándose de esta manera que TRIF es esencial para la activación de la vía de señalización independiente de MyD88 mediada por TLR4. [49]

El mismo estudio fue capaz de identificar que los ratones deficientes en TRIF no eran capaz de producir cantidades similares de citoquinas pro-inflamatorias, ante lo cual sus autores proponen un sistema cooperativo entre ambas vías de señalización en su producción. En efecto, se demostraría posteriormente que las quinasas de tipo I κ B (IKKs), IKK ϵ y TBK1, activan NF- κ B y IRF-3 posteriormente en la vía de señalización independiente de MyD88, induciendo la expresión de IFN- β . [49]

3.1.4.2. TRAM

A través del estudio de Yamamoto y *cols.* [49] fue posible determinar que los niveles de expresión de IFN- β , IP-10 y RANTES inducidas por LPS fueron diferentes en células nativas y células deficientes de TRAM. Dado que estas proteínas son sintetizadas a través de la vía de señalización independiente de MyD88 mediada por TLR4, TRAM ejerce control sobre dicha vía [49]. En efecto, la deficiencia de TRAM no permite la activación de IRF-3 a través de la formación de homodímeros al inducirlas con LPS y tampoco la fosforilación de la proteína STAT-1 dependiente de IFN- β . Junto con lo anterior, las células deficientes de TRAM indican que la fase tardía de activación de NF- κ B y JNK se ve seriamente comprometida. [62]

El estudio de Oshiumi [48] pudo demostrar que TRAM se asocia fuertemente al dominio TIR de TLR4, situación contraria a la observada en la estructura mutada de TLR4 que incluye la mutación del residuo de prolina conservado por histidina en el loop BB. Junto con esto, estableció con evidencia experimental que TRIF no se asocia a TLR4 ni a su versión mutada, demostrando que TLR4 es capaz de asociarse con TRIF sólo en presencia de TRAM. Respecto a esto último, la mutación de los residuos de prolina y cisteína ubicados en el loop BB de TRAM por histidinas impedían la dimerización con TRIF. [48]

Finalmente, este estudio demuestra, a través de estudios de sobreexpresión y silenciamiento de genes de ambas proteínas, que la presencia de TRAM y TRIF es crucial para la activación de IRF-3 y posterior inducción de IFN- β , atribuyéndole a TRAM una función principalmente ligada a la vía de señalización independiente de MyD88 mediada por TLR4, mientras que TRIF corresponde a un factor crítico en la activación de IRF-3 por esta vía. [48]

El estudio de Núñez y *cols.* [20] elabora un modelo tridimensional de TRAM realizado a través de modelamiento por homología a partir de las estructuras descritas para TLR1 y TLR2, el cual consta de cinco láminas β rodeadas por cinco hélices α . De acuerdo al análisis de sitios funcionales efectuado en este estudio, se pudo constatar que las regiones definidas por E72-L94, correspondiente a un sector que incluye la lámina β A, el *loop* AA y la hélice α A, e I136-Q164, la cual considera la lámina β C, la hélice α C y el *loop* CD, participan de la interacción con el homodímero de TLR4. En lo que respecta a los contactos que establece con TRIF, se postula que las regiones I171-P181, correspondiente a un sector de la lámina β D y el *loop* DD, y Q218-R226, correspondiente a un sector del *loop* EE y la hélice α E.

3.2. Péptidos de Bloqueo

Los estudios de interacción proteína-proteína, desde la perspectiva experimental y computacional, han logrado establecer qué regiones presentan una importancia biológica asociada a distintos fenómenos entre los cuales destaca la activación de las vías de señalización donde participan los receptores TLR4. En este sentido, la información obtenida puede resultar no sólo en la identificación y descripción de regiones funcionales sino que, en forma complementaria, puede ser utilizada con fines terapéuticos.

La efectividad del péptido de bloqueo depende de muchos factores, sin embargo, se requiere cumplir previamente con su ingreso al interior de las células objetivo, propiedad que no es intrínseca de su secuencia. Las membranas de las células eucariontes y de sus organelos, así como la pared celular y membranas de microorganismos patógenos, constituyen una barrera importante para el acceso de drogas hidrofílicas u otras cargas biológicas a estructuras específicas presentes al interior de la célula. Se han empleado diversos métodos para llevar a cabo dicho procedimiento *in vitro* tales como el uso de vectores virales, electroporación, microinyección y el uso de liposomas. No obstante, su aplicabilidad de estas técnicas *in vivo* ha mostrado resultados limitados debido a su toxicidad, daño celular, inmunogenicidad, falta de especificidad y capacidad de entrega limitada [63]. Si bien lo anterior corresponden a limitaciones de las técnicas, las cargas pueden presentar debilidades asociadas a su baja estabilidad y rápida degradación, lo cual debe ser considerado en la elección del método adecuado de incorporación a la célula. [64]

En los últimos años, se ha logrado identificar que diversas proteínas tales como HIV-1 Tat, el homeodominio Antennapedia de la especie *Drosophila* y HSV-1 VP22 son capaces de traspasar la membrana celular, pudiendo alcanzar el núcleo sin perder su actividad biológica. Esto es posible ya que presentan dominios de transducción proteica (*protein transduction domain*, PTD en inglés) que, en el caso de Antennapedia y HIV-1 Tat, corresponden a un gran número de lisinas y argininas que le atribuyen características básicas. No obstante, el mecanismo de internalización no está descrito completamente, pudiendo identificarse en algunos estudios que dicho proceso no es bloqueado significativamente mediante incubación a bajas temperaturas, agotamiento del contenido de ATP intracelular o inhibidores de endocitosis. Otros establecen que tampoco depende de una secuencia primaria específica, descartando la dependencia al reconocimiento de algún receptor específico [65].

Si bien todos los estudios experimentales trabajan sobre el silenciamiento de genes y expresión de variantes mutadas de los receptores TLR4 y de las proteínas adaptadoras MAL, MyD88, TRAM y TRIF, la utilización de péptidos de bloqueo es un herramienta que no se utiliza frecuentemente en la determinación de propiedades funcionales. Uno de los estudios de Horng utiliza esta técnica para evaluar la capacidad del *loop* BB de MAL de competir con todo el dominio TIR de dicha proteína adaptadora por el acoplamiento a TLR4. Para estos efectos, se acoplado el péptido de traslocación correspondiente al homeodominio *Antennapedia* extraído del organismo *Drosophila* al extremo N-terminal del péptido de bloqueo correspondiente al *loop* BB. Los resultados mostraron una inhibición en la activación de NF- κ B inducida por LPS y, en consecuencia, no indujo la degradación de I κ B α , impidió la fosforilación de PKR y la activación de JNK. [66]

Si bien existen varias definiciones, los péptidos penetrantes de células (*cell-penetrating peptides*, CPPs en inglés) son un conjunto de secuencias solubles en agua y parcialmente hidrofóbicas, o bien péptidos polibásicos con carga neta positiva a pH fisiológico, cuya extensión máxima va entre los treinta y treinta y cinco aminoácidos y cumplen como función penetrar la membrana celular sin el uso de receptores ni generando daño significativos en esta [67]. Según sus características, son capaces de internalizar mediante interacciones electrostáticas o covalentes cargas biológicas activas con alta eficiencia y baja toxicidad tales como drogas [67], péptidos antigénicos, péptidos acoplados con ácidos nucleicos, oligonucleótidos antisentido, nanopartículas, liposomas [65] y ADN plasmidial [64]. Si bien no existe claridad acerca de los mecanismos involucrados en el proceso de internalización [64, 65, 67, 68], existe evidencia de que tanto procesos independientes de energía como fenómenos de endocitosis están involucrados, siendo estos últimos

los más comunes a bajas concentraciones de CPPs [67].

La acción terapéutica de los péptidos de bloqueo ha quedado de manifiesto en diversos estudios realizados por Toshchakov y Couture [26–29]. Uno de aquellos estudios corresponde a la evaluación del efecto inhibitorio de péptidos extraídos de los *loops* BB de las proteínas adaptadoras MAL, MyD88, TRAM y TRIF acoplados al péptido de traslocación *Antennapedia*. Se establece que el efecto inhibitorio de los péptidos de bloqueo puede ser ordenado de forma relativa como $\text{pepTRAM} \approx \text{pepMyD88} > \text{pepTRIF} > \text{pepMAL}$. Los efectos inhibitorios se observan en la expresión de genes responsables que codifican para cuatro citoquinas pro-inflamatorias: IL-1 β y MIP-1 β correspondientes a la vía dependiente de MyD88 e IFN- β y RANTES pertenecientes a la vía independiente de MyD88. De acuerdo a los resultados experimentales obtenidos, todos los péptidos de bloqueo utilizados ejercen un efecto inhibitorio evidente sobre IL-1 β , MIP-1 β e IFN- β , sugiriendo que estos actúan antes de que la señal sea enviada por ambas vías, presumiblemente a nivel del receptor. Además, es posible notar que la inhibición atribuible a estos péptidos se observa en un rango amplio de concentración entre 10 μM y 40 μM , siendo este último valor donde se observan los mayores efectos de pepTRAM y pepMyD88. [28]

Utilizando el mismo péptido de señalización, se estudian los efectos inhibitorios de los *loops* BB de los receptores TLR1/6, TLR2 y TLR4 donde resalta este último por su gran efecto inhibitorio sobre la expresión de ARN mensajero de IL1- β e IFN- β en comparación al resto a una concentración de 10 μM . No obstante, a una concentración de 40 μM el efecto de pepTLR4 es levemente superior al alcanzado con pepTLR2. Al igual que en el estudio anterior, este efecto inhibitorio sugiere que estos últimos dos péptidos bloquean alguna interacción anterior a la bifurcación entre las vías independiente y dependiente de MyD88. [29]

3.3. Programas de *docking*: criterios y análisis de selección

El *docking* molecular es un procedimiento de simulación computacional para predecir la conformación de un complejo receptor-ligando. Las simulaciones pueden ser usadas para reproducir datos experimentales a través de algoritmos de validación de *dockings*, donde las conformaciones del complejo son obtenidas computacionalmente y comparadas con las estructuras obtenidas a partir de cristalografía de rayos X o resonancia magnética nuclear. Además, representa una herramienta importante para los procedimientos de escaneo virtual, donde un conjunto de varios receptores son sometidos al análisis de *docking* contra el objetivo de una droga y entrega por resultado al mejor candidato. [69]

En término de los métodos de *docking* proteína-ligando, el problema puede ser racionalizado como la búsqueda de la conformación y orientación precisa del ligando, comúnmente referido como posicionamiento, en torno a una proteína objetivo cuando la estructura de esta última es conocida o puede ser estimada. Junto con esto, está el problema de predecir la afinidad de unión, lo cual corresponde a cuán fuerte el ligando se une a la proteína, mediante un sistema de asignación de puntaje o scoring. [69]

Los programas de *docking* pueden ser clasificados por sus algoritmos de búsqueda correspondientes al conjuntos de reglas y parámetros aplicados para definir una determinada conformación. Paralelamente, la consideración de la flexibilidad del ligando y/o del receptor también permite clasificarlos como de carácter rígido, limitando la especificidad y precisión de los resultados básicamente a la complementariedad geométrica entre dos moléculas, o flexible, estrategia que permite la obtención de varias conformaciones posibles repercutiendo en un mayor costo computacional. [69]

Los algoritmos basados en una correspondencia rápida de forma (*Fast Shape Matching*, SM en inglés) utilizan el solapamiento geométrico entre dos moléculas, los cuales pueden identificar sitios de unión posibles de una proteína mediante una búsqueda superficial. El *software* ZDOCK se basa en dicho algoritmo para realizar acoplamiento sobre estructuras rígidas, considerando complementariedad de forma y términos

de solvatación y electrostáticos, alcanzando resultados de alta precisión para simulaciones de *docking* proteína-proteína. También resalta el uso de GRAMM en diversas publicaciones. [69]

Otra clase de algoritmos utilizan métodos de construcción incremental (*Incremental Construction*, IC en inglés) que se basan en la ruptura del ligando en pequeños fragmentos que son acoplados en forma separada a un determinado sitio del receptor, los cuales son fusionados posteriormente para recuperar su conformación. De esta forma, se introduce flexibilidad sobre el ligando puesto que la unión de los fragmentos se realiza mediante zonas que poseen enlaces rotables. Dentro de esta categoría, destacan los programas DOCK y FLEXX de amplio uso en publicaciones científicas. [69]

Otros programas tales como ICM, basado en simulaciones de Monte Carlo, se sustentan en un conjunto de variaciones posicionales y rotacionales al azar sobre el ligando, promoviendo la obtención de varias conformaciones y la disminución de la probabilidad de obtener configuraciones ligadas a un mismo mínimo local. Tal cual su nombre lo indica, el número de orientaciones posibles está basado en un modelo de carácter estocástico que permite una reconstrucción de la estructura tridimensional del ligando a través de funciones de generación. Sin embargo, dado que las conformaciones alcanzadas podrían entrar en conflicto con condiciones bioquímicas tales como efectos estéricos y fenómenos de repulsión, se suele aplicar posteriormente una minimización de energía basada en campos de fuerza luego de cada variación al azar realizada sobre la estructura con el fin de obtener complejos de mayor confiabilidad. [69]

Otra estrategia consiste en realizar simulaciones donde se aplica un proceso de templado (*Simulated Annealing*, SA en inglés) sobre estructuras obtenidas de otros procesos de *docking*. Estas son sometidas a procesos de simulación dinámica en los cuales la temperatura del sistema se disminuye gradualmente durante intervalos regulares de tiempo en cada ciclo de la simulación. En comparación a las simulaciones de Monte Carlo, sus resultados poseen un grado de precisión mayor ya que considera estados conformacionales definidos a partir de diferentes estados termodinámicos del sistema. No obstante, esta estrategia consume una gran cantidad de tiempo ya que el ciclo de templado debe ser realizado para cada conformación elegida. Según esto, se suelen aplicar procedimientos entre el posicionamiento del ligando y los ciclos de templado que buscan marginar las conformaciones poco factibles tales como el cálculo de funciones de puntuación de energía libre y aproximaciones para verificar impedimentos estéricos y correspondencia de distancias. Por otro lado, la técnica de SA se suele aplicar conjuntamente con otros algoritmos de búsqueda ya que la disminución de temperatura puede causar el regreso al mínimo local más cercano, lo cual perjudica la determinación de conformaciones fuera de dicha zona. Respecto a esto, existen programas tales como Autodock que pueden combinar la simulación de Monte Carlo con SA, estableciendo como criterio de elección los valores de energía calculados entre las etapas y funciones de probabilidad de aceptación. [69]

Un enfoque completamente diferente está dado por los algoritmos de programación evolutiva (*Evolutionary Programming*, EP en inglés) que considera la evolución de las especies simuladas a través de procesos de selección, mutación y reproducción que dependen de su rendimiento en el ambiente. La utilización de operadores genéticos correspondientes a aproximaciones computacionales del proceso evolutivo son aplicados para simular la permanencia de las configuraciones más favorables. Cada opción es jerarquizada según un conjunto de parámetros, eligiendo finalmente las mejores soluciones para el siguiente proceso evolutivo, proceso que se repite hasta encontrar una solución óptima representada por el estado de menor energía identificado. De naturaleza heurística, esta clase de algoritmos permiten dar con soluciones posibles al problema de *docking*, pudiendo algunas de ellas estar asociadas al mínimo global de energía o bien representar diversos mínimos locales. [69]

Dentro de esta categoría de algoritmos, el algoritmo genético Darwiniano destaca por su objetivo de obtener de manera muy cercana la conformación del mínimo global de energía. Los algoritmos genéticos tradicionales describen la estructura del ligando y de la proteína a través de un conjunto de valores que definen la translación, orientación y conformación del ligando con respecto a la proteína, las cuales corresponden a las variables de estado que, en este tipo de algoritmos, corresponde a un gen. Además,

se establecen tasas de mutación, tasas de entrecruzamiento o *crossover* y cantidad de procesos evolutivos, variables ligadas a la teoría evolutiva de Darwin que inciden directamente sobre los resultados. Bajo la premisa de que sólo existe transferencia de información desde el genotipo al fenotipo, el estado del ligando define sus coordenadas atómicas correspondientes al fenotipo. Al azar, se produce una cruce de individuos mediante el proceso de *crossover* permitiendo que nuevos individuos hereden genes de cada padre. Además, algunos descendientes sufren mutaciones al azar en el que un gen cambia en algún valor. Finalmente, la elección de la descendencia de la generación actual ocurre en base a la aptitud física individual entendida como la energía total de interacción del ligando con la proteína evaluada a través de una función de energía. De esta manera, los mejores individuos siguen reproduciéndose, mientras que el resto muere [70]. Este tipo de algoritmo ha sido aplicado en diversos programas tales como GOLD, DOCK y Autodock. [69]

Un concepto similar es aplicado en los algoritmos genéticos Lamarckianos. El postulado evolutivo de Lamarck establece que las características fenotípicas adquiridas durante la vida del individuo pueden convertirse en rasgos heredables. Autodock emplea un algoritmo genético Lamarckiano, el cual difiere del algoritmo genético Darwiniano estándar ya que, además de compartir el mismo método de búsqueda global, incluye un método de búsqueda local de paso adaptativo para realizar la minimización de energía. El espacio genotípico está definido en términos de los operadores genéticos como lo son la mutación y el *crossover*, mientras que el espacio fenotípico está definido directamente por el problema correspondiente a la función de energía a ser optimizada. Una vez encontrado el mínimo, se produce el proceso de convertir el resultado fenotípico de la búsqueda local al genotipo posible correspondiente. [70]

Los protocolos de *docking* pueden ser descritos como una combinación de un algoritmo de búsqueda y una función de puntaje. En la actualidad, la cantidad de protocolos es extensa, sin embargo, la elección de alguno en particular debe considerar varios aspectos tales como la velocidad y la efectividad del algoritmo de búsqueda en cubrir el espacio conformacional relevante. En lo que respecta a la función de puntaje, esta debiera representar la termodinámica de interacción del sistema proteína-ligando adecuadamente para así distinguir los verdaderos modos de unión de todo el conjunto explorado y generar un ranking apropiado. Sin embargo, el desempeño de las distintas herramientas de *docking* es altamente dependiente de las características específicas de la proteína, sitios de unión y del ligando, de manera que resulta imposible establecer cuál de ellas es más apropiada en un determinado contexto. [71]

La función de puntaje o *scoring*, si bien poseen parámetros y términos diferentes en los diferentes programas disponibles, conservan su propósito de intentar representar la termodinámica de interacción del sistema proteína-ligando adecuadamente para así distinguir los verdaderos modos de unión de todo el conjunto explorado y generar un ranking apropiado. Uno de ellos, Autodock, emplea una función de *scoring* empírica que se sustenta en modelos tradicional de campos de fuerza utilizados en dinámica molecular tales como AMBER o CHARMM que incluyen fuerzas de dispersión tipo Van der Waals, puentes de hidrógeno, fuerzas electrostáticas y desviaciones de las longitudes y ángulos de enlace con respecto a los valores ideales. Sin embargo, dadas los altos requerimientos de tiempo que implica su cálculo computacional, la función implementada en este *software* incluye funciones empíricas de energía libre y términos entrópicos a las ecuaciones de mecánica molecular. [70, 72]

Por último, se han propuesto funciones de *scoring* que optimizan la determinación de las mejores conformaciones en virtud de menores costos computacionales. En vista de que la aproximación de los potenciales químicos del sistema modeladas como potenciales de Lennard-Jones 6-12 y energías de Coulomb no siempre logran representar las conformaciones reales, surge la necesidad de plantear modelos que, más que representar la naturaleza física, permitan cumplir con dicho objetivo. Autodock Vina (tratado como Vina desde aquí en adelante) describe su función como una suma de funciones probabilísticas y otras de carácter lineal ponderadas por ciertos factores que, de acuerdo a sus desarrolladores, han alcanzado mejores resultados que Autodock en menor tiempo de simulación. [73]

3.4. Dinámica molecular

La simulación molecular es una herramienta poderosa utilizada en el modelamiento molecular para seguir y entender el movimiento de los átomos en detalle. A pesar de sus virtudes, está lejos de ser la única herramienta para predecir la estructura de una proteína. Idealmente, la ecuación de Schrödinger dependiente del tiempo es capaz de predecir todas las propiedades de cualquier molécula con precisión ab initio arbitraria. Sin embargo, mientras más moléculas y átomos participan en la simulación, se hace necesario el uso de aproximaciones. En efecto, en lugar de usar tal método, la mayoría de los sistemas biomoleculares se simulan utilizando parametrizaciones empíricas de los modelos como, por ejemplo, la consideración de las interacciones clásicas de Coulomb como cargas atómicas puntuales en desmedro de la descripción cuántica de los electrones, permitiendo así el desarrollo de simulaciones más rápidas en varios órdenes de magnitud.

Las propiedades macroscópicas medidas en un experimento no son observaciones directas, sino que un promedio de billones de moléculas representando un conjunto mecánico-estadístico. Es importante notar que no es suficiente contar con estructuras individuales, sino que debe existir un sistema expandido para generar un conjunto representativo de estructuras bajo las condiciones experimentales dadas de temperatura y presión. En cuanto a las propiedades de equilibrio termodinámico relacionadas con la energía libre tales como la constante de asociación, solubilidad y estabilidad relativa, estas no pueden ser calculadas directamente a partir de las simulaciones individuales, requiriéndose técnicas más sofisticadas para dicho fin. Por último, las propiedades que rigen el equilibrio, a diferencia de las propiedades cinéticas, el propósito es examinar conjuntos estructurales y no necesariamente reproducir trayectorias atómicas individuales.

Dentro de los métodos más utilizados para la generación de conjuntos de equilibrio estadísticamente confiables están las simulaciones estocásticas de Monte Carlo y las simulaciones determinísticas de dinámica molecular (*Molecular Dynamics*, MD en inglés). Si bien las simulaciones de Monte Carlo se basan en diseñar movimientos inteligentes para generar nuevas conformaciones, tal procedimiento es complejo por lo que la mayoría de las simulaciones tienden a utilizar la dinámica clásica descrita en las ecuaciones de movimiento de Newton.

Durante un tiempo de simulación determinado según los objetivos que persigue, se permite la interacción del sistema, obteniéndose una representación de los movimientos de los átomos participantes a través de una descripción de sus trayectorias en el tiempo. Estas últimas se determinan, de acuerdo a un campo de fuerza de mecánica molecular que definen las fuerzas existentes entre los átomos y la energía potencial, a través de la resolución numérica de las ecuaciones de movimiento de Newton del sistema.

3.4.1. Etapas estándar de las simulaciones de dinámica molecular

Las simulaciones de dinámica molecular cuentan con diferentes pasos de acuerdo al programa utilizado para dicho fin. Sin embargo, a pesar de diferir en sus etapas intermedias, se pueden resaltar tres etapas elementales en lo que respecta a las simulaciones de complejos proteína-ligando.

La primera etapa corresponde a la elaboración de los archivos de entrada correspondiente a los archivos de coordenadas de la proteína y el ligando, archivo de topología que describen los enlaces covalentes que existen entre dos átomos del sistema, los ángulos planos que definen tres átomos y los ángulos dihedros definidos por cuatro átomos, archivos de parámetros que cuantifica las variables que son usadas en la energía potencial del campo de fuerza elegido y el archivo de campo de fuerza que establece la descripción matemática de la energía potencial del sistema.

Posteriormente, se ubica el sistema proteína-ligando en un volumen de forma y dimensión determinada que contiene agua como solvente. Este paso es necesario ya que se desea simular la estabilidad del complejo

en el ambiente celular. Es importante mencionar que, dentro de esta etapa, también se debe garantizar la estabilidad del sistema imponiendo que la carga neta del sistema sea cero. Dado que es factible que el complejo proteína-ligando posea carga, la estabilización se realiza mediante la adición de iones que permitan anularla.

Tal como se mencionó anteriormente, los archivos de coordenadas del receptor y ligando a utilizar en las simulaciones de dinámica molecular son obtenidos a través de los programas de *docking*. En particular, dado que la ubicación de los átomos de hidrógeno responde a un algoritmo diferente a lo establecido por el campo de fuerza, es necesario realizar la segunda etapa correspondiente a la minimización del sistema. Dado que se desea estudiar la estabilidad del complejo proteína-ligando en presencia de agua, es imprescindible que el sistema no presente una geometría inadecuada ni impedimentos estéricos, razón por la cual se corrigen las coordenadas del complejo y se establece la distribución de las moléculas de solvente.

El proceso de minimización se realiza a través de una simulación de corta duración cuyo propósito es encontrar un mínimo local de energía en el que se garantiza un gradiente nulo para todos los átomos del sistema, lo cual representa una configuración estable. En este proceso, el efecto de la temperatura se desprecia, por lo que los valores de energía calculados corresponden a una aproximación. En este sentido, se busca definir un punto inicial estable para la consideración posterior de la temperatura y presión en las simulaciones.

La tercera etapa correspondiente a la estabilización del sistema complejo-solvente, el cual tiene por objetivo definir posiciones más adecuadas de las moléculas de solvente alrededor de los solutos presentes bajo condiciones de temperatura y presión constantes. Es importante recalcar que las simulaciones de dinámica molecular se rigen bajo condiciones de temperatura y presión inicial, lo cual exige que se realicen simulaciones previas para utilizar configuraciones estables energéticamente en tal escenario.

El cumplimiento de las etapas previas permite realizar el último procedimiento correspondiente a la simulación de la dinámica molecular en sí misma. Si bien el objetivo final varía según el estudio a realizar, estudiar la estabilidad del complejo bajo distintas condiciones de temperatura o la aplicación de fuerzas específicas en algunas zonas del sistema son los más usuales.

3.4.2. Programas de dinámica molecular

GROMACS es un código de dinámica molecular paralela diseñado para simulaciones de alto rendimiento de grandes sistemas biomoleculares. Este puede utilizar los campos de fuerza propios del programa llamados GROMOS o bien utilizar otros provenientes de otros programas tales como CHARMM, AMBER y OPLS. Se sustenta en la resolución de las ecuaciones de movimiento de Newton utilizando un campo de fuerzas que incluye el efecto del estrechamiento, doblamiento y torsión de los enlaces covalentes del sistema, además del efecto de las fuerzas de Van der Waals y de Coulomb [74, 75]. Su desarrollo es de alta complejidad ya que requiere resolver las ecuaciones de Newton para cada átomo del sistema, lo cual puede implicar un tiempo de cálculo considerable.

El resultado que arroja GROMACS corresponde a una trayectoria que determina las coordenadas de los átomos en un cierto tiempo de simulación determinado. Sin embargo, es necesario complementar tal resultado con el cálculo de la energía libre de cada conformación a través de MM-PBSA, metodología compatible con AMBER. Si bien GROMACS puede desempeñar los cálculos de energía a través de FEP y TIR, representa un procedimiento que requiere de largos periodos de tiempo para su desarrollo, por lo que MM-PBSA resulta ser una alternativa para cálculos más rápidos y con alto grado de precisión. De esta forma, haciendo uso del campo de fuerza asociado, calcula la energía libre como la suma de la energía interna, electrostática, Van der Waals, energía de solvatación polar, energía de solvatación no polar y consideraciones de la entropía de la molécula. [76–79]

3.4.3. Métodos de cálculo de energía libre

La expresión básica de la energía potencial del sistema considera términos covalentes y no covalentes. Los primeros relacionan los átomos que están unidos por dicho tipo de enlaces, mientras que los últimos describen las fuerzas electrostáticas y de Van der Waals. Si bien la descomposición específica de los términos depende del campo de fuerza, existe una forma general de escribir correspondiente a la suma de los términos covalentes y no covalentes. [80]

En el caso de las simulaciones de dinámica molecular, las expresiones de la energía potencial definen la energía libre del sistema. El cálculo de la variación de energía libre entre un estado inicial y final puede ser realizado por distintos algoritmos. Uno de ellos corresponde a los métodos alquímicos que modelan el cambio de un estado inicial a otro final mediante un proceso gradual de modificación de un conjunto de átomos correspondiente a pasos intermedios reversibles. De esta forma, el cálculo de la variación de energía libre se realiza a partir de la integración sobre la ruta continua que conecta los estados inicial y final. Tal procedimiento se emplea en el método de integración termodinámica (*Thermodynamic Integration*, TI en inglés). [80]

Otros evitan, al menos en un comienzo, estados intermedios de equilibrio y utilizan sólo un conjunto de configuraciones en equilibrio en el estado inicial, las cuales son convertidas instantáneamente al estado final y se calcula la diferencia de energía libre resultante. Tal es el caso del método de las perturbaciones de energía libre (*Free Energy Perturbations*, FEP en inglés). Sin embargo, su implementación en diversos programas usados en dinámica molecular se basa en la utilización de pasos intermedios. [80]

No obstante, también existen métodos que no se basan en estados de equilibrio intermedios y se rigen por la identidad de Jarzynski. Si bien todas poseen una expresión matemática particular, existe un elemento común preponderante correspondiente al tiempo asociado a cada transformación. En este sentido, la teoría inicial involucrada tras FEP es que las transformaciones se dan muy rápido, mientras que en TI se dan lentamente. En el caso de los métodos de no-equilibrio, dicho valor es de carácter intermedio. En este sentido, el cálculo de la variación de energía libre es un proceso de elevado costo computacional. [80]

Sin embargo, existen metodologías de estimación sustentadas en un análisis posterior de una o varias conformaciones entre las que destacan MM-GBSA (*Molecular Mechanics – Generalized Born Surface Area*) y MM-PBSA (*Molecular Mechanics – Poisson Boltzmann Surface Area*). Tratándose de metodologías idénticas salvo en la estimación de la energía asociada a la solvatación, esta última ha sido utilizada en muchos estudios correspondientes a la evaluación de conformaciones obtenidas desde la etapa de *docking*, determinación de la estabilidad de las estructuras y predicción de afinidad de enlace y de *hot-spots* [81–83]. Por otro lado, ambas metodologías permiten analizar la contribución energética individual de cada fenómeno de acuerdo a su descomposición de energía libre y cuya aplicación ha sido realizada desde compuestos químicos pequeños hasta el estudio conformacional de complejos proteicos [84]. La metodología MM-PBSA se ha aplicado en distintos escenarios, siendo uno de ellos sobre estructuras únicas obtenidas de las etapas de *docking*, estructuras minimizadas o bien de estructuras cristalográficas [84]. No obstante, su aplicación más frecuente ha sido sobre las trayectorias de dinámica molecular a partir de las cuales se elige un conjunto de conformaciones o *frames* para realizar los cálculos expuestos en las ecuaciones anteriores. [84]

Continuando con lo anterior, existen tres enfoques diferentes en donde se aplica la metodología MM-PBSA. Si la estabilidad de dos conformaciones de una molécula son comparables entre sí, se pueden realizar simulaciones y cálculos de energía libre independientes para ambas, pudiendo evaluar su diferencia en forma directa. De no constatarse dicha evidencia, la variación de energía libre puede ser calculada a través de la diferencia de energía libre del complejo con cada uno de sus componentes. Respecto a esto último, las trayectorias de cada uno de sus componentes pueden ser extraídos a partir de la simulación del complejo correspondiente a la estrategia de trayectoria única (UT), o bien realizarse en forma independiente

correspondiente a la estrategia de múltiples trayectoria (MT) [84]. Tal cual lo indican las figuras 3.8 y 3.9, esta metodología se sustenta en la aplicación de un enfoque termodinámico en el que la formación del complejo solvatado es dependiente de procesos de acoplamiento en el vacío y solvatación de cada uno de las moléculas participantes:

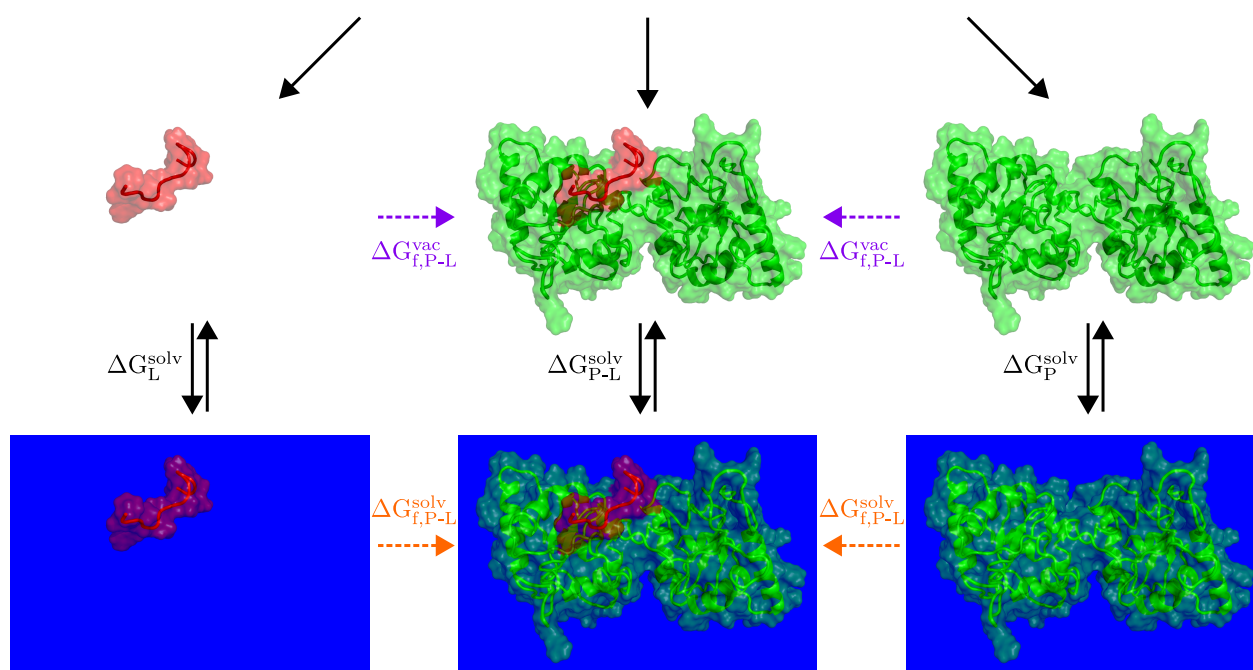


Figura 3.8: Estrategia de cálculo de energía libre a través de la metodología MM-PBSA basado en la trayectoria única del complejo

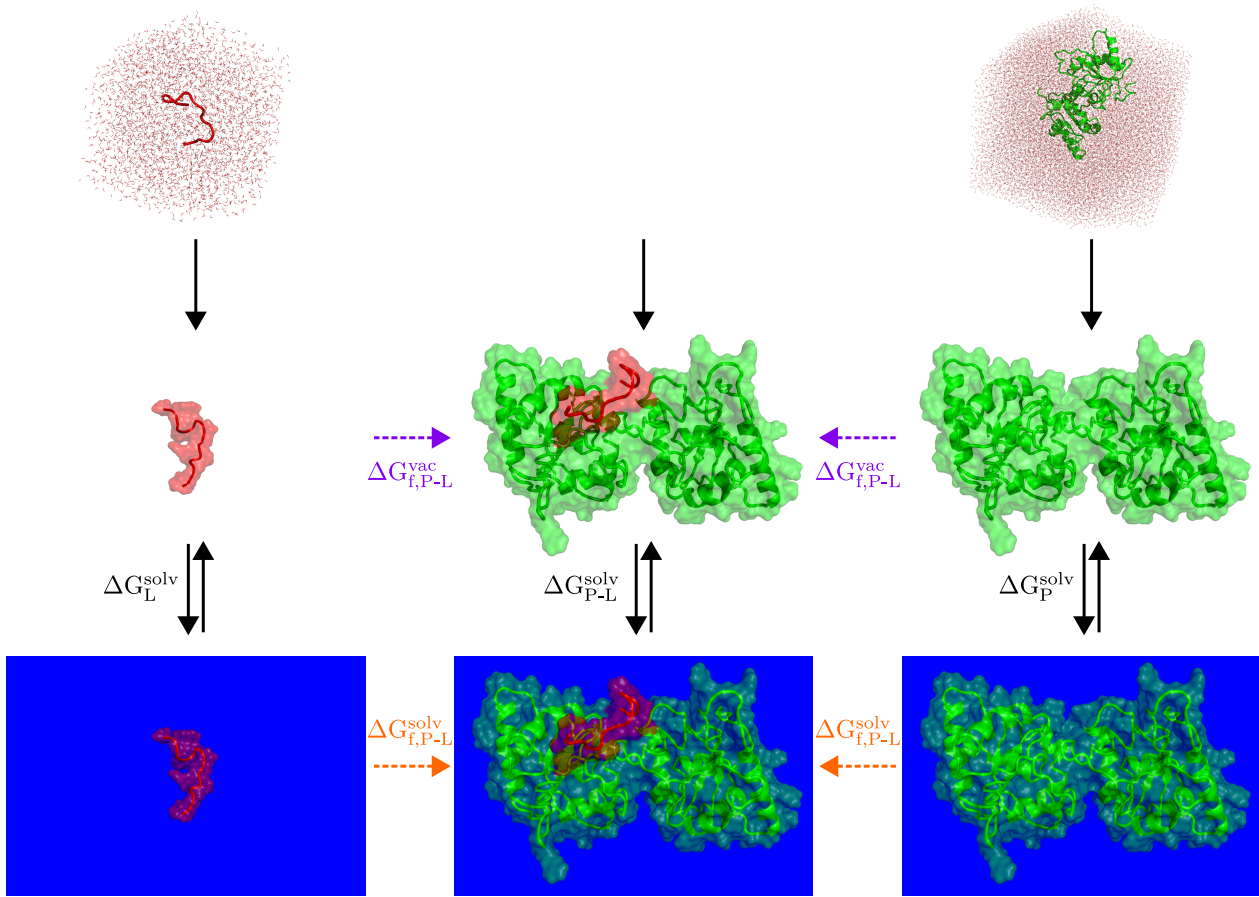


Figura 3.9: Estrategia de cálculo de energía libre a través de la metodología MM-PBSA basado en la generación de trayectorias independientes para cada uno de sus componentes

Tal cual lo señala la ecuación (3.1) [84], el promedio de la variación de energía libre de formación del complejo solvatado ($\langle \Delta G_{f,P-L}^{solv} \rangle$) es equivalente al cálculo a través de un ciclo termodinámico en el cual se evalúa la formación del complejo en el vacío ($\langle \Delta G_{f,P-L}^{vac} \rangle$) y los procesos de solvatación de cada uno de los constituyentes del sistema ($\langle \Delta G_{P-L}^{solv} \rangle$, $\langle \Delta G_L^{solv} \rangle$ y $\langle \Delta G_P^{solv} \rangle$). Según esto, el cálculo puede ser reordenado según la ecuación (3.2) [85] que calculan $\langle \Delta G_{f,P-L}^{solv} \rangle$ en función de la energía libre del complejo, proteína y ligando, cada una de las cuales considera términos asociados a la mecánica molecular, variación de energía libre de solvatación y variación de entropía conformacional de acuerdo a la ecuación (3.3) [85]:

$$(3.1) \quad \langle \Delta G_{f,P-L}^{solv} \rangle = \langle \Delta G_{f,P-L}^{vac} \rangle + \langle \Delta G_{P-L}^{solv} \rangle - (\langle \Delta G_L^{solv} \rangle + \langle \Delta G_P^{solv} \rangle)$$

$$(3.2) \quad \langle \Delta G_{f,P-L}^{solv} \rangle = \overline{G_{Complejo}} - \overline{G_{Proteina}} - \overline{G_{Ligando}}$$

$$(3.3) \quad \bar{G} = \langle E_{MM} \rangle + \langle \Delta G_{Solv} \rangle - T\Delta S$$

En lo que respecta a la energía de mecánica molecular, su cálculo corresponde a la sumatoria de los términos de energía interna y de no enlace asociados a las interacciones de Van der Waals y electrostáticas tal cual se expresa en la ecuación (3.4) [85]. Específicamente, todos estos términos se definen en virtud del campo de fuerza utilizado en las simulaciones de dinámica molecular. Si bien existen diferencias entre los modelos, uno de los más utilizados corresponde a los campos de fuerza tipo AMBER definido en la ecuación (3.5) [86], los cuales definen las interacciones de Van der Waals como potenciales de Lennard-Jones 6-12, las interacciones electrostáticas de acuerdo a la ecuación de Coulomb, las energías de enlace y ángulos planos como resortes simples dependientes de posiciones de equilibrio particulares, y los ángulos dihedros son modelados usando funciones sinusoidales que aproximan las diferencias de energía entre las conformaciones eclipsadas y alternadas:

$$(3.4) \quad \langle E_{MM} \rangle = \langle E_{Int} \rangle + \langle E_{vdW} \rangle + \langle E_{Coul} \rangle$$

$$(3.5) \quad \langle E_{MM} \rangle = \sum_{enlaces} K_r \cdot (r - r_{eq})^2 + \sum_{\angle planos} K_\theta \cdot (\theta - \theta_{eq})^2 + \sum_{\angle dihedros} \frac{V_n}{2} \cdot (1 + \cos(n\phi - \gamma)) + \sum_{i < j} \left[\left(\frac{A_{ij}}{R_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{R_{ij}^6} \right) - \frac{q_i q_j}{\epsilon R_{ij}} \right]$$

La determinación de la variación de energía libre de solvatación considera una componente polar y otra apolar (ecuación 3.6) [87]. En el primer caso, el cálculo se realiza a través de la solución de la ecuación no lineal de Poisson-Boltzmann (ecuación 3.7) [88] y cuyo valor corresponde a la diferencia de los valores de potencial electrostático entre el complejo en presencia de un medio continuo de constante dieléctrica equivalente al agua y en el vacío (ecuación 3.8) [80]. En el segundo caso, el cálculo considera una relación lineal dependiente del área superficial accesible al solvente (*Solvent-Accessible Surface Area*, SASA en inglés) cuya pendiente y coeficiente de posición dependen del estudio estadístico de un conjunto de estructuras particular (ecuación 3.9) [85, 89]:

$$(3.6) \quad \langle \Delta G_{Solv} \rangle = \langle \Delta G_{Solv,P} \rangle + \langle \Delta G_{Solv,NP} \rangle$$

$$(3.7) \quad \langle \Delta G_{Solv,P} \rangle \rightarrow -\nabla \cdot (\epsilon(r) \nabla \Phi(r)) + \bar{\kappa}^2 \left(\frac{k_B T}{e_c} \right) \sinh \left(\frac{e_c \Phi(r)}{k_B T} \right) = 4\pi \sum_{i=1}^{N_m} q_i \delta(r - r_i)$$

$$(3.8) \quad \langle \Delta G_{Solv,P} \rangle = \langle \Phi_{agua} \rangle - \langle \Phi_{vacio} \rangle$$

$$(3.9) \quad \langle \Delta G_{Solv,NP} \rangle = \gamma \cdot SASA + \beta$$

La estimación de la entropía conformacional puede ser estimado a través de la técnica de modos normales [85,90] o de aproximación quasi-armónica. [90–92]. En el caso de los modos normales, se requiere de una minimización considerable de la estructura simulada que permite el cómputo estable de la matriz Hessiana. Esta última es posteriormente diagonalizada y sus valores propios son utilizados en el cálculo de la entropía vibracional definida en la ecuación (3.10) [85] donde S_{NM} es la entropía calculada por modos normales, R la constante universal de los gases, \hbar es la constante reducida de Planck, v_i es el valor propio asociado al modo normal, k es la constante de Boltzmann, T es la temperatura absoluta del sistema y N_A es el número de Avogadro.

$$(3.10) \quad S_{NM} = \sum_{i \in A}^{3N-6} -R \ln(1 - e^{-\hbar v_i / k_B T}) + \frac{N_A \hbar v_i e^{-\hbar v_i / k_B T}}{T(1 - e^{-\hbar v_i / k_B T})}$$

Por su parte, la entropía estimada a partir del enfoque quasi-armónico se determina a partir de la matriz de covarianza generada de la trayectoria de simulación. En forma análoga a la matriz Hessiana, se requiere de su diagonalización para la obtención de sus valores propios. De esta forma, considerando S_{QH} como la entropía calculada por el enfoque quasi-armónico, \hbar como la constante reducida de Planck, ω_i como la frecuencia de oscilación, λ_i como el valor propio asociado, k como la constante de Boltzmann y T como la temperatura absoluta del sistema, utilizando la ecuación (3.11) [92] la entropía conformacional calculada corresponde a:

$$(3.11) \quad S_{QH} = \sum_{i=1}^{3N-6} \left[\frac{\alpha_i}{e^{\alpha_i} - 1} - \ln(1 - e^{-\alpha_i}) \right], \quad \alpha_i = \frac{\hbar \omega_i}{k_B T} = \frac{\hbar}{\sqrt{k_B T}} \frac{1}{\sqrt{\lambda_i}}$$

Este método ha sido implementado en el programa AMBER, requiriendo que parte de los términos sean inferidos a través del empleo de programas adicionales. En efecto, su implementación necesita como punto inicial que las trayectorias obtenidas estén en un formato compatible con AMBER. A través de uno de sus programas, se puede obtener la energía interna asociada a los enlaces, ángulos planos y dihedros, así como las vinculadas a las interacciones electrostáticas y de Van der Waals. No obstante, la contribución electrostática a la energía libre de solvatación debe ser calculada con el método de Poisson-Boltzmann implementado en los programas DelPhi o APBS. El aporte hidrofóbico a la energía libre de solvatación es determinado a través del SASA cuyo cálculo debe llevarse a cabo a través de programas tales como MSMS o NACCESS. Por último, el aporte del cambio de la entropía conformacional es calculado en forma interna a través de paquetes propios del *software*.

A pesar de lo mencionado anteriormente, la aplicación de esta metodología no está circunscrita sólo a AMBER. En efecto, existe un *script* en dicho programa que realiza dichos procedimientos, sin embargo, el cálculo de los componentes que dicho programa realiza en forma directa también pueden ser realizados por otros *software* de dinámica molecular ya sea a través del diseño personalizado de *scripts* que empleen herramientas propias en forma automatizada o bien en forma manual.

3.5. Modelación matemática con herramientas estadísticas

Las simulaciones de dinámica molecular son conocidas por generar una cantidad de información (3*M coordenadas para todos los M átomos del sistema para cada paso de tiempo). En este ámbito, existe un gran interés por desarrollar métodos que extraigan la información “esencial” de la trayectoria obtenida. La

reducción de la dimensionalidad a unos pocos grados de libertad colectivos representa un campo activo de investigación teórica en la actualidad. [93]

El análisis de componentes principales (Principal Components Analysis, PCA en inglés), también conocido como análisis quasi-armónico o método de dinámicas esenciales, es uno de los métodos más populares en reducir sistemáticamente la dimensionalidad de un sistema complejo. Su enfoque está centrado en la matriz de covarianzas que entrega información sobre las correlaciones entre dos aspectos del sistema. Este método representa una transformación lineal que diagonaliza la matriz de covarianza y, por lo tanto, remueve las correlaciones lineales instantáneas a lo largo de las variables. Se ha demostrado que, al ordenar los valores propios de la transformación de manera decreciente, las fluctuaciones del sistema pueden ser descritas en términos de una cantidad baja de componentes principales, las cuales pueden servir como coordenadas de reacción. [93]

Esta técnica se ha planteado desde diferentes perspectivas para describir el comportamiento observado en las simulaciones de dinámica molecular. Se presentan como enfoques válidos estudiados la aplicación de esta técnica en el estudio de los ángulos dihedros de la cadena principal del péptido [93]. Si bien esta técnica es ampliamente utilizada, presenta ciertas debilidades asociadas a las simulaciones cortas de dinámica molecular que, al aplicar dicha técnica, no entrega una matriz de covarianza precisa para las fluctuaciones de los átomos. [94]

A pesar de lo anterior, el estudio de interacciones proteína-ligando representa un campo donde tal técnica puede ser aplicada cuyos resultados tienen un alto grado de certeza. En efecto, cuando un sustrato en particular se une a una proteína, un tema recurrente es si en la inducción de la unión los sustratos son grandes responsables de los cambios conformacionales de la proteína. Por otro lado, puede ser que las fluctuaciones de la proteína son responsables de generar conformaciones en que se predispone la captura del sustrato para generar la estructura final de unión al sustrato. La respuesta a tal problemática puede ser revelada por PCA en caso de analizar una trayectoria de amplia duración que logre identificar las variables importantes del fenómeno. [95]

Se han presentado en el último tiempo algoritmos nuevos tales como modelos generativos conocidos como campos aleatorios de Markov (Markov Random Fields, MRF en inglés), el cual corresponde a un modelo gráfico probabilístico de carácter indirecto que codifica la distribución de probabilidad conjunta sobre un grupo de variables definidas por el usuario, las cuales pueden ser las fluctuaciones posicionales de los átomos, ángulos planos, entre otros. La naturaleza generativa del modelo permite que nuevas conformaciones puedan ser muestreadas y, como gran punto importante, los usuarios pueden realizar alteraciones estructurales sobre alguna parte del modelo tales como el modelamiento de la unión de un ligando y llevar a cabo una inferencia para predecir cómo se comporta el resto del sistema. [96]

Los antecedentes recopilados permiten evaluar PCA como una técnica interesante a aplicar en las simulaciones de dinámica molecular obtenidas con GROMACS. No obstante, se debe discutir la manera de implementarlo ya que, a priori, no es factible generar una zona de interacción única para todos los péptidos de bloqueo estudiados. Junto con esto, las propiedades de los sitios de interacción pueden variar entre sí, ante lo cual podría plantearse como idea inicial un análisis de componentes principales para cada conjunto péptido de bloqueo-sitio de interacción y analizar la viabilidad de reunir la información individual en un estudio único de predicción de unión en virtud a las características principales que definen la variabilidad del sistema.

Capítulo 4

Metodología

4.1. Descripción general de la metodología

La metodología de trabajo está representada por el siguiente diagrama de flujos (figura). A partir de los modelos estructurales del homodímero de TLR4 y de los péptidos de bloqueo extraídos de las proteínas MAL (pepMAL), MyD88 (pepMyD88), TLR4 (pepTLR4) y TRAM (pepTRAM), se realizó un procedimiento de pre-procesamiento de sus estructuras cuyo objetivo fue refinarlas mediante la aplicación de simulaciones de dinámica molecular.

Luego de establecer los algoritmos de acoplamiento o *docking* a utilizar según ciertos criterios de selección, se efectuó el estudio de acoplamiento entre el homodímero de TLR4, modelo previamente obtenido por Salgado *y cols.* a partir del modelo refinado de TLR4, y cada uno de los péptidos de bloqueo utilizados. Dicho proceso, consistente en un barrido discreto sobre la superficie del homodímero, finaliza con la obtención de los complejos receptor-ligando correspondientes. Es importante señalar que, dada la multiplicidad de modelos obtenidos a partir del acoplamiento, la elección del complejo receptor-ligando estuvo sujeta a algunas condiciones.

Posteriormente, los complejos receptor-ligando fueron sometidos a un proceso de refinamiento mediante simulaciones de dinámica molecular a través del cual se estudió su comportamiento dinámico. Finalmente, las trayectorias de simulación obtenidas en cada uno de los casos fueron sometidas a un análisis de datos en el que se estudiaron las interacciones producidas y se calcularon, mediante el enfoque de trayectoria única, la energía libre de unión mediante la metodología MM-PBSA.

Adicionalmente, tanto el homodímero de TLR4 como los péptidos de bloqueo en forma independiente fueron sometidos al mismo protocolo de dinámica molecular aplicado sobre los complejos receptor-ligando. Junto con estudiar su comportamiento dinámico, las trayectorias de simulación generadas a partir de este proceso fueron utilizadas para realizar los cálculos de energía libre de unión mediante la metodología MM-PBSA en base a la estrategia de trayectorias múltiples.

Es importante señalar que, a través de esta metodología, se define un procedimiento que busca optimizar los tiempos de simulación a través de la eliminación temprana de conformaciones inestables, caracterización rápida de los sitios de unión y de las conformaciones preliminares del complejo proteína-ligando, y descripción completa del comportamiento de este último en el ambiente intracelular. En este sentido, la dinámica molecular representa un método efectivo para describir el comportamiento dinámico del péptido de bloqueo en presencia de solvente acuoso que, acoplado al cálculo de variación de energía libre vía MM-PBSA, entregan información valiosa sobre su factibilidad termodinámica. Por su parte, los programas de docking son capaces de establecer rápidamente conformaciones y orientaciones que minimizan la energía de unión a través de una función de *scoring* semiempírica de menor grado de precisión.

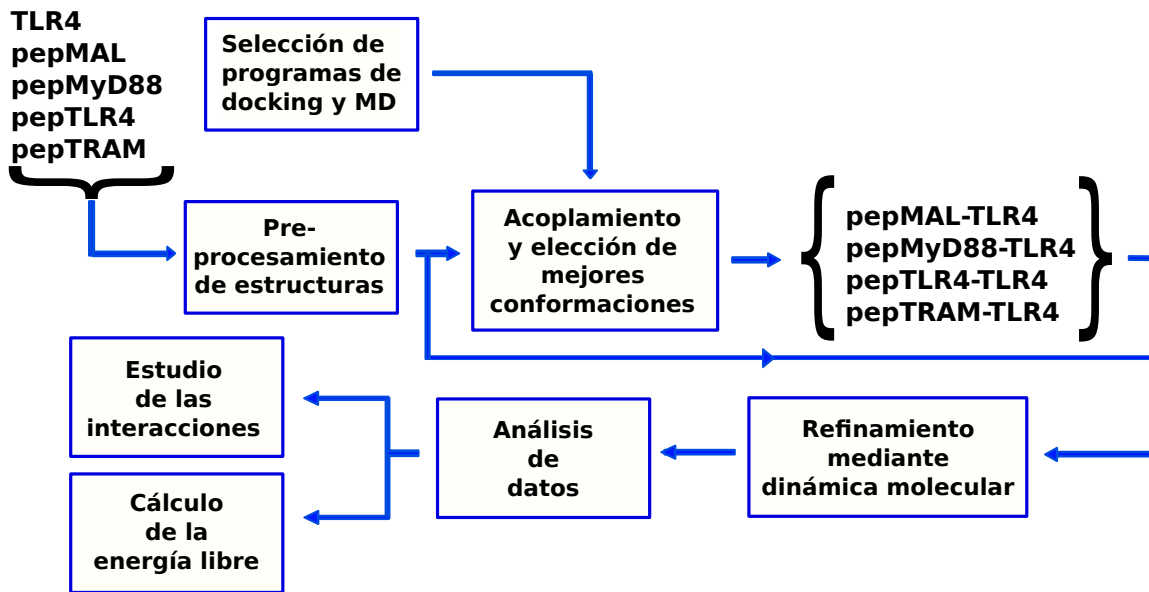


Figura 4.1: Diagrama de bloques de la metodología aplicada

4.1.1. Pre-procesamiento de estructuras

El desarrollo de esta investigación se sustenta en el trabajo realizado por Salgado y *cols.* en el contexto del proyecto FONDECYT titulado “Mathematical modeling of the interaction between cell-penetrating TIR BB loop decoy peptides (BBPs) and toll-like receptor 4 and 2 (TLR4 and TLR2)”. A partir de las secuencias aminoacídicas de los dominios TIR del receptor TLR4 y las proteínas adaptadoras MAL y TRAM presentadas en dicho trabajo, se realizó un proceso de modelamiento por homología para determinar las estructuras tridimensionales del homodímero de TLR4 y las proteínas adaptadoras previamente mencionadas basado en las estructuras de los receptores TLR1 y TLR2 determinadas por Xu y *cols.* [51], y la de TLR10 descrita por Nyman y *cols.* [52] utilizando el *software* MODELLER para cumplir con dicho propósito y refinadas posteriormente a través de dinámica molecular realizada con NAMD. Todas ellas están disponibles en RCSB PDB (*Protein Data Bank* en inglés) bajo los códigos 1FYV, 1FYW y 2J67 respectivamente. La calidad estructural de los modelos elaborados fue estimada a partir de las herramientas disponibles en el servidor SAVES: PROCHECK, WHAT CHECK, ERRAT, VERIFY 3D y PROVE. En el caso de MyD88, su estructura cristalográfica estaba disponible en dicha base de almacenamiento bajo el código 2JS7 descrita a través del estudio de Rossi y *cols.* (resultados no publicados).

En lo que respecta a los péptidos de bloqueo utilizados (tabla 4.1), estos fueron extraídos de los *loops* BB de cada una de las estructuras previamente modeladas y refinadas (pepMAL, pepMyD88, pepTLR4 y pepTRAM), regiones previamente probadas experimentalmente a través de los estudios de Toshchakov y *cols.* [28, 29]. Su estructura tridimensional fue establecida a través de simulaciones de dinámica molecular realizadas con NAMD que tuvieron por objetivo evaluar sus cambios conformacionales y elegir su estado de menor energía.

4.1.2. Selección de algoritmo de acoplamiento

La elección del programa de acoplamiento se realizó a partir de una búsqueda general de programas disponibles para este propósito, la cual considera los siguientes aspectos:

Tabla 4.1: Estructuras proteicas utilizadas

Nombre	Cantidad de residuos	Numeración Salgado	Numeración referencia	Referencia	Secuencias
TLR4	163	1-163	662-824	Núñez y cols. [20]	—
pepMAL	14	45-58	118-131	Núñez y cols. [20]	LQLRDATPGGAIVS
pepMyD88	14	45-58	193-206	Basith y cols. [22]	VSDRDVLPGTCVWS
pepTLR4	14	46-59	707-720	Núñez y cols. [20]	VSDRDVLPGTCVWS
pepTRAM	13	47-59	111-123	Núñez y cols. [20]	IFAEMPCGRQHLQ

- Vigencia: año de la última versión.
- Disponibilidad de soporte técnico
- Tipo de licencia: libre, libre académica o comercial.
- Algoritmo de búsqueda.
- Plataforma de implementación: descargable, servidor web o web-mail.
- Referencia del algoritmo.

Tabla 4.2: Selección de programas de *docking*

Nombre	Método de Búsqueda	Tipo de Licencia	Plataforma	Versión	Año	Soporte	Referencia de origen
FlexX	Construcción Incremental	Comercial	Descargable	3.1.4	2009	+	Rarey et. al.(1996)
GOLD	Algoritmo genético Darwiniano	Libre académica	Descargable	6.4	2011	+	Jones et.al. (1997)
ICM	Simulación de Montecarlo	Comercial	Descargable	3.7.2b	2011	+	Abagyan et.al. (1994)
EADock	Algoritmo genético Darwiniano	—	No disponible	2.0	2009	+	Grosdidier et.al. (2007)
DOCK	Construcción Incremental	Libre académica	Descargable	6.4	2010	+	Ewing et.al. (2001)
Autodock	Algoritmo genético Lamarckiano	Libre académica	Descargable	4.2.3	2010	+	Goodsell et.al. (1996)
Autodock Vina	Búsqueda local basada en gradiente	Libre académica	Descargable	1.1.2	2011	+	Troot and Olson (2010)

La elección del algoritmo de acoplamiento está determinado en base a cuatro criterios fundamentales correspondientes a la utilización en publicaciones científicas [71], eficiencia de sus algoritmos de búsqueda, tiempos de ejecución y representatividad de las energías de afinidad calculadas. De acuerdo a la preselección elaborada basada únicamente en los programas más utilizados (tabla 4.2), el algoritmo genético Lamarckiano ha demostrado ser más eficiente, confiable y exitoso en comparación con la simulación de Montecarlo y al algoritmo genético Darwiniano [70]. En este sentido, el programa Autodock resulta ser óptimo para cumplir con el objetivo impuesto. Sin embargo, Vina, otro programa elaborado por los mismos desarrolladores de Autodock, ha demostrado ser tan efectivo y confiable como este último, pero requiere de una menor cantidad de tiempo de simulación. [73]

De acuerdo a Chang y cols., la obtención de resultados diferentes en ambos programas responde a la función de puntuación y al algoritmo de búsqueda particulares de cada uno ya que ambos programas reciben los mismos archivos de entrada correspondientes a los archivos .pdb del receptor y ligando. En cuanto al primer aspecto, ambas son funciones ponderadas empíricamente que contienen términos para valores como el puentes de hidrógeno y penalizaciones por enlaces rotables. No obstante, dado que las metodologías de los programas son diferentes, el análisis por separado de la puntuación y de la búsqueda es complejo. Junto con esto, ambos programas aplican un algoritmo de búsqueda híbrido de búsqueda local y global, pero presentan diferencias en la optimización local. En efecto, Autodock emplea pequeños pasos al azar mientras busca conformaciones más favorables. En el caso de Autodock Vina, calcula las derivadas para generar un gradiente y desarrollar la optimización acorde a tal estrategia. [97]

En dicho estudio se extrae como información importante que el algoritmo de búsqueda aplicado en Autodock para moléculas con una cantidad alto de enlaces rotables es inefectivo en la obtención de un

mínimo de energía consistente y confiable, lo cual puede corroborarse por las conformaciones obtenidas. Por otro lado, se señala que Vina presenta un desempeño superior que Autodock en reproducir conformaciones observadas experimentalmente a medida que aumenta el número de enlaces rotables, lo cual da sustento a la calidad de los resultados obtenidos con este software. [97]

Adicionalmente, se extrae como conclusión que tanto Autodock como Autodock Vina son capaces de proveer predicciones útiles cuando se modelan estructuras con una baja cantidad de enlaces rotables, recomendando el uso de Autodock Vina en primer término por trabajar con parámetros optimizados y un desempeño mucho más rápido [97]. Según esto último, de acuerdo a los antecedentes presentados, la determinación de las configuraciones proteína-ligando preliminares fue realizada con Vina.

4.1.3. Características del algoritmo de acoplamiento

Vina utiliza un algoritmo de búsqueda basado en un optimizador global de búsqueda local iterativa [97]. Emplea el método de Broyden-Fletcher-Goldfarb-Shanno (BFGS) para la optimización local, el cual corresponde un método quasi-Newton eficiente. Este no sólo utiliza el valor de la función de *scoring*, sino que además hace uso del gradiente de dicha función que considera como argumentos la posición y la orientación del ligando, así como los valores de las torsiones para los enlaces rotables activos en el ligando y los residuos flexibles según corresponda. [73]

Si bien puede demorar más la evaluación del gradiente que el cálculo de la función de *scoring*, usarlo puede acelerar la optimización significativamente. El número de pasos en una corrida es determinado en forma adaptativa de acuerdo a la complejidad del problema y se desarrollan varias corridas que parten desde conformaciones al azar. [73]

Una de las ventajas importantes de Vina es que las corridas pueden realizarse simultáneamente ya que emplea *multithreading*, lo cual permite tomar ventaja de procesadores con múltiples núcleos. El algoritmo de optimización mantiene un set de diversos mínimos significativos que son posteriormente combinados desde las corridas individuales y usadas durante el refinamiento de la estructura y la etapa de *clustering*. [73]

Vina emplea una función de *scoring* que combina ciertas ventajas de los potenciales basados en el conocimiento y las funciones empíricas de *scoring* ya que extrae información empírica de las preferencias conformacionales de los complejos receptor-ligando y de las mediciones experimentales de afinidad. Junto con lo anterior, no requiere definir parámetros similares a los utilizados por Autodock ya que los calcula todos de manera interna, excepto el tamaño de la región de búsqueda, los que son definidos en virtud de la proteína y del ligando. [73]

4.1.4. Descripción de la metodología de acoplamiento

Dado que este programa funciona con archivos de extensión .pdbqt, fue necesario utilizar un programa adicional denominado Autodock Tools (ADT), el cual es capaz de elaborar tales archivos a partir de la estructuras proteicas disponibles en formato .pdb. Además de contener información ligada a las coordenadas de los átomos, define los enlaces rotables de la estructura proteica correspondiente. Como procedimiento general, se decidió aplicar el algoritmo de *docking* considerando la estructura del homodímero de TLR4 como una proteína rígida cuyos enlaces no poseen capacidad de experimentar algún grado de rotación, mientras que los péptidos de bloqueo fueron simulados considerando tres escenarios posibles con el objetivo de evaluar la reproducibilidad de los resultados:

- Rigidez completa de la estructura.

- Flexibilidad limitada sólo a las cadenas laterales.
- Flexibilidad sobre las cadenas laterales y cadena central.

La justificación tras la elección de este procedimiento radica en las características del problema correspondiente a identificar la conformación proteína-ligando más estable para un determinado complejo. Si bien resulta ideal la consideración de todos los enlaces como flexibles para así identificar una mayor cantidad de conformaciones posibles, la inclusión de mayor cantidad de enlaces rotables introduce grados de libertad al sistema y, en definitiva, dificulta la búsqueda e identificación del mínimo global de energía, contribuyendo a tiempos de simulación de larga extensión.

En lo que respecta a los péptidos de bloqueo, si bien incluyen aminoácidos correspondientes a sitios de interacción de las proteínas de las cuales provienen, la consideración de flexibilidad en ellos en desmedro de otros puede introducir resultados sesgados. En efecto, los cambios conformacionales que sufren las proteínas globulares están sujetas a un número importante de restricciones tales como impedimentos estéricos, efectos de atracción y repulsión electrostática presentes, los cuales limitan el movimiento de su estructura y, en consecuencia, la flexibilidad de los residuos responsables de la interacción con otras moléculas. En este sentido, dichas restricciones disminuyen considerablemente en el caso de los péptidos de bloqueo, pudiendo posibilitar el movimiento de aminoácidos distintos a dichos sitios de interacción cuya identificación no es factible *a priori*. El argumento expuesto anteriormente permite validar adicionalmente la consideración de rigidez del homodímero de TLR4 que, si bien no corresponde a un escenario real, sus movimientos son despreciables respecto a los cambios conformacionales que pueden experimentar los péptidos de bloqueo.

La definición de los complejos receptor-ligando fue realizado aplicando una estrategia pseudo sitio dirigida que consistió en un barrido discreto sobre la superficie del homodímero de TLR4. Se definieron vintiseis regiones cúbicas de búsqueda en las que se forzó el acoplamiento de los péptidos de bloqueo individualmente, de las cuales nueve corresponden a la cadena A (A1-A9), ocho a la interfase producida por la formación del homodímero (I1-I8) y nueve a la cadena B (B1-B9). La figura 4.2 corresponde a una representación de la ubicación de las regiones de búsqueda sobre una de las cadenas del homodímero. Su disposición considera la superposición con las regiones contiguas con el propósito de considerar eventuales conformaciones en los bordes de alguna de ellas. Para realizar dicho procedimiento en Vina, se requirió la elaboración de un archivo de configuración por cada región y péptido de bloqueo utilizado en el que se especificaba las dimensiones de la región de búsqueda en angstroms (Å), su centro y la exhaustividad que rige la búsqueda del complejo.

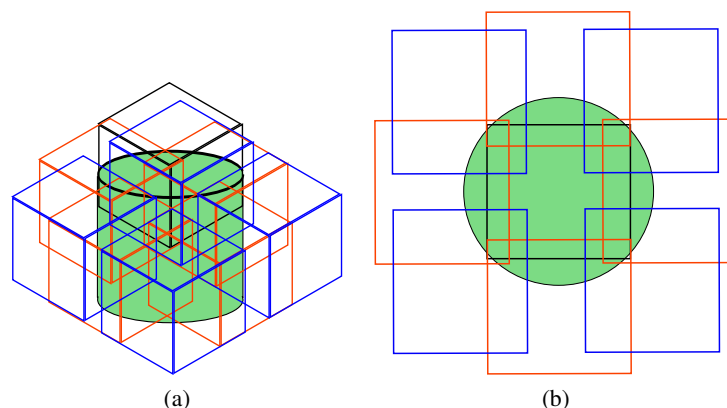


Figura 4.2: Estrategia de *docking* basada en el barrido discreto sobre la superficie del homodímero

Las conformaciones identificadas son jerarquizadas de acuerdo al valor de energía de unión (*binding energy*, E_{binding}) correspondiente a la suma de las energías intermoleculares y la energía libre torsional. En el caso de Vina, la energía intermolecular considera interacciones de carácter hidrofóbico y puentes de hidrógeno. Si bien no considera el cálculo de la energía de solvatación y la energía electrostática en forma explícita como en el caso de Autodock, las interacciones electrostáticas son modeladas como una suma de interacciones hidrofóbicas y de puentes de hidrógeno [73]:

$$(4.1) \quad c = \sum_{i < j} f_{i_t j_t}(r_{ij}) = c_{\text{intra}} + c_{\text{inter}} \quad f_{i_t j_t}(r_{ij}) \equiv h_{i_t j_t}(d_{ij}) \quad d_{ij}(\text{\AA}) = r_{ij} - R_{t_i} - R_{t_j}$$

$$(4.2) \quad s_1 = g(c_1 - c_{\text{intra}1}) = g(c_{\text{inter}1}) \quad s_i = g(c_i - c_{\text{intra}i}) \quad g(c_{\text{inter}}) = \frac{c_{\text{inter}}}{1 + w_{N_{\text{rot}}} N_{\text{rot}}}$$

$$(4.3) \quad c = w_{\text{gauss}1} \cdot e^{-(d/0,5)^2} + w_{\text{gauss}2} \cdot e^{-((d-3)/2)^2} + w_{\text{repulsion}} \cdot f_{\text{repulsion}} + w_{\text{hydrophobic}} \cdot f_{\text{hydrophobic}} + w_{\text{hbond}} \cdot f_{\text{hbond}}$$

$$(4.4) \quad f_{\text{repulsion}} = \begin{cases} d^2 & d < 0\text{\AA} \\ 0 & d \geq 0\text{\AA} \end{cases} \quad f_{\text{hydrophobic}} = \begin{cases} 1 & d < 0,5\text{\AA} \\ 1,5 - d & 0,5 \leq d \leq 1,5 \\ 0 & d > 1,5\text{\AA} \end{cases}$$

$$f_{\text{hbond}} = \begin{cases} 1 & d < -0,7\text{\AA} \\ \frac{-10}{7} \cdot d & -0,7 \leq d \leq 0 \\ 0 & d > 0\text{\AA} \end{cases}$$

Dado el carácter estocástico de las simulaciones de *docking* sujeto al uso de diferentes conformaciones iniciales, cada proceso de búsqueda se realizó en tres ocasiones, excepto para la interfase del homodímero para la cual se realizaron ocho repeticiones. La diferencia en la cantidad de simulaciones se sustenta en la importancia biológica que representa la formación de la interfase que, de acuerdo a los antecedentes presentados, es fundamental en el proceso de señalización celular y, en consecuencia, se cuenta con un mayor número de conformaciones posibles sobre las cuales elegir. A partir de las simulaciones realizadas, la conformación elegida para cada una de las regiones de búsqueda se define de acuerdo al menor valor de E_{binding} determinado por el programa. Teniendo en consideración el margen de error que tiene el programa en la estimación de dicho valor, la elección final de cada complejo proteína-ligando se determinó con información complementaria relativa a la evidencia experimental vigente ligada a los sitios de relevancia biológica asociados a las vías de señalización celular.

Junto con encontrar información relativa a la conformación más estable de los complejos proteína-ligando, el objetivo de las simulaciones de *docking* está asociado a la generación de un punto inicial estable para el inicio de los procesos involucrados en la etapa de dinámica molecular.

4.1.5. Determinación de contactos preliminares a partir de los complejos obtenidos de las etapas de *docking*

Uno de los objetivos de este trabajo está ligado a la identificación de los contactos que establecen los péptidos con el homodímero de TLR4. En efecto, su potencial efecto inhibitorio queda representado a través

de la interacción con regiones del homodímero correspondientes a sitios de acoplamiento con otras proteínas adaptadoras. De acuerdo a esto, se puede obtener una estimación de los residuos que están participando en las interacciones, y/o que forman parte del área de interacción a través de la estimación del área accesible al solvente. Para tales efectos, se calculó a través del *software* NACCESS el área accesible de los residuos de una proteína acopladas al complejo y luego en forma aislada según la siguiente ecuación:

$$(4.5) \quad \Delta ASA = ASA_{aislada} - ASA_{complejo}$$

Este criterio de determinación de contactos fue utilizado en el trabajo de Nuñez y cols. [20] el cual, de manera adicional, considera la definición de interacciones fuertes, como aquellas formadas por residuos que muestran un $\Delta ASA > 40$ [Å²]. Sin embargo, dado que no todos los aminoácidos logran cubrir una superficie superior a dicho valor, se estableció como criterio adicional la variación relativa del ASA, el cual establece como condición necesaria para calificar como contacto una variación superior al 50%.

Al utilizar esta definición es necesario dar cuenta que ella solo considera el cambio absoluto en el ASA de los residuos, por esta razón subestima (sobrestima) los cambios que se presentan en aquellos residuos que originalmente muestran valores pequeños (grandes) de ASA. De manera de resolver este inconveniente, se modificó la definición para que considerara la magnitud original del valor de ASA de los residuos. En la práctica esto se tradujo a calcular la variación relativa del ASA de cada residuo, de acuerdo a la siguiente definición:

$$(4.6) \quad \Delta ASA_{relativa} = \frac{ASA_{aislada} - ASA_{complejo}}{ASA_{aislada}} * 100$$

4.1.6. Selección de programa de dinámica molecular

Dada la versatilidad de programas disponibles para la realización de dinámica molecular, se definió un criterio de elección similar al mencionado para la elección de Autodock Vina para la etapa de *docking*.

- Vigencia: año de la última versión.
- Disponibilidad de soporte técnico
- Tipo de licencia: libre, libre académica o comercial.
- Paralelización.
- Plataforma de implementación: descargable, servidor web o web-mail.
- Referencia del algoritmo.

Otras consideraciones en la elección corresponden a su uso en publicaciones científicas y facilidad de uso. En base a esta información, se eligió el *software* GROMACS en virtud de los siguientes aspectos:

- Implementación de varios campos de fuerza tales como AMBER, CHARMM, GROMOS y OPLS, lo cual lo convierte en un programa versátil en la simulación de varios tipos de sistemas.

- Estructura modular: permite el seguimiento continuo y la observación de resultados de cada una de las etapas de la dinámica molecular.
- Lenguaje de programación: la preparación de archivos no requiere grandes extensiones de tiempo debido a la implementación de comandos ejecutables de fácil comprensión para el usuario.

Los resultados obtenidos están vinculados al modelo que describe los tipos de interacciones existentes entre los átomos que conforman el sistema. En este sentido, la elección de un campo de fuerza particular es fundamental, aspecto que está relacionado con su utilización en publicaciones científicas, estado de actualización, sistemas biológicos donde lo utilizan y estudios comparativos para sistemas biológicos similares a los utilizados en el desarrollo de este trabajo. Bajo estos criterios, se eligió AMBER99SB según los siguientes aspectos:

- Uso en publicaciones científicas: los campos de fuerza de AMBER son utilizados ampliamente en la descripción de toda clase de sistemas biológicos y bioquímicos, situación que es más acotada en los casos de CHARMM y OPLS.
- Estado de actualización: AMBER99SB corresponde a un campo de fuerza actualizado de las versiones anteriores AMBER94 y AMBER99, el cual contempla mejoras en el cálculo de los ángulos ϕ y ψ .
- Estudios comparativos: AMBER99SB logró representar una mejor correlación entre los valores de energía libre experimental y los calculados mediante la metodología MM-PBSA en comparación a OPLS-AA/L, CHARMM27, GROMOS96 43a1 y AMBER03.
- Omisión de nuevas actualizaciones: A pesar de que AMBER03 y AMBER99SB-ILDN son campos de fuerza más recientes, no son utilizados debido a la poca disponibilidad de publicaciones científicas que permitan validar su uso.

Una vez definidos estos dos aspectos fundamentales, se presenta a continuación la metodología seguida desde la obtención de las conformaciones de la etapa de *docking*.

4.1.7. Descripción del protocolo de dinámica molecular

El protocolo de dinámica molecular se presenta en forma consolidada en la figura 4.3, el cual consta de cuatro etapas fundamentales. La primera de ellas corresponde a un proceso de minimización que tiene por objetivo corregir las imprecisiones estructurales que presentan los complejos obtenidos de la etapa de *docking* en presencia de un medio acuoso con presencia de iones. Posteriormente, se pasa a una etapa de dinámica molecular en el que se ejercen restricciones en el movimiento del sistema proteico con el objetivo de reacomodar las moléculas de solvente y iones presentes. A continuación, se lleva a cabo una simulación que busca la estabilización de la presión y la temperatura del sistema en condiciones intracelulares estándar. Finalmente, se realiza la etapa de producción destinada a describir el comportamiento de las estructuras proteicas consideradas durante un período de seis nanosegundos.

En las secciones posteriores, se realiza una descripción general de cada una de las etapas que comprende el protocolo. Sin embargo, el detalle técnico acerca de los parámetros considerados en cada una de las simulaciones está descrito en el anexo A.

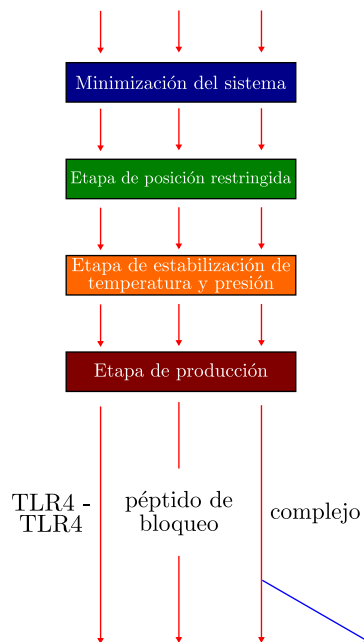


Figura 4.3: Diagrama de bloques del protocolo de dinámica molecular

4.1.7.1. Etapa de minimización

A diferencia de Vina, la dinámica molecular no considera funciones de puntuación para describir el sistema, sino que resuelve la ecuación de Newton para una función de energía potencial descrita por el campo de fuerza utilizado, obteniendo así un comportamiento dinámico del complejo. Dadas las características de Autodock Vina, así como de otros programas de acoplamiento, la identificación de la conformación más estable de un determinado complejo está íntimamente ligado a las coordenadas de los átomos contenidas en los archivos .pdb iniciales. Sin embargo, su funcionamiento basado en la existencia de átomos pesados con la omisión de los átomos de hidrógeno de carácter apolar y el modelamiento de interacciones electrostáticas a través los términos hidrofóbicos y de puentes de hidrógeno, junto con el posicionamiento final de los átomos de hidrógeno en forma arbitraria en la estructura resultante, pueden resultar incompatibles con una estructura definida de acuerdo a AMBER99SB. Según esto, la primera etapa de la simulación de dinámica molecular comprende un procedimiento de minimización que tiene por objetivo reducir la energía potencial del sistema y, en consecuencia, redefinir las coordenadas atómicas con el propósito de identificar una estructura estable.

Para este lograr este propósito, se deben aplicar una serie de procedimientos previos a la realización de la minimización correspondientes a:

1. Preparación del sistema (paquete *pdb2gmx.d*):

- Conversión de formato del archivo de coordenadas: GROMACS funciona de manera óptima con archivos de extensión .gro que, además de contener la información de coordenadas, contienen las dimensiones preliminares de la región de simulación.
- Creación de archivos de topología del sistema y de sus componentes individuales: considera la descripción de las interacciones de enlace y no enlace de acuerdo al campo de fuerza.
- Reposicionamiento de los átomos de hidrógeno: corrige las coordenadas de los átomos de hidrógeno de acuerdo al campo de fuerza.
- Selección del modelo de molécula de agua a utilizar en las etapas sucesivas.

2. Definición de condiciones de borde periódicas (paquete *editconf_d*):
 - Definición de la región de simulación: determinación de su geometría y distancia mínima entre el sistema proteico y los bordes de la región.
 - Ubicación del sistema proteico.
3. Solvatación del sistema (paquete *genbox_d*):
 - Adición de moléculas de agua al interior de la región de simulación.
4. Neutralización del sistema (paquete *genion_d*):
 - Adición de Na^+ y Cl^- al interior de la región de simulación.

Los parámetros utilizados que definen cada uno de estos aspectos están descritos a continuación:

Tabla 4.3: Descripción de parámetros de la región de simulación

Características	Definición
Geometría	Dodecaedro
Distancia mínima al borde	1,0
Modelo de moléculas de agua	TIP3P
Carga del sistema	Neutro
Concentración de iones	0,1 M
Tipo de catión adicionado	Na^+
Tipo de anión adicionado	Cl^-
Condiciones de borde	Periódicas

La definición de estos parámetros se sustenta en diversos aspectos. Con respecto a la geometría del sistema, la definición de una región dodecaédrica permite describir el sistema de una forma lo más cercana posible a una esfera evitando problemas de continuidad en sus bordes y ocupando un volumen equivalente al 71 % de un cubo de dimensiones similares, lo cual permite reducir el tamaño del sistema y, en consecuencia, el tiempo de cómputo. Por otro lado, la definición de la distancia mínima óptima tiene por objetivo evitar errores de cálculo asociado a la interacción entre imágenes periódicas a costa del aumento del sistema a simular.

En lo que respecta al tipo de moléculas de agua, la elección del modelo TIP3P se sustenta en su amplio uso en publicaciones científicas y su simplicidad representada por la asignación de cargas directamente sobre los átomos de hidrógeno y oxígeno que la constituyen. Si bien existen modelos en el que se intenta representar de mejor manera la distribución de la nube electrónica tales como TIP4P y TIP5P que utilizan sitios virtuales de asignación de cargas, se desestimó su uso por cuanto el objetivo de este trabajo está ligado a la descripción de fenómenos macromoleculares y, en consecuencia, no es necesaria la realización de cálculos que incrementen la complejidad del sistema.

La adición de los iones Na^+ y Cl^- tiene como objetivo principal neutralizar el sistema, condición necesaria para su estabilidad. La determinación de una concentración de 0,1 M se emplea en varias publicaciones [87, 98], sin embargo, dependiendo de la carga del sistema se adicionan en exceso alguno de esos iones para cumplir con la neutralización.

En estas condiciones, haciendo de los paquetes *grompp_d* y *mdrun_d*, se procede a la realización de la minimización que depende de un archivo de parámetros de extensión *.mdp* en el cual se establecen las condiciones que rigen la simulación. El detalle acerca de sus especificaciones, así como las de las etapas

posteriores, están indicadas en la tabla A.1. A modo de descripción, la minimización se realiza considerando la definición de una grilla en la que, a partir de la posición de cada átomo, se define un listado de átomos vecinos dentro de un radio de 1,4 nm.

El método de cálculo de las interacciones electrostáticas, definidas por el campo de fuerza AMBER99SB utilizado en este trabajo, se realiza a través del algoritmo PME-Switch (*Particle Mesh Ewald-Switch* en inglés), método que utiliza una combinación del algoritmo PME y una función switch. El algoritmo PME, sustentado en la aplicación de transformadas de Fourier bajo sus condiciones estándar, es ampliamente utilizado en publicaciones científicas debido a la paralelización de sus cálculos, lo cual se traduce en un método veloz y eficaz para la determinación de las interacciones electrostáticas. Su utilización conjunta con la función switch permite la suavización de las fuerzas truncadas en los radios de corte ($r_{\text{coulomb}} = 1,2$) que, de acuerdo a las condiciones de configuración, se fijó en 1,0 nm ($r_{\text{coulomb_switch}} = 1,0$).

En el caso de las interacciones de Van der Waals, estas se evalúan según una función shift en que el potencial de Lennard-Jones 6-12 decae suavemente en todo el rango entre 0 y 1,2 nm, alcanzando una fuerza equivalente a 0 en dicho valor.

De esta forma, se procede al proceso de minimización considerando las estrategias de *steepest descent* y gradiente conjugado en forma combinada, el cual no se detiene hasta alcanzar una tolerancia equivalente a 10 [kJ/mol]. En esta etapa, no existen condiciones de restricción sobre las estructuras a minimizar.

4.1.7.2. Etapa de posición restringida

Dadas las condiciones de la superficie que describe la energía potencial del sistema, resulta factible considerar que la minimización realizada no haya sido suficiente de acuerdo a las tolerancia establecida. En este sentido, la segunda etapa de la dinámica molecular comprende una etapa de posición restringida correspondiente a la resolución de la ecuación de Newton para un cierto intervalo de simulación en el que los átomos constituyentes de las estructuras proteicas son mantenidos en una posición fija, mientras que las moléculas de solvente y los iones introducidos para la neutralización del sistema no presentan ningún tipo de restricción al movimiento. De esta forma, el objetivo que persigue es reacomodar estos elementos del sistema para evitar el colapso del sistema por la presencia de átomos en posiciones no permitidas.

Salvo las condiciones de restricción sobre los átomos distintos del hidrógeno, los parámetros utilizados en la etapa anterior se mantienen. No obstante, se introduce la variable temperatura en la simulación, la cual mediante el algoritmo V-rescale se busca incrementar la temperatura desde 0 K a 200 K utilizando una constante τ_T equivalente a 0,1. De igual manera, la variable presión se introduce al sistema mediante el algoritmo de Berendsen estableciendo una presión de referencia de 1 [bar] y una constante τ_P de 1 [ps]. Al tratarse de la primera simulación en que se resuelve la ecuación de Newton para describir la dinámica del sistema, se establecen condiciones iniciales de velocidad sobre los átomos del sistema mediante una distribución de Maxwell evaluada a una temperatura de 200 K. Esta etapa tiene una duración de 50 [ps] empleando un paso de tiempo equivalente a 1 [fs].

4.1.7.3. Etapa de estabilización de temperatura y presión

Hasta este punto de la dinámica molecular, no han existido consideraciones acerca de la estabilidad de variables de estado tales como la presión y la temperatura del sistema bajo las condiciones intracelulares estándar. Sin embargo, la representación fidedigna del sistema requiere de su consideración ya que ejercen fuerzas que inciden en el movimiento de los átomos que lo constituyen. Según esto, el proceso de

consideración de tales variables requiere de la utilización de algoritmos que permitan incrementar sus valores hasta los valores deseados garantizando la estabilidad del sistema en dicho proceso. Por otro lado, una vez alcanzados deben mantenerse dentro de un rango de operación que asegure el equilibrio del sistema.

Dicho esto, los parámetros que rigen la simulación NPT (número de moles, presión y temperatura constantes) se mantienen en su gran mayoría en comparación a la etapa previa. Sin embargo, la temperatura es fijada en 300 K manteniendo el valor de τ_T . En el caso de la presión, se disminuyó el valor de τ_P a 0,5 [ps], manteniendo la presión en 1 [bar]. Otro aspecto importante es que esta simulación no utiliza condiciones iniciales nuevas, sino que se inicia a partir de las condiciones de salida de la etapa anterior. Esta etapa tiene una duración de 100 [ps] empleando un paso de tiempo equivalente a 1 [fs].

4.1.7.4. Etapa de producción

Una vez lograda la estabilización de la presión y temperatura, se procede finalmente a la etapa de producción, la cual elimina toda clase de restricciones sobre el sistema y lo simula durante un período de 6 [ns] evaluado en pasos de tiempo equivalentes a 2 [fs]. Si bien se conservan la gran mayoría de los parámetros de la etapa anterior, la diferencia más relevante está relacionada con el almacenamiento de los datos de energía y posición en intervalos de 20 [ps], los cuales son utilizados posteriormente en el análisis de interacciones y el cálculo de la variación de energía libre.

4.2. Análisis de datos

El resultado de la etapa de producción corresponde a la trayectoria que siguen cada uno de los átomos del sistema durante un período de seis nanosegundos de simulación correspondientes a trescientos un *frames* separados por intervalos de dos femtosegundos. El análisis de datos de cada una de las trayectorias se realiza idealmente dentro de un rango de tiempo en el que se garantiza la estabilidad de la estructura proteica simulada, lo cual se define mediante la consolidación de un valor de RMSD que experimente variaciones pequeñas.

Otro aspecto clave está dado por el análisis *ex-post* de las interacciones intramoleculares e intermoleculares de las estructuras proteicas presentes en las trayectorias de simulación. Si bien las moléculas de agua y iones presentes en el sistema son esenciales en la descripción del comportamiento del complejo receptor-ligando, el estudio de las interacciones de estos componentes entre sí y con el sistema proteico no fueron realizadas ya que se escapan del objetivo y exige un elevado costo computacional su cálculo.

Una vez definido el intervalo de estudio, se procede con:

- Identificación de contactos: corresponde a definir los contactos que se producen entre los distintos aminoácidos.
- Cálculo de la energía libre de unión: corresponde a analizar la factibilidad termodinámica de la formación del complejo estudiado.

4.2.1. Definición de contactos

Los tipos de contactos existentes, junto con los criterios que los definen, se explican a continuación:

- Puentes salinos: se consideran como puentes salinos las interacciones entre átomos de nitrógeno cargados positivamente y átomos de oxígeno cargados negativamente existentes en los aminoácidos considerados como iónicos a pH neutro (ASP, GLU, HIS y ARG) si su distancia es menor o igual a 4 [Å].
- Puentes de hidrógeno: se consideran como puentes de hidrógeno las interacciones entre átomos clasificados como aceptores y donadores de puentes de hidrógeno que cumplan con una distancia interatómica menor a 3,5 [Å] y cuyo ángulo H-D-A (hidrógeno-dador-aceptor) presente una desviación menor 30° respecto del ángulo ideal de 180°.
- Contacto hidrofóbico: se consideran como contactos hidrofóbicos las interacciones entre los átomos de carbono de los aminoácidos considerados como apolares a pH neutro (ALA, LEU, VAL, ILE, PRO, PHE, MET, TRP y TYR) si su distancia es menor o igual a 5 [Å].
- Cation- π : se consideran como cation- π las interacciones entre el centroide de un aminoácido que cuenta con anillos aromáticos (TRP, PHE, HIS y TYR) y alguno de los átomos de nitrógeno presentes en las cadenas laterales de los aminoácidos básicos en condiciones de pH neutro (HIS, ARG y LYS) si su distancia es menor o igual a 6 [Å].
- Aromáticas: se consideran como aromáticas las interacciones entre los centroides de los aminoácidos que cuentan con anillos aromáticos (TRP, PHE, HIS y TYR) si su distancia es menor o igual a 4,5 [Å].

Tabla 4.4: Criterios para la definición de interacciones identificadas en la etapa de producción

Tipo de interacción	Distancia [Å]	Ángulo [°]	Referencia
Puentes Salinos	4		
Puentes de Hidrógeno	3.5	± 30 ¹	
Hidrofóbica	5		
Cation- π	6		
Aromática	4.5		

¹El ángulo corresponde a la desviación angular desde un Puente de Hidrógeno perfecto que tiene un ángulo H-Donor-Aceptor de valor 0 [°]

Para poder realizar dicha medición, se confeccionaron *plugins* escritos en lenguaje Tcl compatibles con el programa de visualización VMD cuya implementación se sustenta en las herramientas de análisis *Hydrogen Bonds* y *Salt Bridges* disponibles en su versión descargable estándar.

4.2.2. Cálculo de energía libre de unión

El protocolo de cálculo de energía libre está especificado en la figura 4.4. En el desarrollo de este trabajo, en virtud de los diferentes estudios científicos ligados a la aplicación de la metodología MM-PBSA, se aplicaron dos estrategias diferentes para la obtención de la energía libre de unión:

- Utilización de una trayectoria única (figura 3.8).
- Utilización de trayectorias independientes (figura 3.9).

Ambas estrategias requieren de la realización de un estudio basado en el RMSD de cada una de las trayectorias para determinar los *frames* a partir de los cuales se extrae la información para el cálculo. Esta

técnica de cálculo requiere de intervalos de tiempo razonables en el que el valor de RMSD se mantenga estable, con lo cual el criterio de elección de los *frames* se debe sustentar en ello para evitar la obtención de valores errados.

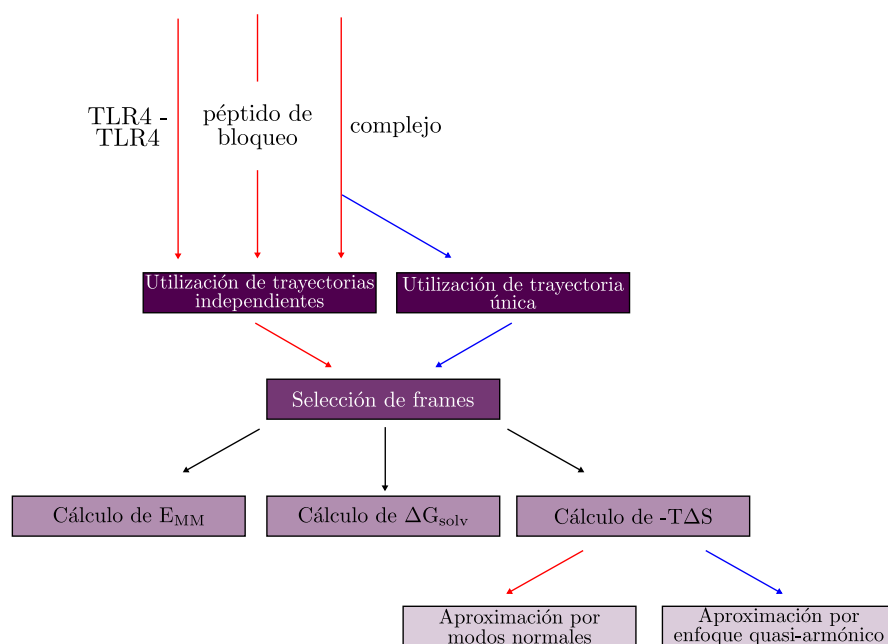


Figura 4.4: Diagrama de bloques del protocolo de dinámica molecular

El cálculo de la energía libre de unión puede ser separada en tres etapas principales correspondientes a:

- Cálculo de E_{MM} (ecuación 3.4)
- Cálculo de ΔG_{Solv} (ecuación 3.6)
- Cálculo de ΔS (ecuaciones 3.10 y 3.11)

E_{MM} está completamente definida en virtud del modelo y los parámetros que emplea AMBER99SB. La obtención de dichos valores se logra a través del uso del paquete *g_energy* de GROMACS. De esta forma, se obtienen directamente los valores de energía de enlace y las asociadas a los ángulos planos y dihedros.

En el caso de la energía electrostática, el paquete *g_energy* entrega tres valores cuya suma corresponde al valor de E_{Coul} :

- Coul-14: Dado que AMBER99SB modela las interacciones 1-4 como interacciones de Van der Waals y de Coulomb con parámetros escalados, es necesario considerar dicha componente electrostática.
- Coul-SR: Por su parte, GROMACS diferencia las interacciones electrostáticas de acuerdo al radio de corte (*rcoulomb*) establecido en el archivo de configuración de la etapa de producción como interacciones de corto alcance (*Short Range*, SR en inglés) y de largo alcance (*Long Range*, LR en inglés).
- Coul-Recip: En lo que respecta a las interacciones de largo alcance, dadas las características del método PME-Switch, GROMACS establece sus valores considerando un sistema homogéneo en el que no es factible desglosarlo en los grupos de energía definidos en la etapa de producción. Esto

también justifica la eliminación de los iones y moléculas de agua presentes en el sistema ya que, de lo contrario, se considerarían interacciones adicionales contrarias al objetivo planteado inicialmente.

En el caso de la energía de Van der Waals (E_{vdw}), el paquete *g_energy* de GROMACS las diferencia en interacciones de corto y largo alcance de acuerdo a un radio de corte (*rvdw*) definidas de forma análoga a las interacciones electrostáticas.

La determinación de la variación de energía libre de solvatación, tanto en su componente polar como apolar, requiere de herramientas distintas del paquete *g_energy*. Al tratarse de una relación lineal dependiente del área accesible al solvente (SASA), es necesario utilizar el paquete *g_sas* de GROMACS, el cual entrega dichos valores en forma directa. De esta forma, utilizando $\gamma = 2.2$ [kJ mol⁻¹ nm⁻²] y $\beta = 3.84$ [kJ mol⁻¹], se calcula dicho término a través de la ecuación (3.9) [85].

En lo que respecta a la variación de energía libre de solvatación polar, no es posible determinarla a partir de GROMACS ya que su cálculo supone un ciclo termodinámico que implica el paso del sistema proteico desde el vacío a un medio continuo de características similares al agua, emulando las condiciones de concentración de iones que presentaba la simulación de producción. Para estos efectos, se utiliza el programa APBS, el cual permite desarrollar tal cálculo, además de otro tipo de funciones. Si bien existen varios parámetros que deben ser definidos, las constantes dieléctricas del sistema proteico, vacío y el medio continuo resultan ser fundamentales al momento de establecer correctamente la energía libre.

Dadas las características de funcionamiento de APBS, el cálculo debe realizarse para cada *frame* por separado, lo cual exige los siguientes procedimientos:

- Conversión de la trayectoria de simulación en un archivo único de extensión *.pdb* que contenga la información de coordenadas de todos los frames.
- Separación del archivo *.pdb* resultante según *frame*.
- Generación de un archivo *.pqr* a partir del archivo *.pdb* correspondiente que contiene información de coordenadas, radios y cargas atómicas.

Todas estas tareas, junto con la ejecución del cálculo a partir de un archivo de configuración, fueron realizadas mediante la acción de un *script* desarrollado en lenguaje Python con el propósito de automatizar cada una de las etapas y efectuar los cálculos de manera continua.

En lo que respecta a los parámetros de APBS, dado que la estimación del potencial electrostático se establece de acuerdo a la ecuación no lineal de Poisson-Boltzmann (3.7), se definen varios parámetros entre los cuales destaca el tamaño de la molécula de solvente y las constantes dieléctricas del solvente y el soluto. El primero define la superficie del soluto al recorrer toda su estructura, el cual es definido como 1,4 [Å]. Tanto el solvente como el sistema proteico están caracterizados por una constante dieléctrica que, para efectos del desarrollo de este trabajo, fue definida como 78,4 y 2,0 respectivamente, atribuyéndole al vacío una constante dieléctrica de 2,0. Intentando simular las condiciones con que se realizó la dinámica molecular, se fijó una concentración de 0,1 M de Na⁺ y Cl⁻ y una temperatura de 300 K.

Por último, el cálculo de la variación de entropía del sistema fue determinado mediante dos estrategias diferentes:

- Aplicación de la técnica de modos normales sobre el último *frame* de la simulación extraídas a partir de las trayectorias independientes.

- Aplicación del enfoque quasi-armónico sobre las trayectorias extraídas sólo de la simulación del complejo.

En el caso de los modos normales, se aplicaron los siguientes procedimientos:

- Aplicación de etapas sucesivas de minimización con disminución progresivo del paso de integración hasta alcanzar un valor de energía neto menor a $1e-6$ [kJ/mol].
- Obtención de la matriz Hessiana utilizando el integrador nm presente en GROMACS.
- Diagonalización de la matriz Hessiana y obtención de los valores, vectores y frecuencias propias resultantes a través del paquete *g_nmeig* de GROMACS.
- Utilización de las frecuencias propias de oscilación para el cómputo de la entropía conformacional según la ecuación 3.10.

En el caso del enfoque quasi-armónico, los pasos aplicados fueron los siguientes:

- Generación de una trayectoria de simulación a partir de la original que considera un ajuste rotacional y traslacional con el efecto de considerar sólo el efecto vibracional en el cálculo de entropía.
- Obtención y diagonalización de la matriz de covarianza, y obtención de los valores y vectores propios utilizando el paquete *g_covar* de GROMACS.
- Utilización de los valores propios para el cómputo de la entropía conformacional según la ecuación 3.11.

4.3. Materiales y equipos utilizados

Todos los recursos empleados para el desarrollo del proyecto fueron de carácter no financieros ya que son de carácter gratuito o bien de propiedad del Departamento de Ingeniería Química y Biotecnología de la Universidad de Chile, los cuales pudieron ser utilizados libremente para la realización de este estudio.

Tal como se mencionó en la descripción del proyecto, este trabajo es parte de un proyecto FONDECYT, el cual cuenta con apoyo financiero para la adquisición de los equipos necesarios, acondicionamiento de zonas de trabajo, entre otros fines. Dentro de los recursos computacionales disponibles, destacó el uso del cluster “Eowyn”, perteneciente al Laboratorio de Modelamiento de Procesos y Cómputo Distribuido, cuyas especificaciones están descritas en la tabla 4.5. Disponer de dicho recurso computacional ha permitido disminuir el tiempo de simulación requerido para desarrollar la metodología previamente descrita en aproximadamente 20,8% según los resultados preliminares logrados durante la ejecución del proyecto FONDECYT.

Tabla 4.5: Herramientas computacionales usadas en el proyecto

Equipo	Tipo	Descripción
Clúster de producción <i>Eowyn</i>	Hardware	80 Núcleos, CPU Quad Core AMD Opteron TM , 16 x 10 GBi RAM, 1 TBi de espacio en disco RAID1, conectado a través de una red de 1 Gbs
Ordenador	Hardware	Procesador AMD Athlon TM 64 X2 Dual Core 4600+, 4 GBi RAM
Linux Centos OS 5.5	Software	Sistema Operativo implementado en Clúster de producción
Linux Ubuntu OS 11.04	Software	Sistema Operativo implementado en Ordenador
Condor 7.4.4	Software	Sistema de gestión de recursos para cálculo en paralelo implementado en Clúster de producción

Respecto a los *software* empleados, la tabla 4.6 detalla sus especificaciones y las labores en los que fueron utilizados. Es importante recalcar que todos ellos cuentan con licencias libres de tipo académica cuyas condiciones de uso establecen que deben ser citados apropiadamente de acuerdo a las condiciones definidas por sus desarrolladores.

Tabla 4.6: Software especializado utilizado para el desarrollo del proyecto

Software	Versión	Propósito	Sitio Web	Referencia
Autodock Vina	1.1.2	Docking	http://vina.scripps.edu/	Trott y Olson (2010) [73]
Pymol	1.3	Visualización	http://pymol.org	Schrodinger, LLC
Chimera	1.5.3	Visualización	http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/	Ferrin <i>et al.</i> (2004) [99]
VMD	1.9.1	Visualización/Análisis	http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/	Humphrey <i>et al.</i> (1996) [100]
GROMACS	4.5.5	Dinámica Molecular	http://www.gromacs.org	Berendsen <i>et al.</i> (1995) [101]

Junto con los recursos financieros y computacionales, el desarrollo de este trabajo contó con el apoyo docente de los académicos José Cristian Salgado Herrera y Gerald Zapata Torres de la Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas y la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile respectivamente. El profesor Salgado cuenta con un amplio conocimiento en el modelamiento matemático de sistemas químicos y biológicos, lenguajes de programación y tecnologías de información. El profesor Zapata posee un entendimiento cabal de las interacciones moleculares a través de herramientas de docking enfocadas al diseño de productos farmacéuticos.

Finalmente, el trabajo realizado contó con aportes económicos a través de becas entregadas a través de los proyectos FONDECYT 1120280 (Searching for possible deprotonation sites for substrates and inhibitors of human MAO-A) y FONDECYT 11080016 (Mathematical modeling of the interaction between cell-penetrating TIR BB loop decoy peptides (BBPs) and toll-like receptor 4 and 2 (TLR4 and TLR2) destinadas a su desarrollo y a los costos asociados a su exposición en diversos congresos tales como el Congreso Nacional de Estudiantes de Ingeniería en Biotecnología (CONEIB) y el Congreso Nacional de Estudiantes de Ingeniería Química (CONEIQ) desarrollados durante el año 2012.

Capítulo 5

Resultados

Los resultados logrados a través de la metodología de *docking* planteada en este trabajo buscan establecer, en forma preliminar, un acoplamiento probable de los péptidos de bloqueo usados en este trabajo sobre el homodímero de TLR4 que pueda representar una conformación lo más cercana posible al mínimo global de energía.

Por su parte, la dinámica molecular busca describir el comportamiento dinámico de los complejos receptor-ligando determinados a través de los algoritmos de acoplamiento, los cuales constituyen puntos iniciales estables para el cumplimiento de las etapas descritas en el protocolo de dinámica molecular.

Sin embargo, el uso conjunto de ambas herramientas tiene como objetivo la identificación de sitios de interacción entre el homodímero de TLR4 y los péptidos de bloqueo. Dicha información, consolidada con la cantidad, permanencia y tipos de contactos establecidos, entrega datos importantes acerca del potencial efecto terapéutico que puedan tener los péptidos de bloqueo elaborados a partir de los *loops* BB de cada una de las proteínas estudiadas.

5.1. Caracterización de los péptidos de bloqueo

En virtud de los antecedentes bibliográficos presentados en este trabajo, los *loops* BB de los receptores TLR4 [20,55,56] y las proteínas adaptadoras MAL [47,61], MyD88 [60] y TRAM [48] son fundamentales en la generación de respuestas inflamatorias a través de la vías de señalización TLR4-TLR4. Específicamente, la homodimerización de TLR4 crea una nueva superficie de interacción a través de sus *loops* BB [20, 55, 56] que permite el acoplamiento de MAL y TRAM [20]. Si bien el *loop* BB de MAL interviene directamente en su interacción con el homodímero [20] y en forma parcial con MyD88 [61], TRAM interactúa con el homodímero a través de zonas distintas de su *loop* BB [20]. Por otra parte, el *loop* BB de MyD88 está involucrado en su acoplamiento con MAL [60], sin embargo, existen estudios en que se detalla su participación en la formación de los complejos TLR4-MAL-MyD88 [22].

De esta forma, buscando validar la utilización de los péptidos de bloqueo basados en los *loops* BB, el primer estudio realizado en este trabajo estuvo orientado al alineamiento de sus secuencias realizado a través del *software* Clustal X. Tal cual se indica en la figura 5.1a, todos los péptidos excepto pepTRAM presentan dos regiones idénticas. Una de ellas corresponde la región RD ubicada hacia la región N-terminal, mientras que la región PG está localizada en la región central. Otro aspecto relevante está dado por el grado de conservación de su extremo C-terminal. Esto se ve respaldado por la matriz identidad obtenida descrita en la tabla 5.1 que señala una similitud del 50% entre pepMAL y pepTLR4, 36% entre pepMAL y pepMyD88, y 29% entre pepMyD88 y pepTLR4. De esta manera, en virtud de los antecedentes presentados, los resultados expuestos sugieren que el bloqueo de las vías de señalización TLR4-TLR4 a través del uso de estos péptidos es factible en virtud de su similitud.

La figura 5.1b muestra el alineamiento de las secuencias incluyendo a pepTRAM dentro del análisis. En comparación al resto, este péptido cuenta con un aminoácido menos en su secuencia, sin embargo, presenta un aminoácido de cisteína adicional entre los residuos de prolina y glicina que definen la región PG conservada. Si bien la matriz identidad descrita en la tabla 5.1 señala que el grado de similitud con respecto a los demás péptidos no supera el 17%, los antecedentes presentados señalan que la región PG de los *loops* BB de los receptores TLR4 [20, 55, 56] y la proteína adaptadora MAL [20] son claves en su acoplamiento. Al estar presente en pepTRAM, no es posible descartar *a priori* su eventual efectividad como bloqueador de las vías de señalización TLR4-TLR4, lo cual pretende ser esclarecido a través de este trabajo.

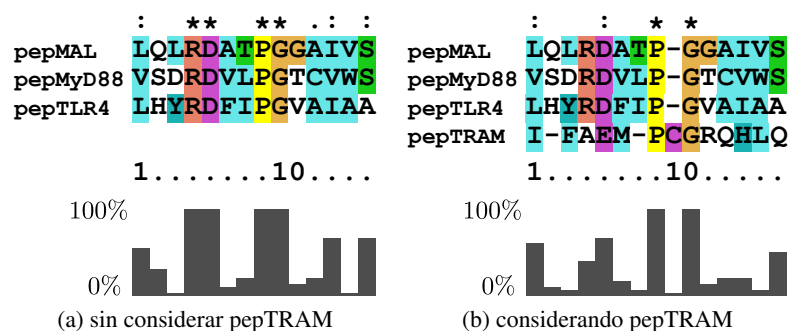


Figura 5.1: Alineamiento de secuencias entre los péptidos de bloqueo diseñados por Salgado a través del programa Clustal X

Color definidos según programa

Símbolos adicionales indican grados de conservación: * : idénticos; : : sustitución conservada; . : sustitución semi-conservada

Barras señalan conservación del aminoácido en la ubicación correspondiente

Tabla 5.1: Matriz identidad de los péptidos de bloqueo utilizados obtenida a través de Clustal X

	pepMAL	pepMyD88	pepTLR4	pepTRAM
pepMAL	100 %	36 %	50 %	17 %
pepMyD88	36 %	100 %	29 %	17 %
pepTLR4	50 %	29 %	100 %	17 %
pepTRAM	17 %	17 %	17 %	100 %

5.2. Modelos preliminares obtenidos de la etapa de *docking*

5.2.1. Elección de los modelos

Desde una perspectiva teórica, determinar la conformación que adopta un complejo proteína-ligando mediante algoritmos de *docking* depende de las características de la región de búsqueda y del péptido de bloqueo correspondiente. Su identificación corresponde a un problema de optimización en donde la conformación inicial del péptido de bloqueo varía en forma aleatoria entre cada simulación, excepto en los casos en que se considera rigidez total del ligando. En este sentido, las conformaciones obtenidas en cada simulación corresponden teóricamente a mínimos locales de energía que no representan necesariamente la conformación más estable de un complejo.

En virtud de la cantidad de simulaciones realizadas, las figuras 5.2-5.5 muestran las menores energías de unión calculadas por Vina para cada uno de los complejos formados entre el homodímero de TLR4 y los diferentes péptidos de bloqueo según región de búsqueda. En cada uno de ellas, las barras de color púrpura corresponden a la región que contiene los *loops* BB en forma íntegra. Por su parte, las barras de color naranja contienen dicha región de manera parcial, mientras que las de color verde no poseen ninguno de sus elementos constituyentes.

En todos los complejos simulados, las conformaciones de menor energía se concentran en la región I2 correspondiente al sector de la interfase que contiene la hélice αC de uno de los monómeros de forma significativa. Esta región de búsqueda está en oposición a la región I1 que contiene los *loops* BB del homodímero de TLR4 en los que se focaliza este trabajo.

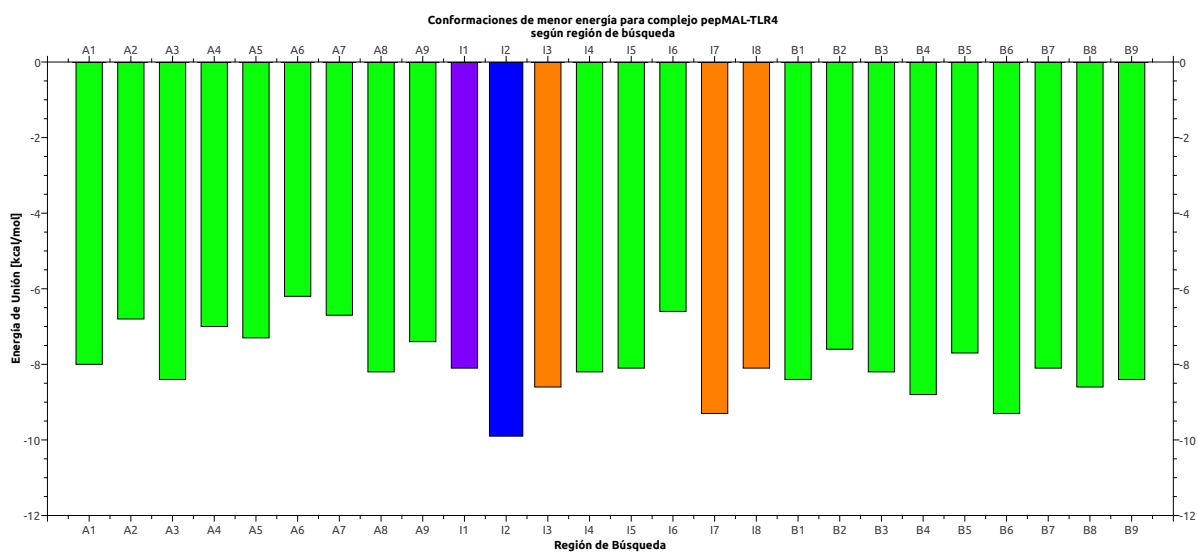


Figura 5.2: Mejores conformaciones identificadas para el complejo pepMAL-TLR4 según región de búsqueda

- █: región que no incluye los *loops* BB
- █: región que incluye los *loops* BB parcialmente
- █: región que incluye los *loops* BB completamente
- █: región que incluye las hélices α C

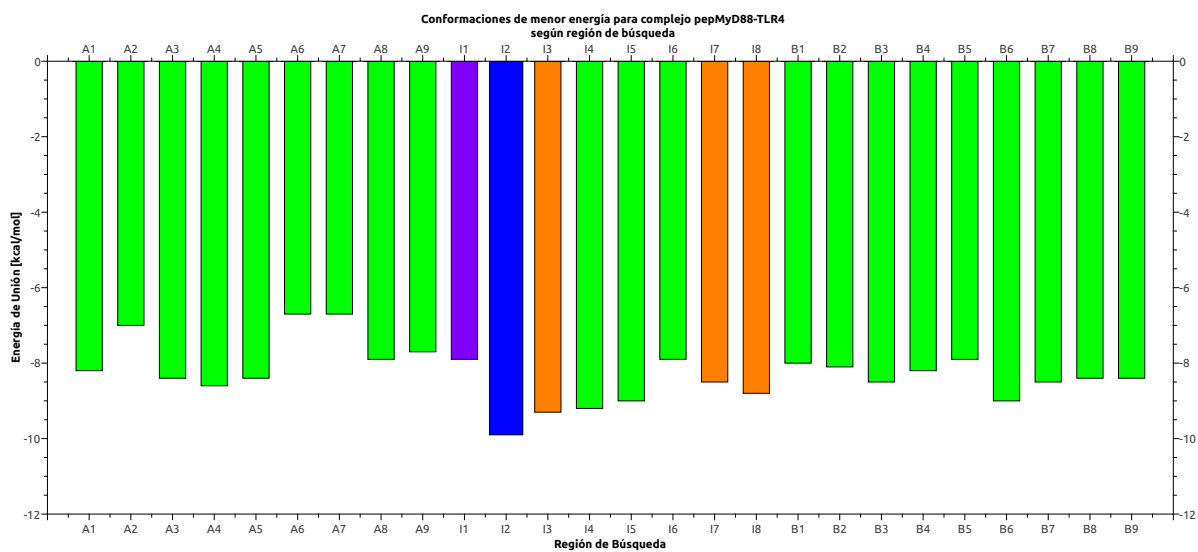


Figura 5.3: Mejores conformaciones identificadas para el complejo pepMyD88-TLR4 según región de búsqueda

- █: región que no incluye los *loops* BB
- █: región que incluye los *loops* BB parcialmente
- █: región que incluye los *loops* BB completamente
- █: región que incluye las hélices α C

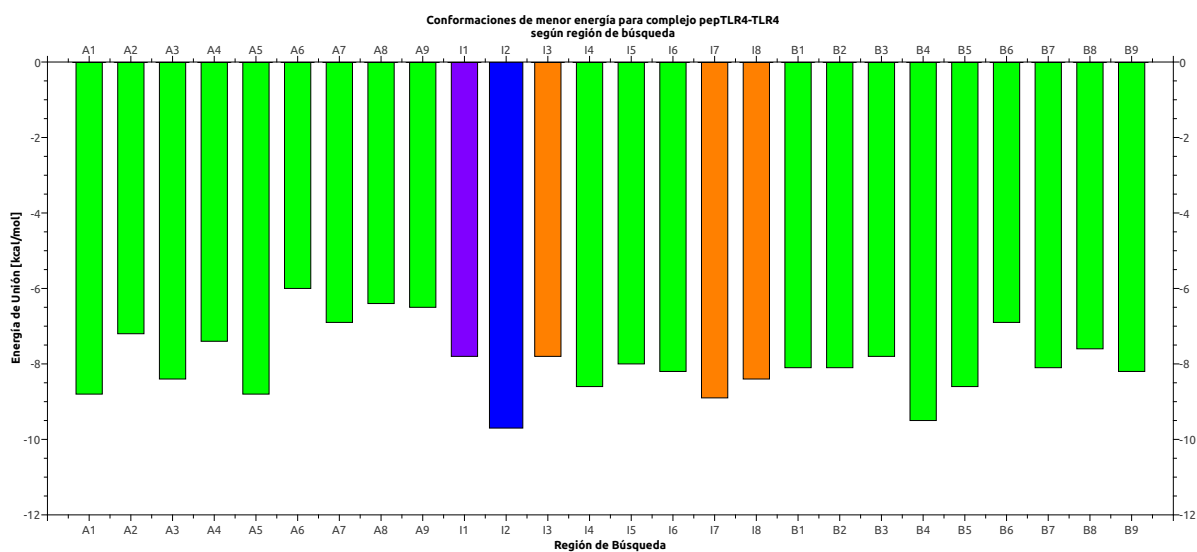


Figura 5.4: Mejores conformaciones identificadas para el complejo pepTLR4-TLR4 según región de búsqueda

- región que no incluye los *loops* BB
- región que incluye los *loops* BB parcialmente
- región que incluye los *loops* BB completamente
- región que incluye las hélices α C

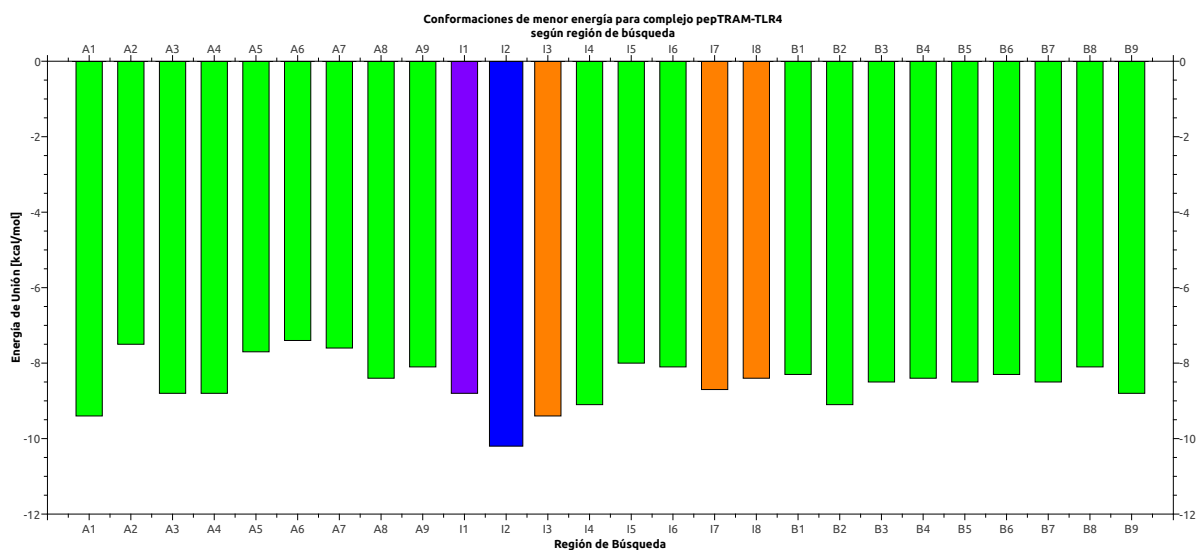


Figura 5.5: Mejores conformaciones identificadas para el complejo pepTRAM-TLR4 según región de búsqueda

- región que no incluye los *loops* BB
- región que incluye los *loops* BB parcialmente
- región que incluye los *loops* BB completamente
- región que incluye las hélices α C

De acuerdo a los desarrolladores del *software* utilizado [73], el margen de error equivalente a

$\pm 2,85$ [kcal/mol] no permite discriminar en forma clara qué región y qué conformaciones tienen la menor energía de unión. En virtud de lo anterior, de acuerdo a los antecedentes biológicos presentados [20, 22, 54–56], se establece como prioritario la elección de conformaciones energéticamente más favorables extraídas de la región II que incluye en forma completa los *loops* BB del homodímero, marginando el resto de los sectores del análisis. De esta manera, la figura 5.6 muestra las estructuras de los complejos proteína-ligando elegidas que indica visualmente que el péptido de bloqueo pepMyD88 (b) logra cubrir una mayor superficie de interacción con los *loops* BB, seguido de pepTRAM (d), pepMAL (a) y pepTLR4 (c).

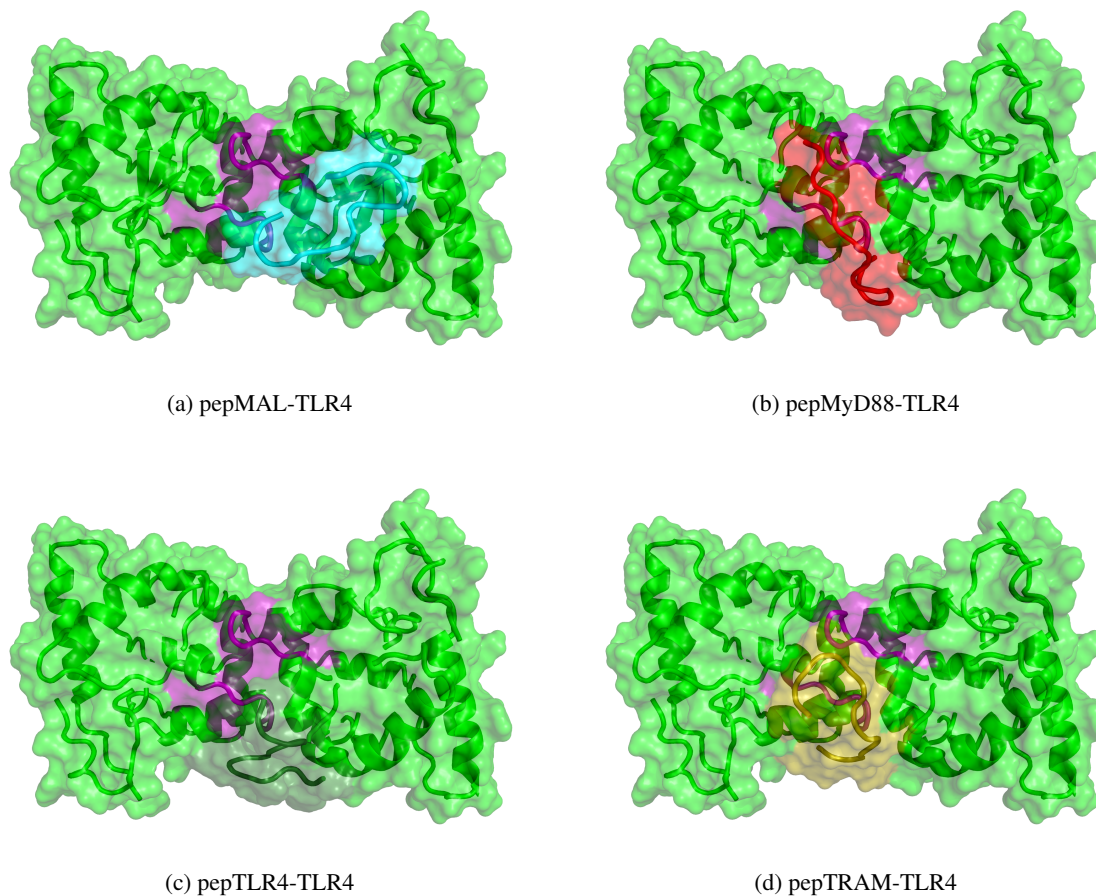


Figura 5.6: Conformaciones elegidas de la etapa de *docking*
 (—: TLR4; —: pepMAL; —: pepMyD88; —: pepTLR4; —: pepTRAM; —: *loop* BB)

5.2.2. Contactos identificados

A partir de los complejos receptor-ligando descritos en la figura 5.6, se identificaron los contactos que establece cada uno de los péptidos de bloqueo con el homodímero de TLR4. A través del *software* NACCESS y, de acuerdo a las condiciones establecidas para la definición de posibles contactos en base al área accesible al solvente (SASA) según las ecuaciones XXX, se elaboró una selección preliminar que fue posteriormente definida con un criterio robusto de distancia aplicado en el programa de visualización Chimera.

Las tablas 5.2-5.5 describen los contactos identificados entre cada uno de los péptidos de bloqueo y el homodímero de TLR4. A modo general, cada uno de ellos establece interacciones hidrofóbicas predominantemente con aminoácidos de los *loops* BB del homodímero que, de acuerdo a los estudios de mutagénesis presentados como antecedentes [20, 55, 56], resultan ser esenciales en el acoplamiento de las

proteínas adaptadoras MAL y TRAM. Estos aminoácidos están destacados en cada una de las tablas en color amarillo.

A pesar de lo anterior, cada uno de ellos presenta sus particularidades cuyas especificaciones son descritas a continuación.

5.2.2.1. pepMAL-TLR4

A partir de la tabla 5.2 se puede constatar la influencia de aminoácidos particulares del péptido de bloqueo. La región L45-L47 ubicada hacia el extremo N-terminal establece predominantemente interacciones hidrofóbicas con los *loops* BB del homodímero (Y48, I215, P216). Por su parte, el aminoácido R48 de pepMAL contribuye al acoplamiento con el homodímero a través de interacciones catión- π (Y19) y puentes salinos (E24) con la hélice α A de la cadena A.

A pesar de contar con un gran número de interacciones hacia el extremo N-terminal, el resto del péptido de bloqueo no presenta el mismo comportamiento, destacándose la participación del aminoácido de serina terminal (S58) en la formación de puentes de hidrógeno con aminoácidos pertenecientes al *loop* BB de la cadena A (R49 y D50).

Según esto, la importancia de los *loops* BB del homodímero, así como de la hélice α A de la cadena A, destacan en el acoplamiento del péptido de bloqueo.

Tabla 5.2: Interacciones preliminares del complejo pepMAL-TLR4

Aminoácido Ligando				Aminoácido Homodímero TLR4					Tipo de Contacto					
AA	N°	Cadena	Tipo AA	AA	N°	Cadena	Región	Tipo AA	PH	PS	H	C π	A	
LEU	45	T	Hidrofóbico	TYR	48	A	BB	Hidrofóbico			X			
				ARG	49	A	BB	Polar +	X					
				PRO	216	B	BB	Hidrofóbico			X			
GLN	46	T	Polar	TYR	48	A	BB	Polar	X					
				ILE	215	B	BB	Hidrofóbico						
				PRO	216	B	BB	Hidrofóbico						
LEU	47	T	Hidrofóbico	TYR	48	A	BB	Polar			X			
				ILE	215	B	BB	Hidrofóbico			X			
ARG	48	T	Polar +	TYR	19	A	AA	Polar	X			X		
				GLU	24	A	α A	Polar -		X				
				ARG	28	A	α A	Polar +	X					
				TYR	48	A	BB	Hidrofóbico	X			X		
				GLY	217	B	BB	Hidrofóbico						
ALA	50	T	Hidrofóbico	ARG	28	A	α A	Polar +						
				TYR	48	A	BB	Hidrofóbico			X			
				ARG	49	A	BB	Polar +						
PRO	52	T	Hidrofóbico	GLU	36	A	α A	Polar -						
				GLN	43	A	AA	Polar						
				ARG	49	A	BB	Polar +						
GLY	53	T	Hidrofóbico	GLU	36	A	α A	Polar -						
				GLN	43	A	AA	Polar						
GLY	54	T	Hidrofóbico	GLN	43	A	AA	Polar						
ILE	56	T	Hidrofóbico	TYR	13	A	β A	Polar			X			
				GLN	43	A	AA	Polar						
SER	58	T	Polar	TYR	13	A	β A	Polar	X					
				LEU	44	A	β B	Hidrofóbico						
				ARG	49	A	BB	Polar -	X					
				ASP	50	A	BB	Polar -	X					

 : aminoácido cuya mutación interrumpe completamente la homodimerización de TLR4 [20,56]

 : aminoácido que participa en la formación del homodímero y el acoplamiento de las proteínas adaptadoras MAL y TRAM [20,22]

 : aminoácido cuya mutación genera interferencia en el acoplamiento de proteínas adaptadoras [20]

Cadena: A: cadena A homodímero TLR4; B: cadena B homodímero TLR4; T: péptido de bloqueo

Región: N-t: extremo N-terminal; XX: *loop* XX; α X: hélice α X; β X: lámina β X; C-t: extremo C-terminal

Tipo de contacto: PH: puente de hidrógeno; PS: puente salino; H: hidrofóbico; C π : catión- π ; A: aromático

5.2.2.2. pepMyD88-TLR4

La tabla 5.3 describe los contactos identificados entre pepMyD88 y el homodímero de TLR4. Siendo mayoritarias las interacciones hidrofóbicas, estas se encuentran distribuidas a lo largo de todo el péptido de bloqueo. Su extremo N-terminal, a través de V46, establece contactos con los residuos P53 y G54 que forman parte del *loop* BB de la cadena A y con Y211 cercano al *loop* BB de la cadena B. La región central de pepMyD88, L52-P53, contribuyen en la generación de contactos hidrofóbicos con varios aminoácidos que forman parte del *loop* BB de la cadena B (I215,G217 y V218). De forma similar, el aminoácido W58 del péptido de bloqueo establece interacciones hidrofóbicas con aminoácidos de dicha región (V218 y A219) y alrededores a esta (A222).

Sin embargo, existen dos regiones particulares que contribuyen con otros tipos de interacciones.

La región D48-R49, a través del residuo de arginina, también establece contactos con los *loops* BB del homodímero, sin embargo, las establece a través de la formación de puentes de hidrógeno (Y48) e interacciones catión- π (F51 y F214). Por su parte, el residuo de ácido aspártico participa generando puentes salinos con un aminoácido de arginina cercano al *loop* BB de la cadena B (R212). La región W58-S59, correspondiente al extremo C-terminal del péptido de bloqueo, establece puentes de hidrógeno con aminoácidos que pertenecen al *loop* AA de la cadena A del homodímero (S20 y S21).

De esta manera, en lo que respecta al homodímero de TLR4, prácticamente la totalidad del *loop* BB de la cadena B (F214, I215 y G217-A219) participa de las interacciones con pepMyD88.

Tabla 5.3: Interacciones preliminares del complejo pepMyD88-TLR4

Aminoácido Ligando				Aminoácido Homodímero TLR4					Tipo de Contacto				
AA	N°	Cadena	Tipo AA	AA	N°	Cadena	Región	Tipo AA	PH	PS	H	C π	A
VAL	46	T	Hidrofóbico	PRO	53	A	BB	Hidrofóbico			X		
				GLY	54	A	BB	Polar					
				TYR	211	B	BB	Polar			X		
				ARG	212	B	BB	Polar +					
ASP	48	T	Polar -	PRO	53	A	BB	Hidrofóbico					
				TYR	211	B	BB	Polar	X				
				ARG	212	B	BB	Polar +		X			
ARG	49	T	Polar +	TYR	48	A	BB	Polar	X				
				PHE	51	A	BB	Hidrofóbico				X	
				PRO	53	A	BB	Hidrofóbico					
				PHE	214	B	BB	Hidrofóbico					X
				PRO	216	B	BB	Hidrofóbico					
ASP	50	T	Polar -	PHE	214	B	BB	Hidrofóbico					
				ILE	215	B	BB	Hidrofóbico					
				PRO	216	B	BB	Hidrofóbico					
LEU	52	T	Hidrofóbico	GLU	24	A	α A	Polar -					
				TYR	48	A	BB	Polar			X		
				GLY	217	B	BB	Polar					
PRO	53	T	Hidrofóbico	ILE	215	B	BB	Hidrofóbico			X		
				GLY	217	B	BB	Polar					
				VAL	218	B	BB	Hidrofóbico			X		
THR	55	T	Polar	SER	21	A	AA	Polar	X				
				GLU	24	A	α A	Polar -	X				
TRP	58	T	Hidrofóbico	SER	21	A	AA	Polar					
				VAL	218	B	BB	Hidrofóbico			X		
				ALA	219	B	BB	Hidrofóbico			X		
				ALA	222	B	α B	Hidrofóbico			X		
SER	59	T	Polar	SER	20	A	AA	Polar	X				
				SER	21	A	AA	Polar	X				
				SER	83	A	CC	Polar	X				
				ALA	219	B	BB	Hidrofóbico					
				ALA	222	B	α B	Hidrofóbico					

■: aminoácido cuya mutación interrumpe completamente la homodimerización de TLR4 [20,56]

■: aminoácido que participa en la formación del homodímero y el acoplamiento de las proteínas adaptadoras MAL y TRAM [20,22]

■: aminoácido cuya mutación genera interferencia en el acoplamiento de proteínas adaptadoras [20]

Cadena: A: cadena A homodímero TLR4; B: cadena B homodímero TLR4; T: péptido de bloqueo

Región: N-t: extremo N-terminal; XX: *loop* XX; α X: hélice α X; β X: lámina β X; C-t: extremo C-terminal

Tipo de contacto: PH: puente de hidrógeno; PS: puente salino; H: hidrofóbico; C π : catión- π ; A: aromático

5.2.2.3. pepTLR4-TLR4

La tabla 5.4 describe los contactos identificados entre pepTLR4 y el homodímero de TLR4. Una región considerable ubicada hacia el extremo N-terminal del péptido de bloqueo (L46-F51) no presenta ningún tipo de interacción con el homodímero. No obstante, el acoplamiento. A pesar de lo anterior, el resto de pepTLR4 (I52-V55 y A58-A59) establece sustancialmente contactos hidrofóbicos con sectores de los *loops* BB del homodímero (Y48, P216-A219).

Un aspecto importante a mencionar corresponde a la influencia de los residuos de prolina presentes tanto en el péptido de bloqueo (P53) como en la cadena B del homodímero (P216). En el caso de pepTLR4, dicho aminoácido participa en la generación de interacciones hidrofóbicas con una región importante del *loop* BB de la cadena B (V218-A219). Por su parte, P216 participa en interacciones hidrofóbicas con aminoácidos ubicados hacia el extremo C-terminal de pepTLR4 (V55 y A58-A59).

Tabla 5.4: Interacciones preliminares del complejo pepTLR4-TLR4

Aminoácido Ligando				Aminoácido Homodímero TLR4				Tipo de Contacto					
AA	N°	Cadena	Tipo AA	AA	N°	Cadena	Región	Tipo AA	PH	PS	H	C π	A
LEU	46	T	Hidrofóbico	SER	21	A	AA	Polar					
				GLN	22	A	AA	Polar					
				GLU	24	A	α A	Polar -					
				ARG	28	A	α A	Polar +					
TYR	48	T	Polar	SER	21	A	AA	Polar	X				
				GLN	22	A	AA	Polar	X				
				ALA	222	B	α B	Hidrofóbico			X		
				HIS	226	B	α B	Polar +	X				
PHE	51	T	Hidrofóbico	HIS	226	B	α B	Polar +					X
				GLU	227	B	α B	Polar -					
ILE	52	T	Hidrofóbico	VAL	218	B	BB	Hidrofóbico			X		
PRO	53	T	Hidrofóbico	SER	21	A	AA	Polar					
				GLY	217	B	BB	Polar					
				VAL	218	B	BB	Hidrofóbico			X		
				ALA	219	B	BB	Hidrofóbico			X		
				ALA	222	B	α B	Hidrofóbico			X		
GLY	54	T	Polar	GLY	217	B	BB	Polar					
				VAL	218	B	BB	Hidrofóbico					
VAL	55	T	Hidrofóbico	GLU	24	A	α A	Polar -					
				ARG	28	A	α A	Polar +					
				TYR	48	A	BB	Polar			X		
				PRO	216	B	BB	Hidrofóbico			X		
				GLY	217	B	BB	Polar					
ALA	58	T	Hidrofóbico	TYR	48	A	BB	Polar			X		
				PRO	216	B	BB	Hidrofóbico			X		
				GLY	217	B	BB	Polar					
ALA	59	T	Hidrofóbico	TYR	48	A	BB	Polar			X		
				PRO	216	B	BB	Hidrofóbico			X		

■: aminoácido cuya mutación interrumpe completamente la homodimerización de TLR4 [20,56]

■: aminoácido que participa en la formación del homodímero y el acoplamiento de las proteínas adaptadoras MAL y TRAM [20,22]

■: aminoácido cuya mutación genera interferencia en el acoplamiento de proteínas adaptadoras [20]

Cadena: A: cadena A homodímero TLR4; B: cadena B homodímero TLR4; T: péptido de bloqueo

Región: N-t: extremo N-terminal; XX: *loop* XX; α X: hélice α X; β X: lámina β X; C-t: extremo C-terminal

Tipo de contacto: PH: puente de hidrógeno; PS: puente salino; H: hidrofóbico; C π : catión- π ; A: aromático

5.2.2.4. pepTRAM-TLR4

La tabla 5.5 describe los contactos identificados entre pepTRAM y el homodímero de TLR4. En el caso de este péptido de bloqueo, las interacciones hidrofóbicas se encuentran equiparadas con la formación de puentes de hidrógeno. El aminoácido F48, ubicado hacia su extremo N-terminal, establece contactos hidrofóbicos con el *loop* BB de la cadena B (I215). Por su parte, el aminoácido de prolina ubicado en la región central de pepTRAM (P52) también participa de este tipo de contactos con los *loops* BB del homodímero (Y48 y P216).

En lo que respecta al extremo C-terminal, el aminoácido L58 establece contactos hidrofóbicos con aminoácidos presentes en el *loop* BB de la cadena B (V218) y en aminoácidos adyacentes a dicha zona (A222). Sin embargo, el péptido de bloqueo presenta mayoritariamente puentes de hidrógeno con regiones

distintas de los *loops* BB del homodímero. En efecto, los aminoácidos R55 y H57 generan contactos de este tipo con aminoácidos presentes en el *loop* AA de la cadena A del homodímero (Y19 y S21), mientras que el aminoácido de glutamina terminal de pepTRAM (Q59) establece interacciones con la hélice α B de la cadena B del homodímero (H226, E227 y K231).

Según lo anterior, si bien los *loops* BB del homodímero participan a través de interacciones hidrofóbicas, los contactos que establece con pepTRAM son propiciadas mayoritariamente por el *loop* AA de la cadena A y la hélice α B de la cadena B.

Tabla 5.5: Interacciones preliminares del complejo pepTRAM-TLR4

Aminoácido Ligando				Aminoácido Homodímero TLR4					Tipo de Contacto				
AA	N°	Cadena	Tipo AA	AA	N°	Cadena	Región	Tipo AA	PH	PS	H	C π	A
PHE	48	T	Hidrofóbico	ASP	213	B	BB	Polar -					
				ILE	215	B	BB	Hidrofóbico			X		
				GLU	227	B	α B	Polar -					
GLU	50	T	Polar -	PRO	53	A	BB	Hidrofóbico					
PRO	52	T	Hidrofóbico	TYR	48	A	BB	Polar			X		
				PRO	216	B	BB	Hidrofóbico			X		
ARG	55	T	Polar +	TYR	19	A	AA	Polar	X				
				TYR	48	A	BB	Polar	X				
				PRO	216	B	BB	Hidrofóbico					
				GLY	217	B	BB	Polar	X				
HIS	57	T	Polar +	SER	21	A	AA	Polar	X				
				GLY	217	B	BB	Polar	X				
				VAL	218	B	BB	Hidrofóbico					
				ALA	222	B	α B	Hidrofóbico					
LEU	58	T	Hidrofóbico	VAL	218	B	BB	Hidrofóbico			X		
				ALA	222	B	α B	Hidrofóbico			X		
				HIS	226	B	α B	Polar +					
GLN	59	T	Polar	ILE	215	B	BB	Hidrofóbico					
				VAL	218	B	BB	Hidrofóbico					
				HIS	226	B	α B	Polar +	X				
				GLU	227	B	α B	Polar -	X				
				LYS	231	B	α B	Polar +	X				

■: aminoácido cuya mutación interrumpe completamente la homodimerización de TLR4 [20, 56]

■: aminoácido que participa en la formación del homodímero y el acoplamiento de las proteínas adaptadoras MAL y TRAM [20, 22]

■: aminoácido cuya mutación genera interferencia en el acoplamiento de proteínas adaptadoras [20]

Cadena: A: cadena A homodímero TLR4; B: cadena B homodímero TLR4; T: péptido de bloqueo

Región: N-t: extremo N-terminal; XX: *loop* XX; α X: hélice α X; β X: lámina β X; C-t: extremo C-terminal

Tipo de contacto: PH: puente de hidrógeno; PS: puente salino; H: hidrofóbico; C π : catión- π ; A: aromático

De esta forma, a través del procedimiento de *docking*, los contactos descritos en las tablas 5.2-5.5 logran asignarle a los *loops* BB un menor o mayor protagonismo según sea el péptido de bloqueo utilizado a través de su participación en la formación de contactos de carácter hidrofóbico.

5.3. Etapa de dinámica molecular

Los resultados de la etapa de *docking* indican preliminarmente que los *loops* BB del homodímero de TLR4 influyen directamente en el acoplamiento de los péptidos de bloqueo estudiados en este trabajo. Sin embargo, los contactos identificados a partir de cada uno de los complejos receptor-ligando provienen de un único estado conformacional que, teóricamente, corresponde a un estado cercano al de mínima energía. Dado que estos complejos pasan a través de varios estados conformacionales durante el transcurso de la dinámica molecular, identificar los contactos producidos en cada uno de ellos permite establecer la importancia relativa de cada uno de ellos en virtud del tipo de interacción y su permanencia en el tiempo.

De esta manera, el cumplimiento del protocolo de dinámica molecular permite, a través de las trayectorias obtenidas, un análisis visual del comportamiento de los péptidos de bloqueo en el tiempo y la identificación de sus contactos a través del programa de visualización VMD.

Las tablas 5.7-5.10 presentan los contactos que genera el acoplamiento de cada uno de los péptidos de bloqueo con el homodímero de TLR4. Además, indica los contactos intramoleculares de estos ligandos con el propósito de identificar eventuales plegamientos sobre sí mismos.

5.3.1. Homodímero TLR4-TLR4

La tabla 5.6 indica los contactos establecidos durante la trayectoria de simulación del homodímero de TLR4. Como descripción general, los contactos establecidos entre ambas cadenas está dado por interacciones hidrofóbicas que involucran a los *loops* BB y las hélices α C de cada una de ellas. Sin embargo, el aspecto más relevante de estos resultados está dado por los aminoácidos involucrados, los cuales a través de estudios de mutación sitio dirigida [20, 56] han demostrado ser claves en la constitución del homodímero y/o en la asociación con otras proteínas adaptadoras.

Tabla 5.6: Interacciones proteína-ligando identificadas en el homodímero de TLR4

PUENTES DE HIDRÓGENO						
Aminoácido			Aminoácido			Estadísticas
N° AA	Nombre AA	Cadena / Región	N° AA	Nombre AA	Cadena / Región	% Aparición
148	ARG	B / α E	163	GLU	B / C-t	63,5 %
90	TYR	A / α C	82	TYR	B / CC	27,6 %
INTERACCIONES CATION-PI						
Oxígeno			Nitrógeno			Estadísticas
N° AA	Nombre AA	Cadena / Región	N° AA	Nombre AA	Cadena / Región	% Aparición
84	GLU	A / α C	90	TYR	B / α C	57,0 %
47	HIS	B / BB	51	PHE	A / BB	43,7 %
INTERACCIONES HIDROFÓBICAS						
Aminoácido			Aminoácido			Estadísticas
N° AA	Nombre AA	Cadena / Región	N° AA	Nombre AA	Cadena / Región	% Aparición
58	ALA	A / α B	87	ILE	B / α C	98,7 %
52	ILE	A / BB	87	ILE	B / α C	94,7 %
90	TYR	A / α C	87	ILE	B / α C	87,7 %
87	ILE	A / α C	87	ILE	B / α C	86,7 %
51	PHE	A / BB	51	PHE	B / BB	77,4 %
53	PRO	A / BB	51	PHE	B / BB	75,4 %
52	ILE	A / BB	88	PHE	B / α C	72,1 %
51	PHE	A / BB	53	PRO	B / BB	70,8 %
52	ILE	A / BB	57	ILE	B / BB	64,1 %
51	PHE	A / BB	53	PRO	B / BB	47,2 %
51	PHE	A / BB	57	ILE	B / BB	34,9 %
53	PRO	A / BB	53	PRO	B / BB	27,6 %

 : aminoácido cuya mutación interrumpe completamente la homodimerización de TLR4 [20,56]

 : aminoácido que participa en la formación del homodímero y el acoplamiento de las proteínas adaptadoras MAL y TRAM [20,22]

 : aminoácido cuya mutación genera interferencia en el acoplamiento de proteínas adaptadoras [20]

Cadena: A: cadena A homodímero TLR4; B: cadena B homodímero TLR4; T: péptido de bloqueo

Región: N-t: extremo N-terminal; XX: *loop* XX; α X: hélice α X; β X: lámina β X; C-t: extremo C-terminal

5.3.2. pepMAL-TLR4

La tabla 5.7 indica los contactos establecidos durante la trayectoria de simulación del complejo pepMAL-TLR4. Como descripción general, a excepción de las interacciones aromáticas, el péptido de bloqueo exhibe todas las interacciones estudiadas en este trabajo acompañadas de un alto nivel de permanencia en el tiempo.

La región L47-T51, ubicada hacia el extremo N-terminal del péptido de bloqueo, resulta ser gravitante en la estabilidad del complejo. En efecto, los aminoácidos L47, R48 y T51 experimentan puentes de hidrógeno con los *loops* BB del homodímero (Y48, R49 y G217) cuya permanencia va desde 24,5% hasta 76,5% según sea el caso. En lo que respecta a los puentes salinos, los aminoácidos R48 y D49 de pepMAL interactúan prácticamente en la totalidad de la simulación con la hélice α A de la cadena A del homodímero (E24 y R28). Los contactos hidrofóbicos generados a través de L47 y A50 con los *loops* BB del homodímero (Y48, I215 y V218) presentan tiempos diferentes de permanencia, los cuales van desde 20,9% hasta 89,4%. Finalmente, el aminoácido R48 del péptido de bloqueo establece interacciones catión- π de elevada permanencia con los *loops* AA (Y19) y BB (Y48) de la cadena A.

Por su parte, los aminoácidos ubicados hacia el extremo C-terminal del péptido de bloqueo están implicados en la generación de puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas con el *loop* AB de la cadena A del homodímero. La región G54-I56 de pepMAL establece puentes de hidrógeno con esta zona del homodímero (P40 y Q43) cuya permanencia va desde 22,8 % a 76,5 %. En lo que se refiere al péptido de bloqueo, el aminoácido A55 genera contactos hidrofóbicos de alto tiempo de permanencia con dicho *loop* (P40-P41).

Estos resultados respaldan el análisis visual realizado sobre la trayectoria que indica una tendencia baja del péptido al plegamiento sobre sí mismo, el cual no supera el 29,1 % en su extremo N-terminal y el 22,8 % en el extremo C-terminal.

A partir de la trayectoria de simulación obtenida, se extrajo una conformación representativa del complejo pepMAL-TLR4 correspondiente a la figura 5.7.

Tabla 5.7: Interacciones proteína-ligando identificadas en complejo pepMAL-TLR4

PUENTES DE HIDRÓGENO							
Aminoácido			Aminoácido			Estadísticas	
Nº AA	Nombre AA	Cadena / Región	Nº AA	Nombre AA	Cadena / Región	Apariciones	% Aparición
56	ILE	T	43	GLN	A / AA	231	76,5 %
48	ARG	T	48	TYR	A / BB	230	76,2 %
51	THR	T	49	ARG	A / BB	163	54,0 %
48	ARG	T	217	GLY	B / BB	84	27,8 %
47	LEU	T	48	TYR	A / BB	74	24,5 %
54	GLY	T	43	GLN	A / AA	69	22,8 %
54	GLY	T	56	ILE	T	69	22,8 %
55	ALA	T	40	PRO	A / AA	69	22,8 %
49	ASP	T	48	TYR	A / AA	42	13,9 %
PUENTES SALINOS							
Oxígeno			Nitrógeno			Estadísticas	
Nº AA	Nombre AA	Cadena / Región	Nº AA	Nombre AA	Cadena / Región	Apariciones	% Aparición
24	GLU	A / α A	48	ARG	T	302	100,0 %
49	ASP	T	28	ARG	A / α A	234	77,5 %
INTERACCIONES HIDROFÓBICAS							
Aminoácido			Aminoácido			Estadísticas	
Nº AA	Nombre AA	Cadena / Región	Nº AA	Nombre AA	Cadena / Región	Apariciones	% Aparición
47	LEU	T	48	TYR	A / BB	270	89,4 %
47	LEU	T	218	VAL	B / BB	201	66,6 %
55	ALA	T	40	PRO	A / AA	198	65,6 %
55	ALA	T	41	PRO	A / AA	191	63,2 %
56	ILE	T	13	TYR	A / β A	179	59,3 %
55	ALA	T	56	ILE	T	176	58,3 %
47	LEU	T	215	ILE	B / BB	170	56,3 %
50	ALA	T	48	TYR	A / BB	129	42,7 %
45	LEU	T	50	ALA	T	88	29,1 %
52	PRO	T	57	VAL	T	69	22,8 %
45	LEU	T	48	TYR	A / BB	63	20,9 %
56	ILE	T	12	ILE	A / N-t	39	12,9 %
INTERACCIONES CATION-PI							
Nitrógeno			Centroide			Estadísticas	
Nº AA	Nombre AA	Cadena / Región	Nº AA	Nombre AA	Cadena / Región	Apariciones	% Aparición
48	ARG	T	48	TYR	A / BB	302	100,0 %
48	ARG	T	19	TYR	A / AA	236	78,1 %

 : aminoácido cuya mutación interrumpe completamente la homodimerización de TLR4 [20,56]

 : aminoácido que participa en la formación del homodímero y el acoplamiento de las proteínas adaptadoras MAL y TRAM [20,22]

 : aminoácido cuya mutación genera interferencia en el acoplamiento de proteínas adaptadoras [20]

Cadena: A: cadena A homodímero TLR4; B: cadena B homodímero TLR4; T: péptido de bloqueo

Región: N-t: extremo N-terminal; XX: *loop* XX; α X: hélice α X; β X: lámina β X; C-t: extremo C-terminal

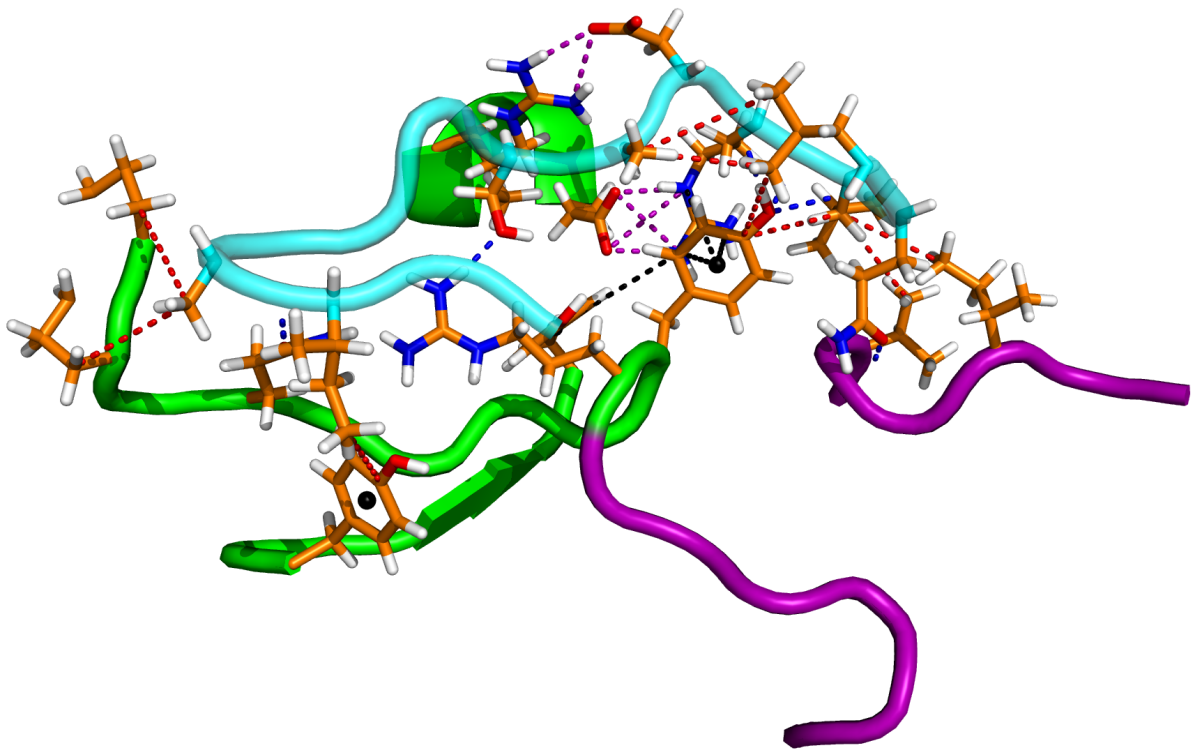


Figura 5.7: Conformación representativa del complejo pepMAL-TLR4 extraída de la dinámica molecular (Líneas punteadas indican interacciones definidas por colores: —: puente salino; —: interacción hidrofóbica; —: puente de hidrógeno; —: interacción catión- π)

5.3.3. pepMyD88-TLR4

La tabla 5.8 indica los contactos establecidos durante la trayectoria de simulación del complejo pepMyD88-TLR4. Como descripción general, el péptido de bloqueo utilizado experimentó el plegamiento sobre sí mismo en su extremo C-terminal durante prácticamente la totalidad de la simulación y evidenció un comportamiento inestable en su extremo N-terminal que repercutió en una baja tendencia al acoplamiento con el homodímero.

El comportamiento del extremo C-terminal se explica fundamentalmente por la presencia del aminoácido W58. Si bien establece interacciones hidrofóbicas de diverso nivel de permanencia con los *loops* BB del homodímero (I215 y V218) y posiciones cercanas a estos (A222), también se observan en forma importante este tipo de contactos con la región central del mismo péptido de bloqueo (L52-P53). Estos dos últimos aminoácidos contribuyen en forma sustancial, a través de contactos hidrofóbicos, a la asociación de pepMyD88 con los *loops* BB (Y48, I215 y V218).

La influencia de los puentes de hidrógeno en la estabilidad del complejo es menor en comparación a su componente hidrofóbica. Aunque se pudo constatar interacciones con los *loops* BB (R49, F51 y A219) y ubicaciones cercanas a estos (E227), estas presentaron un rango de permanencia entre 10,6% y 28,5%. Dentro de dicho rango, también se pudo identificar contactos de este tipo con la hélice α A de la cadena A (R49) y una contribución al plegamiento del péptido sobre sí mismo en su extremo C-terminal (Y55 y V57).

La baja tendencia del extremo N-terminal de pepMyD88 por asociarse al homodímero quedó en evidencia por dos factores principales. Uno de ellos corresponde a la repulsión que experimentó la región

V46-D48 del péptido de bloqueo, zona de características polares, con la región I52-V55 de la cadena A, zona predominantemente apolar perteneciente al *loop* BB. Junto con esto, el aminoácido R49 de pepMyD88 experimentó un comportamiento inestable con otra región del *loop* BB de la cadena A de elevada polarización (R49-F51).

Tabla 5.8: Interacciones proteína-ligando identificadas en complejo pepMyD88-TLR4

PUENTES DE HIDRÓGENO							
Aminoácido			Aminoácido			Estadísticas	
N° AA	Nombre AA	Cadena / Región	N° AA	Nombre AA	Cadena / Región	Apariciones	% Aparición
58	TRP	T	227	GLU	B / α B	86	28,5 %
49	ARG	T	51	PHE	A / BB	81	26,8 %
56	CYS	T	21	SER	A / AA	55	18,2 %
55	THR	T	57	VAL	T	49	16,2 %
58	TRP	T	219	ALA	B / BB	48	15,9 %
49	ARG	T	49	ARG	A / BB	32	10,6 %
INTERACCIONES HIDROFÓBICAS							
Aminoácido			Aminoácido			Estadísticas	
N° AA	Nombre AA	Cadena / Región	N° AA	Nombre AA	Cadena / Región	Apariciones	% Aparición
58	TRP	T	218	VAL	B / BB	301	99,7 %
52	LEU	T	218	VAL	B / BB	293	97,0 %
53	PRO	T	58	TRP	T	290	96,0 %
52	LEU	T	58	TRP	T	271	89,7 %
52	LEU	T	48	TYR	A / BB	210	69,5 %
52	LEU	T	215	ILE	B / BB	189	62,6 %
53	PRO	T	215	ILE	B / BB	153	50,7 %
53	PRO	T	218	VAL	B / BB	108	35,8 %
58	TRP	T	222	ALA	B / α B	58	19,2 %
58	TRP	T	215	ILE	B / BB	54	17,9 %
46	VAL	T	53	PRO	A / BB	49	16,2 %

 : aminoácido cuya mutación interrumpe completamente la homodimerización de TLR4 [20,56]

 : aminoácido que participa en la formación del homodímero y el acoplamiento de las proteínas adaptadoras MAL y TRAM [20, 22]

 : aminoácido cuya mutación genera interferencia en el acoplamiento de proteínas adaptadoras [20]

Cadena: A: cadena A homodímero TLR4; B: cadena B homodímero TLR4; T: péptido de bloqueo

Región: N-t: extremo N-terminal; XX: *loop* XX; α X: hélice α X; β X: lámina β X; C-t: extremo C-terminal

La figura 5.8 corresponde a una de las conformaciones representativas de los contactos detallados previamente.

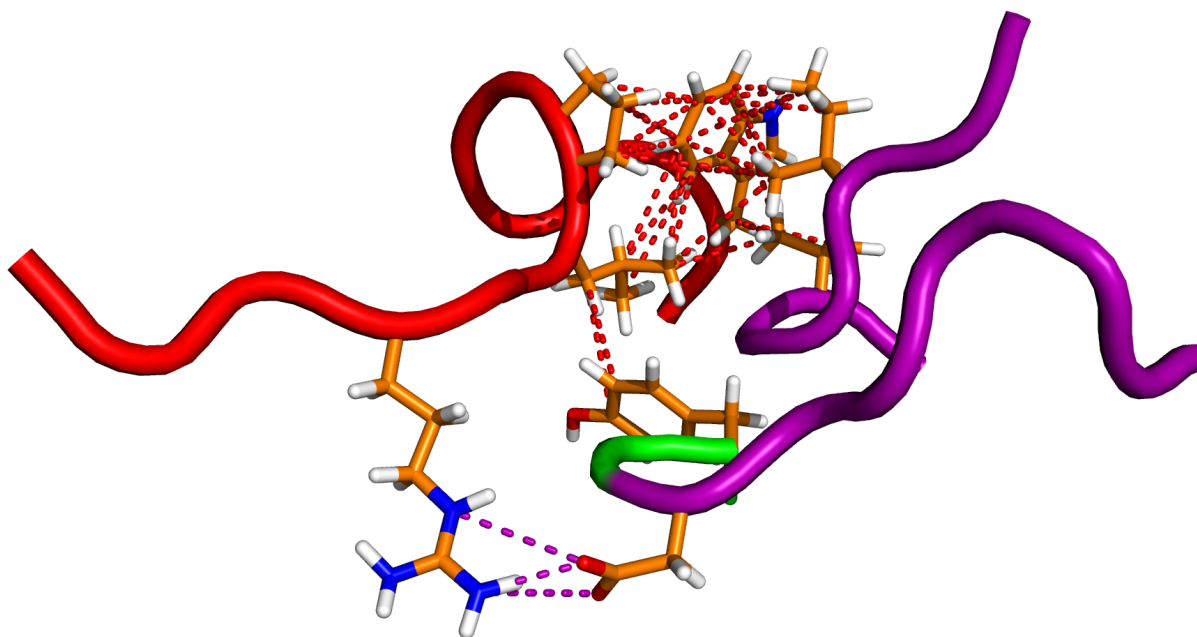


Figura 5.8: Conformación representativa del complejo pepMyD88-TLR4 extraída de la dinámica molecular (Líneas punteadas indican interacciones definidas por colores: —: puente salino; —: interacción hidrofóbica; —: puente de hidrógeno; —: interacción catión- π)

5.3.4. pepTLR4-TLR4

La tabla 5.9 indica los contactos establecidos durante la trayectoria de simulación del complejo pepTLR4-TLR4. Como descripción general, el péptido de bloqueo utilizado mostró una baja cantidad de contactos con los *loops* BB del homodímero, los cuales son predominantemente hidrofóbicos. Sin embargo, uno de los aspectos más relevantes está dado por la tendencia que experimentó pepTLR4 al colapso sobre sí mismo constatado por los plegamientos en su región central y en la interacción entre sus extremos N-terminal y C-terminal.

En lo que respecta a las interacciones intermoleculares, la región V55-A56 de pepTLR4 presentó una tendencia a asociarse con los *loops* BB del homodímero (Y48 y A219) a través de interacciones hidrofóbicas cuyo rango de permanencia fue desde 11,3% hasta 71,9%. De forma similar, la región I52-P53 de pepTLR4 también contribuyó en dicha asociación (V218-A219) en un rango más pequeño de la simulación. Otro aspecto importante corresponde a las interacciones catión- π que se dieron con el *loop* CC de la cadena A (H79) y la hélice α B de la cadena B (H226 y H230), las cuales estuvieron presentes entre el 42,4% y el 50,3% de toda la simulación.

A pesar de lo mencionado anteriormente, el plegamiento sobre sí mismo que experimentó pepTLR4 está influido por diversos tipos de interacciones. En primer lugar, las interacciones hidrofóbicas (L46, Y48, I52-P53 e I57-A58) mostraron un rango de permanencia entre 13,9% y 74,2% cuyo valor máximo corresponde a la asociación entre Y48 y P53. Destacan además las interacciones catión- π entre H47-R49 y R49-F51 presentes en un 69,2% y 26,2% de la simulación respectivamente. Los puentes de hidrógeno

también ejercieron una influencia sobre el plegamiento superior al 25% de la simulación (Y48-R49, D50 y I52). Finalmente, el aminoácido C-terminal A59 experimenta puentes salinos con R49 durante un 74,5% de la simulación.

Tabla 5.9: Interacciones proteína-ligando identificadas en complejo pepTLR4-TLR4

PUENTES DE HIDRÓGENO							
Aminoácido			Aminoácido			Estadísticas	
N° AA	Nombre AA	Cadena / Región	N° AA	Nombre AA	Cadena / Región	Apariciones	% Aparición
48	TYR	T	50	ASP	T	82	27,2%
49	ARG	T	52	ILE	T	78	25,8%
46	LEU	T	55	VAL	T	42	13,9%
48	TYR	T	49	ARG	T	41	13,6%
46	LEU	T	24	GLU	A / α A	37	12,3%
55	VAL	T	217	GLY	B / BB	30	9,9%
PUENTES SALINOS							
Oxígeno			Nitrógeno			Estadísticas	
N° AA	Nombre AA	Cadena / Región	N° AA	Nombre AA	Cadena / Región	Apariciones	% Aparición
59	ALA	T	49	ARG	T	219	72,5%
INTERACCIONES HIDROFÓBICAS							
Aminoácido			Aminoácido			Estadísticas	
N° AA	Nombre AA	Cadena / Región	N° AA	Nombre AA	Cadena / Región	Apariciones	% Aparición
48	TYR	T	53	PRO	T	224	74,2%
55	VAL	T	48	TYR	A / BB	217	71,9%
56	ALA	T	48	TYR	A / BB	189	62,6%
55	VAL	T	219	ALA	B / BB	182	60,3%
52	ILE	T	218	VAL	B / BB	107	35,4%
52	ILE	T	57	ILE	T	105	34,8%
52	ILE	T	222	ALA	B / α B	52	17,2%
46	LEU	T	58	ALA	T	42	13,9%
53	PRO	T	219	ALA	B / BB	38	12,6%
56	ALA	T	219	ALA	B / BB	34	11,3%
INTERACCIONES CATION-PI							
Nitrógeno			Centroide			Estadísticas	
N° AA	Nombre AA	Cadena / Región	N° AA	Nombre AA	Cadena / Región	Apariciones	% Aparición
49	ARG	T	47	HIS	T	209	69,2%
230	HIS	B / α B	51	PHE	T	152	50,3%
226	HIS	B / α B	51	PHE	T	148	49,0%
79	HIS	A / CC	48	TYR	T	128	42,4%
49	ARG	T	51	PHE	T	79	26,2%

■: aminoácido cuya mutación interrumpe completamente la homodimerización de TLR4 [20, 56]

■: aminoácido que participa en la formación del homodímero y el acoplamiento de las proteínas adaptadoras MAL y TRAM [20, 22]

■: aminoácido cuya mutación genera interferencia en el acoplamiento de proteínas adaptadoras [20]

Cadena: A: cadena A homodímero TLR4; B: cadena B homodímero TLR4; T: péptido de bloqueo

Región: N-t: extremo N-terminal; XX: *loop* XX; α X: hélice α X; β X: lámina β X; C-t: extremo C-terminal

La figura 5.9 corresponde a una de las conformaciones representativas de los contactos detallados previamente.

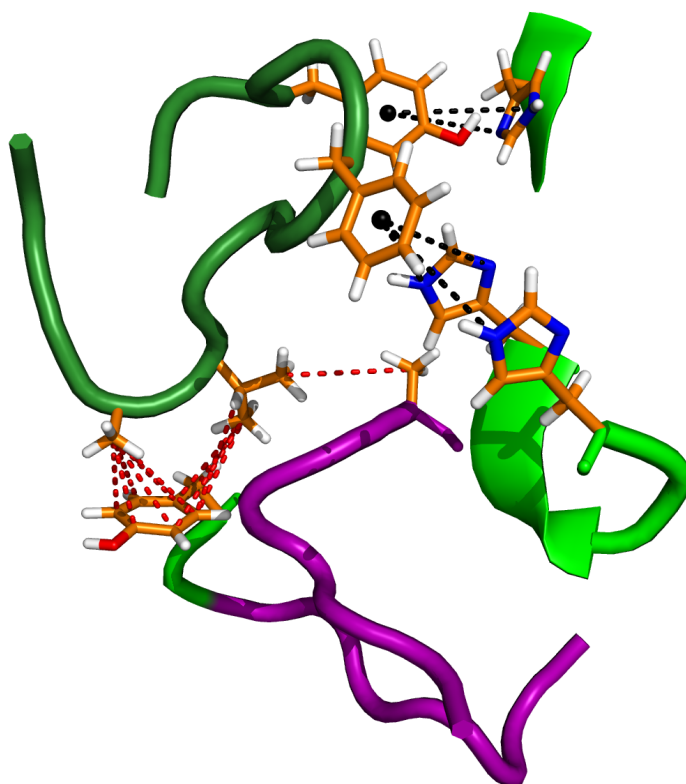


Figura 5.9: Conformación representativa del complejo pepTRAM-TLR4 extraída de la dinámica molecular (Líneas punteadas indican interacciones definidas por colores: —: puente salino; —: interacción hidrofóbica; —: puente de hidrógeno; —: interacción catión- π)

5.3.5. pepTRAM-TLR4

La tabla 5.10 indica los contactos establecidos durante la trayectoria de simulación del complejo pepTRAM-TLR4. Como descripción general, el péptido de bloqueo utilizado mostró una baja tendencia al plegamiento sobre sí mismo, experimentando un acoplamiento estable a los *loops* BB del homodímero donde primaron los contactos hidrofóbicos.

En lo que respecta a las interacciones intermoleculares, el residuo R55 de pepTRAM establece puentes salinos con la hélice αA de la cadena A del homodímero (E24) durante toda la simulación. Por su parte, los aminoácidos I47, F48 y P52 del péptido de bloqueo establecen contactos hidrofóbicos con los *loops* BB (Y48, I215-P216) y regiones cercanas en la cadena B del homodímero (A222) cuya permanencia va desde el 11,9% hasta el 70,9%. Finalmente, pepTRAM constituyó interacciones de carácter moderado tipo catión- π con la hélice αB de la cadena B (K231), además de puentes de hidrógeno e interacciones catión- π a través de su región G54-R55 con el *loop* BB de la cadena A (Y48).

No obstante, este ligando presenta plegamientos sobre sí mismo en su extremo C-terminal a través de puentes de hidrógeno entre I46 y C53, así como interacciones hidrofóbicas entre A49 y M51. Por su parte, el extremo N-terminal muestra plegamientos asociados a interacciones catión- π mediadas por los aminoácidos R55 y H57.

Tabla 5.10: Interacciones proteína-ligando identificadas en complejo pepTRAM-TLR4

PUENTES DE HIDRÓGENO							
Aminoácido			Aminoácido			Estadísticas	
Nº AA	Nombre AA	Cadena / Región	Nº AA	Nombre AA	Cadena / Región	Apariciones	% Aparición
54	GLY	T	48	TYR	A / BB	98	32,5 %
47	ILE	T	53	CYS	T	88	29,1 %
47	ILE	T	49	ALA	T	64	21,2 %
PUENTES SALINOS							
Oxígeno			Nitrógeno			Estadísticas	
Nº AA	Nombre AA	Cadena / Región	Nº AA	Nombre AA	Cadena / Región	Apariciones	% Aparición
24	GLU	A / α A	55	ARG	T	302	100,0 %
INTERACCIONES HIDROFÓBICAS							
Carbono			Carbono			Estadísticas	
Nº AA	Nombre AA	Cadena / Región	Nº AA	Nombre AA	Cadena / Región	Apariciones	% Aparición
49	ALA	T	51	MET	T	246	81,5 %
47	ILE	T	215	ILE	B / BB	214	70,9 %
48	PHE	T	215	ILE	B / BB	213	70,5 %
52	PRO	T	48	TYR	A / BB	178	58,9 %
47	ILE	T	218	VAL	B / BB	170	56,3 %
52	PRO	T	216	PRO	B / BB	66	21,9 %
47	ILE	T	48	TYR	A / BB	44	14,6 %
48	PHE	T	216	PRO	B / BB	36	11,9 %
58	LEU	T	222	ALA	B / α B	36	11,9 %
INTERACCIONES CATION-PI							
Nitrógeno			Centroide			Estadísticas	
Nº AA	Nombre AA	Cadena / Región	Nº AA	Nombre AA	Cadena / Región	Apariciones	% Aparición
55	ARG	T	57	HIS	T	125	41,4 %
231	LYS	B / α B	48	PHE	T	85	28,1 %
55	ARG	T	48	TYR	A / BB	49	16,2 %

 : aminoácido cuya mutación interrumpe completamente la homodimerización de TLR4 [20,56]

 : aminoácido que participa en la formación del homodímero y el acoplamiento de las proteínas adaptadoras MAL y TRAM [20,22]

 : aminoácido cuya mutación genera interferencia en el acoplamiento de proteínas adaptadoras [20]

Cadena: A: cadena A homodímero TLR4; B: cadena B homodímero TLR4; T: péptido de bloqueo

Región: N-t: extremo N-terminal; XX: *loop* XX; α X: hélice α X; β X: lámina β X; C-t: extremo C-terminal

La figura 5.10 corresponde a una de las conformaciones representativas de los contactos detallados previamente.

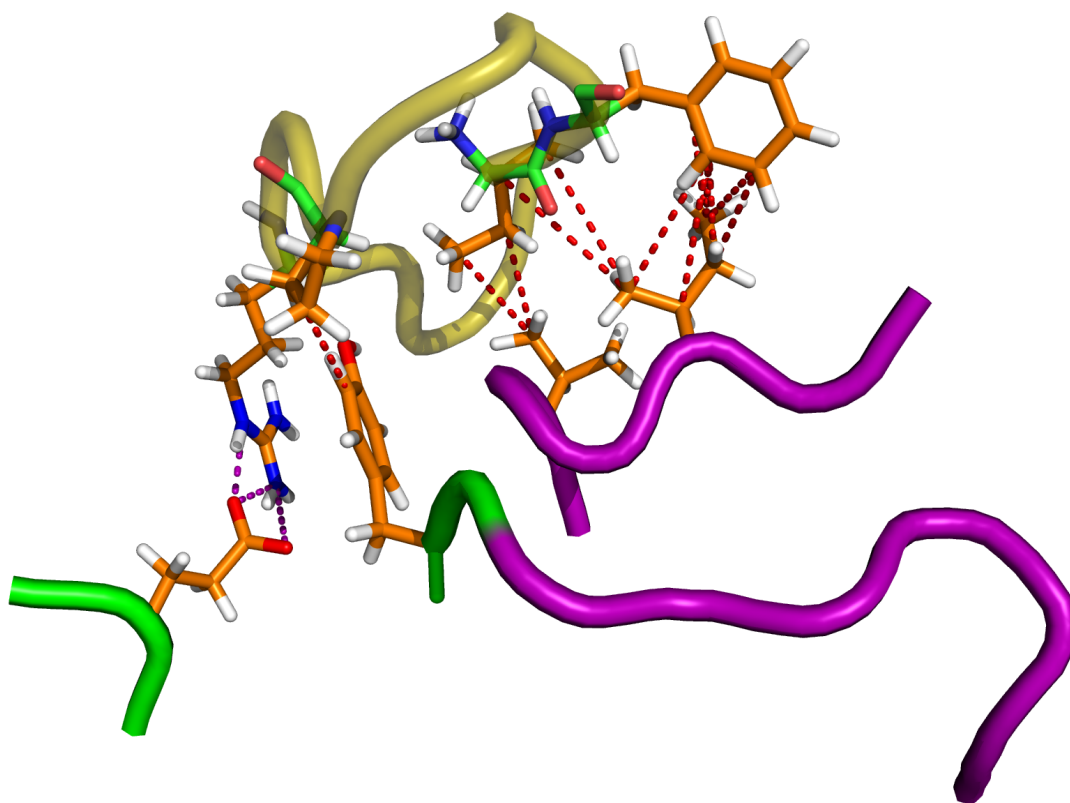


Figura 5.10: Conformación representativa del complejo pepTRAM-TLR4 extraída de la dinámica molecular (Líneas punteadas indican interacciones definidas por colores: —: puente salino; —: interacción hidrofóbica; —: puente de hidrógeno; —: interacción catión- π)

5.4. Estimación de la energía libre de unión mediante metodología MM-PBSA

Habiendo descrito el comportamiento de cada uno de los péptidos de bloqueo al acoplarse el homodímero de TLR4 a través de la identificación de sus contactos (Tablas 5.7-5.10), el paso siguiente corresponde al análisis de factibilidad termodinámica de los eventos observados. En este sentido, la estimación de la energía libre de formación de cada uno de los complejos tiene por objetivo discriminar si su formación es posible de presenciar realmente.

Teniendo en consideración que el cálculo de energía libre mediante la metodología MM-PBSA se efectuó a través de dos estrategias paralelas, la tabla 5.11 muestra el resumen de los valores calculados tanto por la estrategia de múltiples trayectorias con estimación de la variación de entropía por modos normales (MT+NM) como por la estrategia de trayectoria única con estimación de la variación de entropía según la aproximación quasi-armónica (UT+QH).

A modo general, los resultados alcanzados por ambas estrategias difieren significativamente entre sí en la magnitud de los valores de $\Delta G_{\text{Unión,Solv}}$. El acoplamiento de pepMAL al homodímero presentó una diferencia de 100 [kJ/mol] entre ambas estrategias de cálculo cuya explicación está asociada principalmente al cálculo de la energía electrostática (E_{Coul}) y a la variación de energía libre de solvatación polar ($G_{\text{Solv,P}}$). En el caso de pepMyD88, la diferencia corresponde a 195 [kJ/mol] aproximadamente cuyas diferencias estuvieron concentradas en las energías de no enlace (E_{vdw} y E_{Coul}). Por su parte, el complejo pepTLR4-

TLR4 presentó una diferencia cercana a los 200 [kJ/mol] atribuible principalmente a la estimación de la energía electrostática (E_{Coul}). Finalmente, el acoplamiento de pepTRAM presentó una diferencia cercana a los 20 [kJ/mol] que, al igual que en el caso de pepMAL, se debe principalmente al cálculo de la energía electrostática (E_{Coul}) y a la variación de energía libre de solvatación polar ($G_{\text{Solv,P}}$).

A pesar de sus diferencias, un elemento común en todos los complejos simulados corresponde a la influencia de la variación de entropía del sistema en la diferencia entre ambas estrategias de cálculo. En efecto, los valores alcanzados mediante la aproximación quasi-armónica fueron mayores a los logrados por modos normales en todos los complejos simulados cuyas diferencias van desde 64 [kJ/mol] en el caso de pepMyD88-TLR4 hasta 140 [kJ/mol] para pepTLR4-TLR4.

Una descripción más detallada acerca de cada uno de los complejos se encuentra descrita en las secciones 5.4.2.1-5.4.2.4.

Tabla 5.11: Comparación de estrategias en el cálculo de energía libre de unión establecidas por la metodología MM-PBSA para cada complejo proteína-ligando

	pepMAL-TLR4 [kJ/mol]		pepMyD88-TLR4 [kJ/mol]		pepTLR4-TLR4 [kJ/mol]		pepTRAM-TLR4 [kJ/mol]	
	MT + NM	UT + QH	MT + NM	UT + QH	MT + NM	UT + QH	MT + NM	UT + QH
$\langle E_{\text{Int}} \rangle$	179,82	85,30	153,73	79,73	148,81	80,54	64,11	78,94
$\langle E_{\text{vdW}} \rangle$	-131,46	-163,07	-47,49	-148,02	-152,25	-134,67	-41,75	-101,97
$\langle E_{\text{Coul}} \rangle$	-392,16	-540,26	-514,90	-202,12	-386,95	-162,04	-11,50	-304,76
$\langle E_{\text{MM}} \rangle$	-343,81	-618,04	-408,66	-270,41	-390,40	-216,16	10,86	-327,79
$\langle G_{\text{Solv,NP}} \rangle$	-14,67	-25,05	-4,41	-21,22	-11,50	-18,92	-2,77	-17,25
$\langle G_{\text{Solv,P}} \rangle$	305,57	411,17	252,75	281,37	206,71	172,02	-9,15	240,37
$\langle G_{\text{Solv}} \rangle$	290,89	386,13	248,33	260,15	195,21	153,10	-11,93	223,12
$\langle -T\Delta S \rangle$	27,21	95,69	68,03	112,76	-41,86	98,09	11,27	97,53
$\langle \Delta G_{\text{Unión,Solv}} \rangle$	-25,71	-136,23	-92,30	102,51	-237,06	35,04	10,20	-7,15

5.4.1. Elección de los *frames* para el cálculo de $\Delta G_{\text{Unión,Solv}}$

La determinación de los *frames* adecuados para el cálculo de variación de energía libre a través de la metodología MM-PBSA está relacionado con la estabilidad que evidencian las estructuras proteicas participantes a lo largo de sus trayectorias de simulación, lo cual puede ser corroborado a través de los valores de RMSD estimados a partir de todos los átomos que definen su estructura.

La figura 5.11 muestra la variación que experimentan los valores de RMSD a lo largo de la trayectoria de simulación de cada uno de los complejos proteína-ligando considerados en este trabajo. A pesar de la tendencia decreciente que experimentan todos los complejos, no se alcanza un valor de RMSD estable, sugiriendo que el tiempo de simulación establecido en el protocolo de dinámica molecular no fue suficiente para la estabilización de los complejos. En forma complementaria, la figura 5.12 deja en evidencia que lo observado en los complejos simulados se explica fundamentalmente por el comportamiento del homodímero ya que, tanto las trayectorias extraídas desde los complejos como la obtenida de su simulación en solitario, muestran tendencias prácticamente idénticas a las indicadas en la figura 5.11.

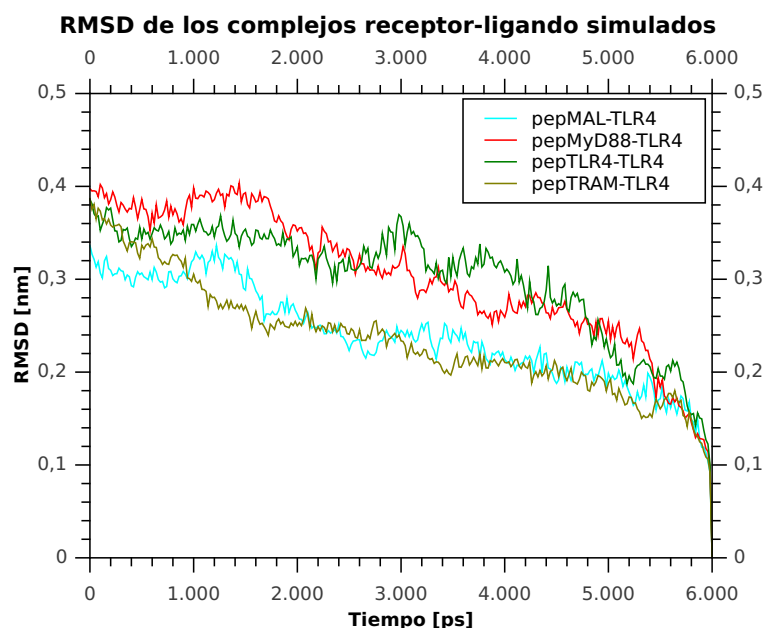


Figura 5.11: Comparación de los valores de RMSD obtenidos de las trayectorias de los complejos estudiados

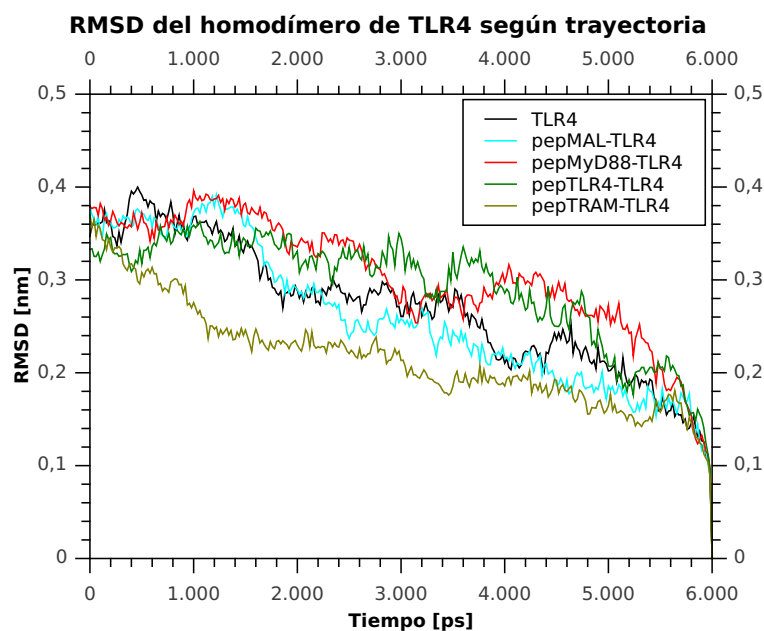


Figura 5.12: Comparación de los valores de RMSD obtenidos de las trayectorias de los complejos estudiados

Por su parte, las figuras 5.13a-5.13d muestran las diferencias en el comportamiento de los péptidos de bloqueo. Como es posible notar, la presencia del homodímero ejerce un efecto estabilizador sobre el péptidos de bloqueo evidenciado por la baja variabilidad de su RMSD en el tiempo. Sin embargo, las trayectorias obtenidas a partir de su simulación en solitario muestran en todos los casos una inestabilidad notoria marcada por grandes oscilaciones en sus valores de RMSD. Esta información, vinculada con un análisis cualitativo de sus trayectorias, permite identificar dos estados conformacionales predominantes por cada ligando. Todas las trayectorias muestran en su etapa inicial una conformación extendida que, a medida que transcurre la simulación de dinámica molecular, tiende a colapsar sobre sí misma. Este proceso

respalda las grandes oscilaciones de los valores de RMSD observadas al comienzo de sus trayectorias que van atenuándose con el transcurso del tiempo.

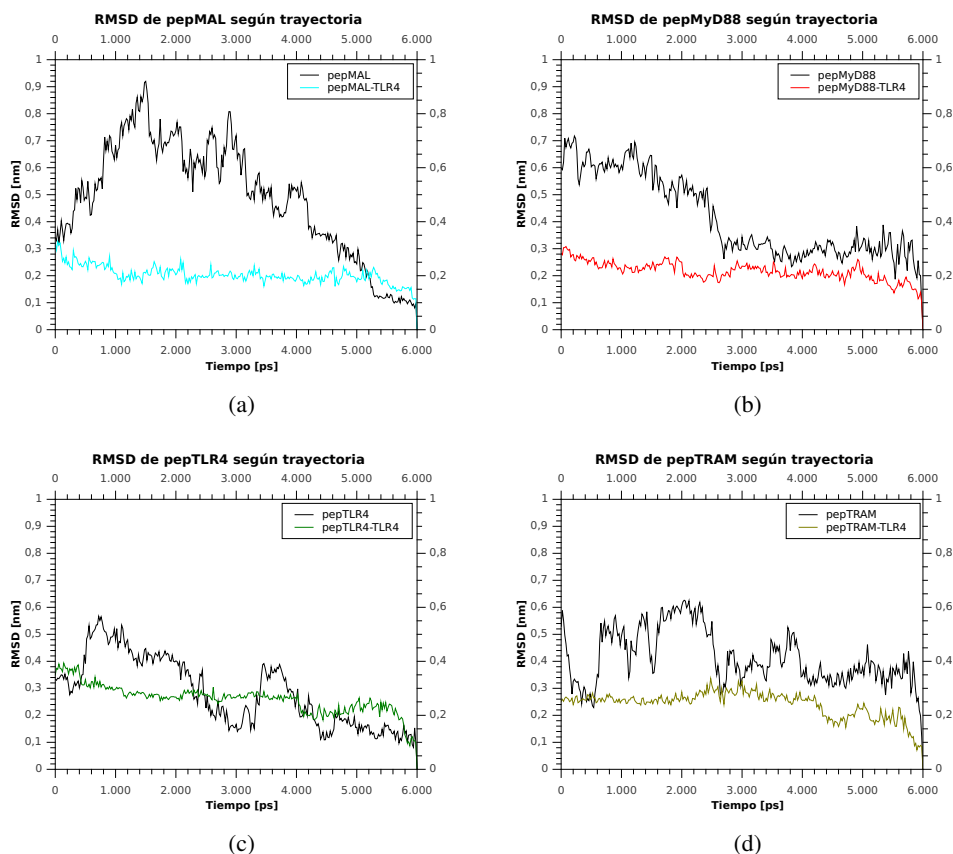


Figura 5.13: Alineamiento de secuencias entre los péptidos de bloqueo diseñados por Salgado y por Toshchakov llevado a cabo a través del programa Clustal X

Color definidos según programa

Símbolos adicionales indican grados de conservación: * : idénticos; : : sustitución conservada; . : sustitución semi-conservada

Barras señalan conservación del aminoácido en la ubicación correspondiente

De acuerdo a lo expuesto anteriormente, si bien ninguno de los complejos logró evidenciar una estabilidad notoria, la baja variabilidad del RMSD de los péptidos de bloqueo acoplados al homodímero durante todas sus trayectorias permite validar parcialmente la consideración de todos sus *frames* en el cálculo de la variación de energía libre utilizando la información contenida sólo en la trayectoria de los complejos. En el caso de la estrategia de múltiples trayectorias, no se observan valores estables de RMSD en las trayectorias del homodímero y de los péptidos de bloqueo obtenidas a partir de simulaciones independientes. Teniendo en consideración la dualidad conformacional experimentada por los ligandos en solitario y los tiempos de simulación insuficientes, no es posible determinar con la información disponible cuál de ellos es el más representativo. En consecuencia, el cálculo de energía libre a través de esta estrategia debe considerar todos los *frames* de las trayectorias involucradas para evitar la eventual pérdida de información relevante.

5.4.2. Cálculo de la energía libre de unión según complejo

5.4.2.1. pepMAL-TLR4

Las tablas 5.12 y 5.13 muestran las diferencias entre ambas estrategias de cálculo para el complejo pepMAL-TLR4. Su comparación permite establecer tres elementos principales que explican la obtención de valores distintos. Los valores de ΔG finales tienen una diferencia de 110 [kJ/mol] aproximadamente cuya explicación radica fundamentalmente en la estimación de ΔE_{Coul} , $\Delta G_{\text{Solv,P}}$ y $T\Delta S$.

Si bien la magnitud de la entropía del ligando es similar para ambos métodos de estimación, la utilización de la técnica de modos normales trae consigo valores un orden de magnitud superior en comparación a los alcanzados mediante el enfoque quasi-armónico para el complejo y el homodímero. Sin embargo, las diferencias no son equivalentes entre sí, resultando en una diferencia cercana a los 70 [kJ/mol].

En relación a los valores de $\Delta G_{\text{Solv,P}}$, es posible establecer que las diferencias entre ambas estrategias está influenciada por las trayectorias del ligando. Tal cual se señaló a partir del análisis de RMSD, la conformación que adopta el ligando en presencia del homodímero se mantiene estable durante la simulación, mientras que en solitario presenta dos estados conformacionales principales. En las figuras 5.14a-5.14c se muestran las superficies de potencial electrostático obtenidas a través del *software* APBS. La exposición de las cadenas laterales hidrofílicas hacia el exterior favorece el proceso de solvatación ($G_{\text{Solv,P}}$) y repercute en la obtención de valores más negativos para dicha variable. En este sentido, dado que no presenta plegamientos sobre sí mismo, la conformación estirada (figura 5.14a) está asociada a valores más negativos en comparación al resto. De igual forma, la conformación colapsada (figura 5.14b) presenta valores más positivos que la observada acoplada al homodímero (figura 5.14c).

El argumento expuesto anteriormente también permite validar las diferencias que existen en los valores de E_{Coul} del ligando. La formación de puentes de hidrógeno entre los átomos de oxígeno y nitrógeno que definen la cadena central promueven el plegamiento sobre sí mismo, lo cual trae consigo valores más negativos. Del mismo modo, la conformación estirada tiene valores más positivos similares a los alcanzados asociado al homodímero producto de la baja presencia de dichas interacciones. De esta forma, considerando que tanto la conformación estirada como colapsada de pepMAL se presentan durante intervalos de tiempo similares (figura 5.13a), los valores promedio de E_{Coul} y $G_{\text{Solv,P}}$ son más positivos en el caso de su trayectoria en solitario y sus desviaciones estándar son de mayor magnitud. De esta forma, se explican en gran medida las diferencias aproximadas de 220 [kJ/mol] y 90 [kJ/mol] entre ambas estrategias para los valores de ΔE_{Coul} y $\Delta G_{\text{Solv,P}}$ respectivamente.

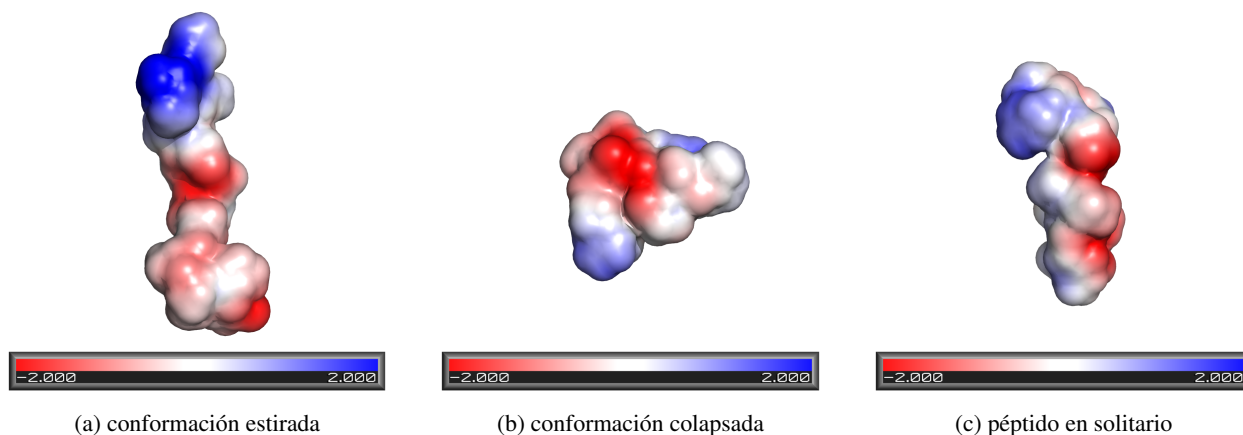
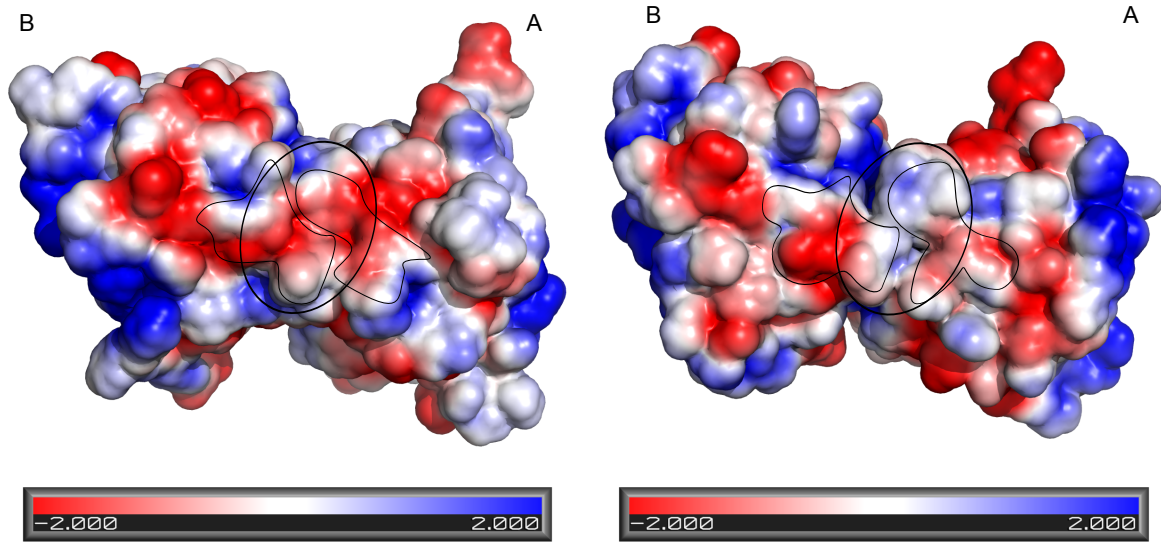


Figura 5.14: Superficie electrostática de pepMAL obtenido desde su trayectoria en solitario y la trayectoria del complejo pepMAL-TLR4

Loops BB rodeados por líneas negras tenues

Cambios importantes en la superficie electrostática señalados con regiones delimitadas por líneas gruesas de color negro

A pesar de que las diferencias entre ambas estrategias sean más atenuadas en el caso del homodímero, también presentan variaciones en sus valores de E_{Coul} y $G_{Solv,P}$, las cuales están ligadas principalmente a la movilidad de los extremos N-terminal y C-terminal. En efecto, las figuras 5.15a y 5.15b muestran que las superficies de potencial electrostático en dichas regiones presentan distintas características. No obstante, se presenta una variación similar en los valores de E_{vdw} causado por motivos diferentes. De acuerdo a la relación lineal entre el valor del SASA y $G_{Solv,NP}$, es posible inferir que los cambios en la superficie del homodímero inducidos por el ligando son pequeños. Sin embargo, las figuras 5.15a y 5.15b muestran que pepMAL induce cambios locales, específicamente en los *loops* BB del homodímero. Teniendo en consideración que la interacción entre los *loops* BB es predominantemente hidrofóbica, se promueven los valores de E_{vdw} más negativos. En el caso del homodímero obtenido de la trayectoria del complejo, teniendo en consideración la cantidad y permanencia de interacciones hidrofóbicas entre los *loops* BB y pepMAL (tabla 5.7), la superficie de potencial electrostática en dicha zona es predominantemente neutra. El acoplamiento del péptido induce un reordenamiento de las cadenas laterales hidrofóbicas de los *loops* BB hacia el exterior que disminuye el grado de asociación entre dichas zonas del homodímero, derivando en que los valores de E_{vdw} sea más positivos.



(a) trayectoria en solitario

(b) trayectoria del complejo pepMAL-TLR4

Figura 5.15: Superficie electrostática del homodímero obtenido desde su trayectoria en solitario y la trayectoria del complejo pepMAL-TLR4

Loops BB rodeados por líneas negras finas

Cambios importantes en la superficie electrostática señalados con regiones delimitados por líneas gruesas de color negro

Tabla 5.12: Estrategia MT+NM aplicada al complejo pepMAL-TLR4

	Complejo		Receptor		Ligando		Δ
	\bar{x} [kJ/mol]	σ	\bar{x} [kJ/mol]	σ	\bar{x} [kJ/mol]	σ	
E_{Int}	26.764,63	1,07 %	25.710,08	0,82 %	874,73	4,27 %	179,82
E_{vdw}	-3.502,17	4,31 %	-3.414,05	4,19 %	43,34	72,80 %	-131,46
E_{Coul}	-46.738,53	0,89 %	-44.567,08	1,39 %	-1.779,28	11,08 %	-392,16
E_{MM}	-23.476,07	2,18 %	-22.271,05	3,23 %	-861,21	25,37 %	-343,81
$G_{Solv,NP}$	506,71	1,77 %	481,07	2,28 %	40,31	7,10 %	-14,67
$G_{Solv,P}$	-12.385,07	1,79 %	-11.975,90	2,75 %	-714,74	17,74 %	305,57
G_{Solv}	-11.878,36	1,82 %	-11.494,83	2,80 %	-674,42	18,43 %	290,89
(-TS)	-2.227,02	—	-2.160,42	—	-93,81	—	27,21
G	-37.581,45		-35.926,30		-1.629,44		-25,71

Tabla 5.13: Estrategia UT+QH aplicada al complejo pepMAL-TLR4

	Complejo		Receptor		Ligando		Δ
	\bar{x} [kJ/mol]	σ	\bar{x} [kJ/mol]	σ	\bar{x} [kJ/mol]	σ	
E_{Int}	26.764,63	1,07 %	25.796,82	1,06 %	882,51	3,90 %	85,30
E_{VdW}	-3.502,17	4,31 %	-3.373,87	4,21 %	34,77	51,41 %	-163,07
E_{Coul}	-46.738,53	0,89 %	-44.642,05	0,99 %	-1.556,22	6,66 %	-540,26
E_{MM}	-23.476,07	2,18 %	-22.219,09	2,34 %	-638,94	14,18 %	-618,04
$G_{Solv,NP}$	506,71	1,77 %	490,53	1,74 %	41,23	2,35 %	-25,05
$G_{Solv,P}$	-12.385,07	1,79 %	-11.992,18	1,78 %	-804,06	6,28 %	411,17
G_{Solv}	-11.878,36	1,82 %	-11.501,66	1,82 %	-762,83	6,58 %	386,13
(-TS)	-285,40	—	-285,17	—	-95,92	—	95,69
G	-35.639,83		-34.005,92		-1.497,69		-136,23

5.4.2.2. pepMyD88-TLR4

Las tablas 5.14 y 5.15 muestran varios elementos importantes a destacar entre los cuales se encuentran los valores de las energías de no enlace (E_{VdW} y E_{Coul}). Al observar los valores de ΔE_{VdW} , la diferencia entre ambas estrategias es de 100 [kJ/mol] aproximadamente y cuya explicación está principalmente asociada a la estimación de la energía de Van der Waals del receptor.

En el caso de ΔE_{Coul} , se observa una diferencia aproximada de 300 [kJ/mol] atribuible tanto al homodímero como al péptido de bloqueo. La magnitud de E_{Coul} calculado para el homodímero a través de la estrategia de trayectoria única es aproximadamente 500 [kJ/mol] mayor en comparación a la alcanzada a través de la estrategia de trayectorias múltiples. Sin embargo, en el caso de pepMyD88, se da el caso inverso dado que la magnitud de E_{Coul} es aproximadamente 200 [kJ/mol] menor.

Los cambios estructurales inducidos sobre el homodímero por el acoplamiento del péptido de bloqueo tienen efectos locales sobre los A pesar de que las diferencias entre ambas estrategias sean más atenuadas en el caso del homodímero, también presentan variaciones en sus valores de E_{Coul} y $G_{Solv,P}$, las cuales están ligadas principalmente a la movilidad de los extremos N-terminal y C-terminal. En efecto, las figuras 5.15a y 5.15b muestran que las superficies de potencial electrostático en dichas regiones presentan distintas características *loops* BB del homodímero. La unión del péptido de bloqueo al homodímero indujo una separación de los *loops* BB del homodímero, específicamente en las interacciones que involucran a los aminoácidos F51 y P53 de la cadena A y H210 y Y211 de la cadena B. De acuerdo a la tabla 5.8, F51 participa en interacciones hidrofóbicas durante gran parte de la simulación y destaca su participación en la formación de contactos catión- π con H210 dentro de un intervalo considerable de tiempo. Específicamente, con el acoplamiento de pepMyD88 se interrumpe dicha interacción catión- π y el contacto hidrofóbico entre F51 y I220 en su totalidad, lo cual queda de manifiesto en las figuras 5.16a y 5.16b. Estas observaciones permiten justificar las diferencias en los valores de E_{VdW} (tablas 5.14 y 5.15) ya que la pérdida de contactos hidrofóbicos incide negativamente sobre los valores de energía de Van der Waals, causando que su valor sea menor en la simulación en solitario en comparación con la información extraída desde la trayectoria del complejo.

En lo que respecta a las diferencias en los valores de E_{Coul} y $G_{Solv,P}$ del homodímero, estas no están asociadas directamente con los *loops* BB, sino que están ligadas principalmente a la movilidad de los extremos N-terminal y C-terminal. En efecto, las figuras 5.16a y 5.16b muestran que las superficies de potencial electrostático en dichas regiones presentan distintas características.

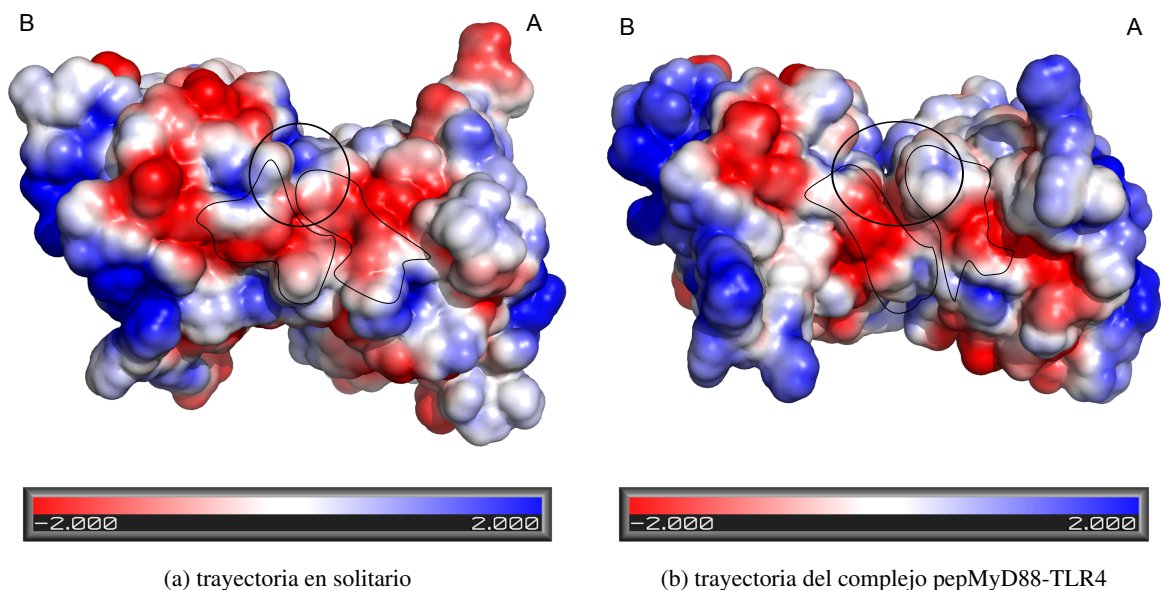


Figura 5.16: Superficie electrostática del homodímero obtenido desde su trayectoria en solitario y la trayectoria del complejo pepMyD88-TLR4

Loops BB rodeados por líneas negras finas

Cambios importantes en la superficie electrostática señalados con regiones delimitados por líneas gruesas de color negro

En el caso del ligando, las diferencias entre E_{Coul} y $G_{Solv,P}$ se explican principalmente por el comportamiento de su extremo N-terminal. Su simulación en solitario posee dos conformaciones representativas respaldadas por su valor de desviación estándar, una de ellas de carácter extendida en las que las cadenas hidrofílicas están expuestas al solvente (figura 5.17a) y otra colapsada producto de la formación de puentes de hidrógeno de carácter interno (figura 5.17b). Mientras que la primera tiene asociado valores más negativos para $G_{Solv,P}$, la segunda experimenta el efecto inverso. En comparación con la trayectoria obtenida del complejo, si bien se evidencia un plegamiento en el extremo C-terminal basado en interacciones hidrofóbicas (figura 5.8), la gran exposición del extremo N-terminal de pepMyD88 hacia el solvente favorece la obtención de valores de $G_{Solv,P}$ más negativos que la conformación colapsada, aunque más positivos que los alcanzados en la conformación extendida. En forma complementaria, la existencia de los puentes de hidrógeno internos en la conformación colapsada, aspecto ausente en la trayectoria en presencia del homodímero, fomenta valores más negativos de E_{Coul} .

Según lo anterior, en concordancia con el estudio de RMSD de sus trayectorias (figura 5.13b) que señala que tanto la conformación estirada como colapsada de pepMyD88 se presentan durante intervalos de tiempo similares, su trayectoria en solitario indica valores promedio de E_{Coul} más negativos y valores promedio de $G_{Solv,P}$ más positivos en comparación a los alcanzados en presencia del homodímero, lo cual va acompañado por una mayor desviación estándar.

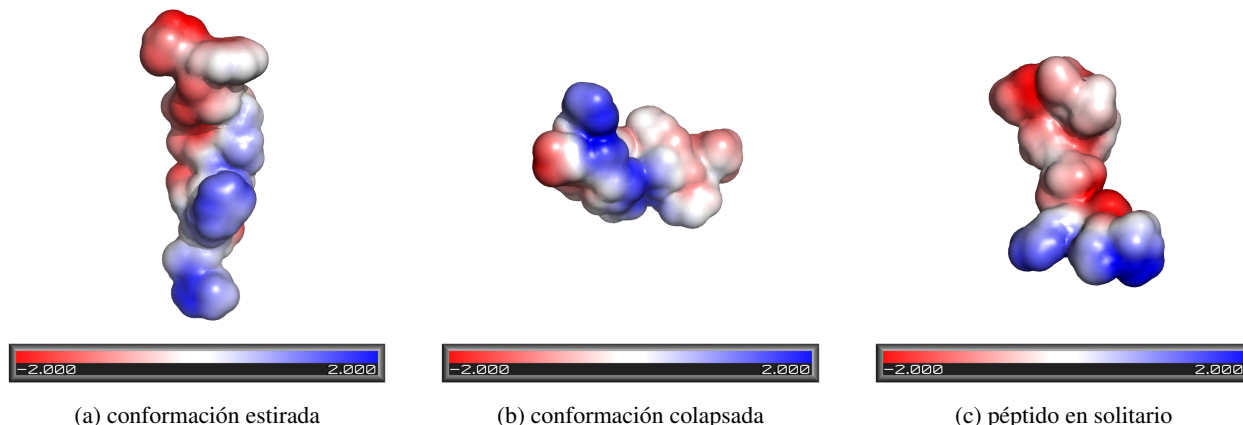


Figura 5.17: Superficie electrostática de pepMyD88 obtenido desde su trayectoria en solitario y la trayectoria del complejo pepMyD88-TLR4

Tabla 5.14: Estrategia MT+NM aplicada al complejo pepMyD88-TLR4

	Complejo		Receptor		Ligando		Δ
	\bar{x} [kJ/mol]	σ	\bar{x} [kJ/mol]	σ	\bar{x} [kJ/mol]	σ	
E_{Int}	26.736,46	0,79 %	25.710,08	0,82 %	872,65	4,18 %	153,73
E_{VdW}	-3.434,25	3,76 %	-3.414,05	4,19 %	27,29	80,50 %	-47,49
E_{Coul}	-46.683,54	2,44 %	-44.567,08	1,39 %	-1.601,56	10,95 %	-514,90
E_{MM}	-23.381,32	5,09 %	-22.271,05	3,23 %	-701,61	26,53 %	-408,66
$G_{Solv,NP}$	518,74	1,43 %	481,07	2,28 %	42,08	4,05 %	-4,41
$G_{Solv,P}$	-12.584,13	3,70 %	-11.975,90	2,75 %	-860,98	12,24 %	252,75
G_{Solv}	-12.065,40	3,84 %	-11.494,83	2,80 %	-818,90	12,72 %	248,33
(-TS)	-2.199,87	—	-2.160,42	—	-107,48	—	68,03
G	-37.646,59		-35.926,30		-1.627,99		-92,30

Tabla 5.15: Estrategia UT+QH aplicada al complejo pepMyD88-TLR4

	Complejo		Receptor		Ligando		Δ
	\bar{x} [kJ/mol]	σ	\bar{x} [kJ/mol]	σ	\bar{x} [kJ/mol]	σ	
E_{Int}	26.736,46	0,79 %	25.776,89	0,80 %	879,84	3,84 %	79,73
E_{VdW}	-3.434,25	3,76 %	-3.323,18	3,78 %	36,95	55,97 %	-148,02
E_{Coul}	-46.683,54	2,44 %	-45.077,63	2,60 %	-1.403,79	5,83 %	-202,12
E_{MM}	-23.381,32	5,09 %	-22.623,91	5,52 %	-487,00	17,60 %	-270,41
$G_{Solv,NP}$	518,74	1,43 %	497,29	1,62 %	42,67	2,31 %	-21,22
$G_{Solv,P}$	-12.584,13	3,70 %	-11.907,66	4,34 %	-957,84	4,50 %	281,37
G_{Solv}	-12.065,40	3,84 %	-11.410,37	4,49 %	-915,18	4,69 %	260,15
(-TS)	-288,31	—	-285,17	—	-115,90	—	112,76
G	-35.735,03		-34.319,45		-1.518,08		102,51

5.4.2.3. pepTLR4-TLR4

Las tablas 5.16 y 5.17 muestran varios elementos importantes a destacar entre los cuales se encuentran los valores de las energías de Van der Waals (E_{VdW}) y la variación de energía libre de solvatación polar ($G_{Solv,P}$). En el primer caso, el ligando presenta una diferencia aproximada de 300 [kJ/mol] menor en la

estrategia de trayectoria única en comparación al uso de trayectorias múltiples, mientras que el homodímero presenta una diferencia de 100 [kJ/mol] aproximadamente menor bajo trayectoria única.

Por su parte, $G_{Solv,P}$ también presenta diferencias en su estimación para el homodímero y el péptido de bloqueo. En el primer caso, la diferencia es cercana a los 150 [kJ/mol] cuyo valor obtenido mediante el uso de trayectoria única es el menor. En el caso de pepTLR4, esta diferencia corresponde a 190 [kJ/mol] aproximadamente, siendo más favorable energéticamente el valor encontrado a través de múltiples trayectorias.

El acoplamiento de pepTLR4 indujo cambios conformacionales de carácter local en el *loop* CC de la cadena A y la hélice αC de la cadena B del homodímero producto de las interacciones catión- π que existen con el péptido de bloqueo (tabla 5.9). Sin embargo, el impacto más significativo se observa en las figuras 5.18a y 5.18b. Los *loops* BB experimentan un acercamiento basado en interacciones de carácter hidrofóbico y, en consecuencia, causa cambios en la definición de su superficie de potencial electrostático, pasando desde una región polarizada (figura 5.18a) una de carácter neutro (figura 5.18b). De esta forma, la presencia de pepTLR4 en la simulación repercute sobre el homodímero en valores menores de E_{VDW} .

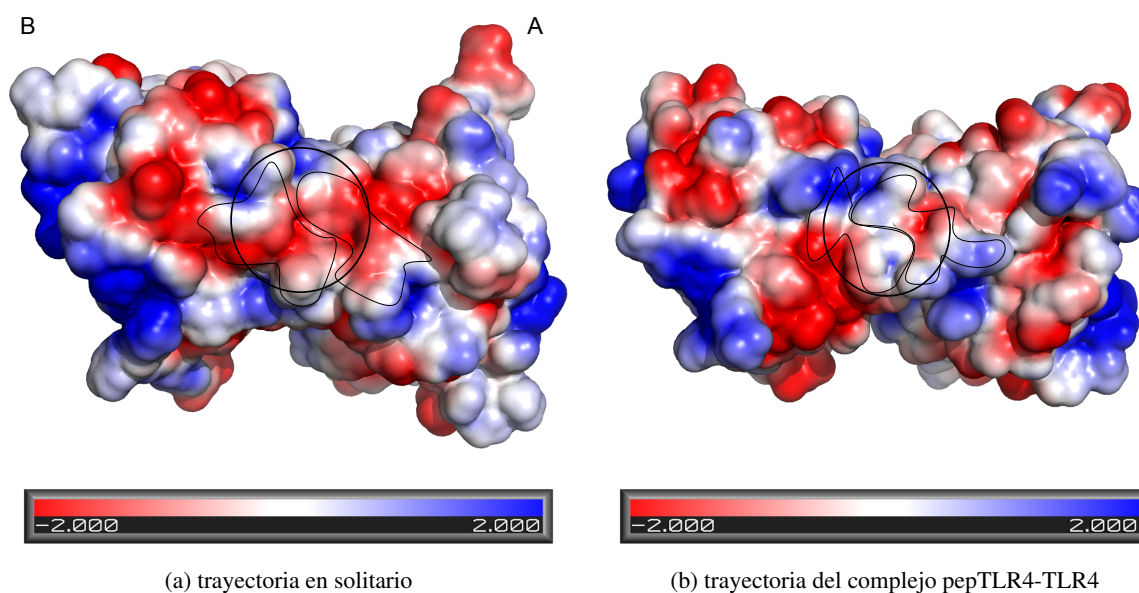


Figura 5.18: Superficie electrostática del homodímero obtenido desde su trayectoria en solitario y la trayectoria del complejo pepTLR4-TLR4

Loops BB rodeados por líneas negras tenues

Cambios importantes en la superficie electrostática señalados con regiones delimitados por líneas gruesas de color negro

Por su parte, el ligando muestra en su simulación en solitario dos estados conformacionales representativos (figuras 5.19a y 5.19b) que varían en su grado de interacción consigo mismo dependiente de la cantidad de los puentes de hidrógeno. En ambos se observan plegamientos sobre sí mismo basados en dichas interacciones, sin embargo, su cantidad es mayor en la estructura colapsada (figura 5.19b). En el caso de la trayectoria del péptido extraída a partir del complejo, si bien el plegamiento sobre sí mismo también está influido por la formación de puentes de hidrógeno (tabla 5.9), su permanencia en el tiempo es baja en comparación a las observadas en el péptido simulado en solitario. Según esto, dado que este tipo de interacciones está asociada a fenómenos electrostáticos, se obtienen valores más negativos de E_{Coul} asociados a una mayor desviación estándar en el caso de la trayectoria del péptido en solitario. En cuanto a los valores

de $G_{\text{Solv,P}}$ del ligando, estos son más positivos en el caso de la trayectoria en solitario debido a la orientación que adquieren los grupos hidrofóbicos hacia el exterior durante la trayectoria, haciendo menos favorable el proceso de solvatación y cuya variación está marcada por una mayor desviación estándar en comparación a la trayectoria extraída desde el complejo.

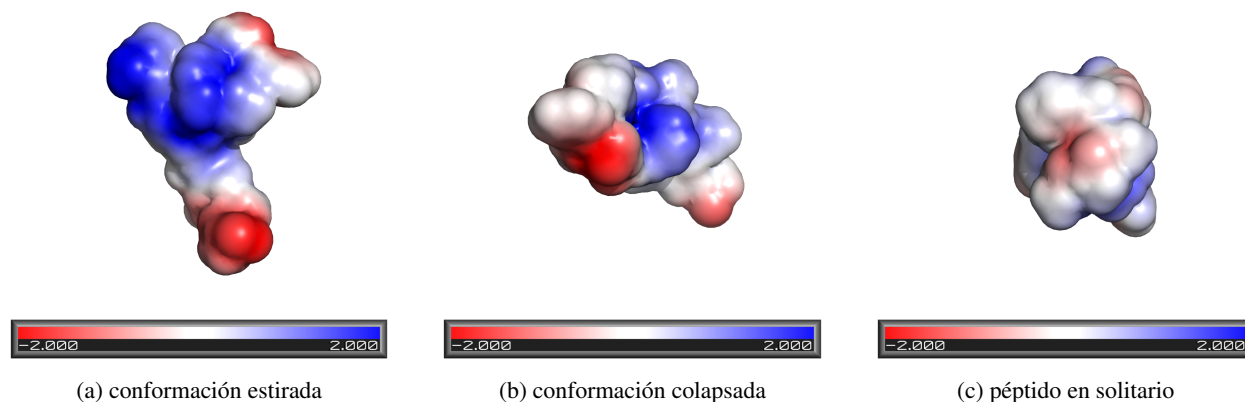


Figura 5.19: Superficie electrostática de pepTLR4 obtenido desde su trayectoria en solitario y la trayectoria del complejo pepTLR4-TLR4

Tabla 5.16: Estrategia MT+NM aplicada al complejo pepTLR4-TLR4

	Complejo		Receptor		Ligando		Δ
	\bar{x} [kJ/mol]	σ	\bar{x} [kJ/mol]	σ	\bar{x} [kJ/mol]	σ	
E_{Int}	26.828,72	0,78 %	25.710,08	0,82 %	969,83	3,43 %	148,81
E_{vdW}	-3.562,39	3,94 %	-3.414,05	4,19 %	3,91	604,12 %	-152,25
E_{Coul}	-46.098,35	1,11 %	-44.567,08	1,39 %	-1.144,31	5,87 %	-386,95
E_{MM}	-22.832,02	2,51 %	-22.271,05	3,23 %	-170,57	45,59 %	-390,40
$G_{\text{Solv,NP}}$	510,30	1,74 %	481,07	2,28 %	40,73	4,43 %	-11,50
$G_{\text{Solv,P}}$	-12.529,92	2,45 %	-11.975,90	2,75 %	-760,73	5,71 %	206,71
G_{Solv}	-12.019,62	2,51 %	-11.494,83	2,80 %	-720,00	5,87 %	195,21
(-TS)	-2.294,37	—	-2.160,42	—	-92,09	—	-41,86
G	-37.146,01		-35.926,30		-982,66		-237,06

Tabla 5.17: Estrategia UT+QH aplicada al complejo pepTLR4-TLR4

	Complejo		Receptor		Ligando		Δ
	\bar{x} [kJ/mol]	σ	\bar{x} [kJ/mol]	σ	\bar{x} [kJ/mol]	σ	
E_{Int}	26.828,72	0,78 %	25.764,16	0,78 %	984,02	3,62 %	80,54
E_{vdW}	-3.562,39	3,94 %	-3.438,97	4,20 %	11,24	212,90 %	-134,67
E_{Coul}	-46.098,35	1,11 %	-44.470,10	1,06 %	-1.466,21	8,81 %	-162,04
E_{MM}	-22.832,02	2,51 %	-22.144,91	2,31 %	-470,95	31,51 %	-216,16
$G_{\text{Solv,NP}}$	510,30	1,74 %	489,55	1,73 %	39,67	4,73 %	-18,92
$G_{\text{Solv,P}}$	-12.529,92	2,45 %	-12.130,66	2,17 %	-571,28	13,10 %	172,02
G_{Solv}	-12.019,62	2,51 %	-11.641,11	2,24 %	-531,61	13,82 %	153,10
(-TS)	-286,32	—	-285,17	—	-99,25	—	98,09
G	-35.137,96		-34.071,19		-1.101,80		35,04

5.4.2.4. pepTRAM-TLR4

Las tablas 5.18 y 5.19 muestran varios elementos importantes a destacar entre los cuales se encuentran los valores de las energías electrostáticas (E_{Coul}) y la variación de energía libre de solvatación polar ($G_{\text{Solv,P}}$). En el primer caso, el ligando presenta una diferencia aproximada de 65 [kJ/mol] mayor en la estrategia de trayectoria única en comparación al uso de trayectorias múltiples, mientras que el homodímero presenta una diferencia de 230 [kJ/mol] aproximadamente entre ambas estrategias, presentándose su menor valor en la estrategia de múltiples trayectorias.

Por su parte, $G_{\text{Solv,P}}$ también presenta diferencias importantes en su estimación para el homodímero. En efecto, la diferencia es cercana a los 230 [kJ/mol] cuyo valor obtenido mediante el uso de trayectoria única es el menor. En el caso de pepTRAM, si bien se presentan diferencias cercanas a los 20 [kJ/mol], su impacto es despreciable respecto a lo descrito anteriormente.

En este caso, los cambios conformacionales sobre los *loops* BB del homodímero inducidos por el acoplamiento del péptido de bloqueo están asociados a la influencia del aminoácido I52 de la cadena A. Según se indica en la tabla 5.6, este aminoácido es relevante en la generación de contactos hidrofóbicos con la cadena B del homodímero. Sin embargo, el acoplamiento del ligando trae consigo una pérdida del contacto con I220, aminoácido cercano a los que participan en los contactos con pepTRAM (tabla 5.10), incidiendo de esta forma en un valor mayor de E_{vdW} . Por otro lado, las figuras 5.20a y 5.20b muestran los cambios que sufre la superficie de potencial electrostático sobre los *loops* BB. Si bien en su simulación en solitario existe una superficie donde se distinguen varias regiones con carga, la influencia del ligando es tal que, dadas las interacciones hidrofóbicas que se producen con este, se observa una superficie neutra que contribuye a la disminución de $G_{\text{Solv,P}}$. Otro aspecto corresponde a la formación del puente salino en el que participa el aminoácido E24 de la hélice αA de la cadena A con el péptido de bloqueo. La figura 5.20b muestra que dicha interacción repercute en su acercamiento a otras zonas cuya superficie de potencial electrostático también es de carácter positivo. Según esto, el ligando genera sobre el homodímero una disminución del valor de $G_{\text{Solv,P}}$ ya que genera una mayor exposición de los grupos polares en dicha zona. Junto con esto, dada la naturaleza electrostática, el acercamiento de grupos de carga negativa deriva en un valor mayor de E_{Coul} . Sin embargo, esto no se condice totalmente con los valores de las tablas 5.18 y 5.19 dado que estos están influidos principalmente por el comportamiento de sus extremos N-terminal y C-terminal.

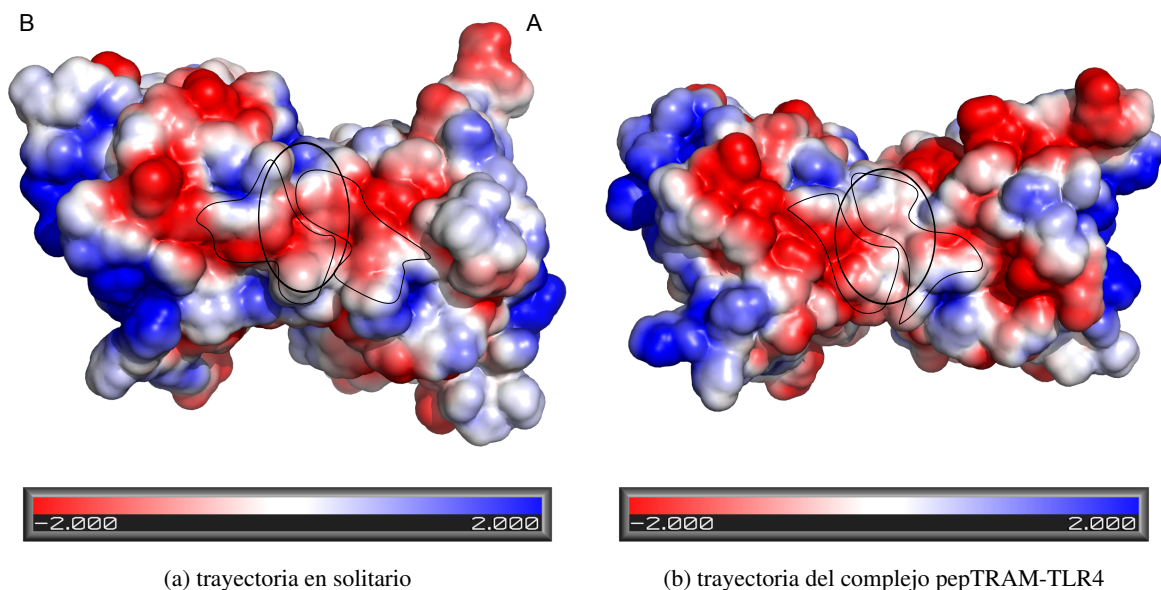


Figura 5.20: Superficie electrostática del homodímero obtenido desde su trayectoria en solitario y la trayectoria del complejo pepTRAM-TLR4

Loops BB rodeados por líneas negras tenues

Cambios importantes en la superficie electrostática señalados con regiones delimitados por líneas gruesas de color negro

En lo que respecta a pepTRAM, su comportamiento acoplado al homodímero está marcado por una mayor estabilidad reflejada en valores más pequeños de desviación estándar (figura 5.13d). Su simulación en solitario muestra dos estados conformacionales predominantes, uno extendido marcado por la definición de una superficie electrostática más favorable con el fenómeno de solvatación (figura 5.21a) en comparación al otro colapsado (figura 5.21b) en el que se forman plegamientos basados en la formación de puentes de hidrógeno en los que se alcanzan valores menores de E_{Coul} y mayores de $G_{\text{Solv,P}}$ producto de una superficie electrostática con mayores zonas sin carga expuestas al solvente. Esto es consistente con los valores logrados en presencia del homodímero cuya conformación indica una baja interacción consigo mismo a través de valores menos favorables de E_{vdW} y E_{Coul} .

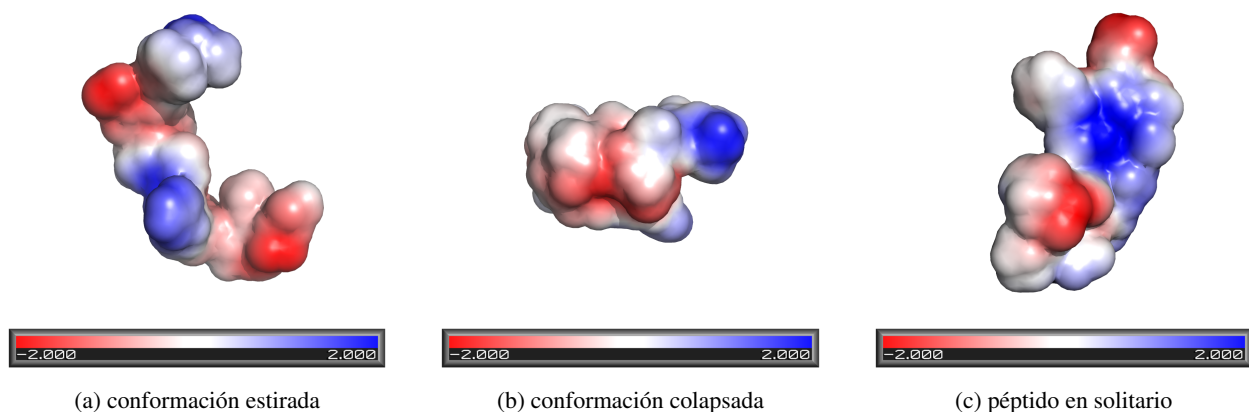


Figura 5.21: Superficie electrostática de pepTRAM obtenido desde su trayectoria en solitario y la trayectoria del complejo pepTRAM-TLR4

Tabla 5.18: Estrategia MT+NM aplicada al complejo pepTRAM-TLR4

	Complejo		Receptor		Ligando		Δ
	\bar{x} [kJ/mol]	σ	\bar{x} [kJ/mol]	σ	\bar{x} [kJ/mol]	σ	
E_{Int}	26.750,61	0,74 %	25.710,08	0,82 %	976,42	3,40 %	64,11
E_{vdW}	-3.470,57	3,48 %	-3.414,05	4,19 %	-14,77	187,66 %	-41,75
E_{Coul}	-46.157,00	1,16 %	-44.567,08	1,39 %	-1.578,42	8,56 %	-11,50
E_{MM}	-22.876,95	2,68 %	-22.271,05	3,23 %	-616,77	23,35 %	10,86
$G_{Solv,NP}$	518,20	1,48 %	481,07	2,28 %	39,91	5,36 %	-2,77
$G_{Solv,P}$	-12.767,62	1,83 %	-11.975,90	2,75 %	-782,57	9,26 %	-9,15
G_{Solv}	-12.249,42	1,88 %	-11.494,83	2,80 %	-742,66	9,66 %	-11,93
(-TS)	-2.238,39	—	-2.160,42	—	-89,24	—	11,27
G	-37.364,76		-35.926,30		-1.448,67		10,20

Tabla 5.19: Estrategia UT+QH aplicada al complejo pepTRAM-TLR4

	Complejo		Receptor		Ligando		Δ
	\bar{x} [kJ/mol]	σ	\bar{x} [kJ/mol]	σ	\bar{x} [kJ/mol]	σ	
E_{Int}	26.750,61	0,74 %	25.697,65	0,75 %	974,02	3,62 %	78,94
E_{vdW}	-3.470,57	3,48 %	-3.385,27	3,81 %	16,67	112,38 %	-101,97
E_{Coul}	-46.157,00	1,16 %	-44.338,57	1,18 %	-1.513,67	6,07 %	-304,76
E_{MM}	-22.876,95	2,68 %	-22.026,19	2,82 %	-522,98	17,24 %	-327,79
$G_{Solv,NP}$	518,20	1,48 %	493,19	1,72 %	42,26	2,62 %	-17,25
$G_{Solv,P}$	-12.767,62	1,83 %	-12.204,91	2,03 %	-803,08	5,75 %	240,37
G_{Solv}	-12.249,42	1,88 %	-11.711,72	2,07 %	-760,82	6,03 %	223,12
(-TS)	-287,45	—	-285,17	—	-99,81	—	97,53
G	-35.413,82		-34.023,08		-1.383,60		-7,15

Capítulo 6

Discusión

6.1. Docking y estudio preliminar de interacciones

Dentro de los antecedentes bibliográficos presentados en la sección 3.1, la utilización de las herramientas de *docking* es común en el estudio de las vías de señalización en las que intervienen los receptores TLR4 y las proteínas adaptadoras MAL, MyD88 y TRAM. En particular, el objetivo de este trabajo se focaliza en los eventos que ocurren a partir de la homodimerización de los receptores TLR4. Sin embargo, no todos los antecedentes presentados muestran interacciones asociadas a la activación de las vías de señalización TLR4-TLR4 y, en consecuencia, su consideración es de carácter parcial dado que establecen interacciones dentro de otro contexto biológico.

Un ejemplo de lo mencionado anteriormente corresponde al estudio de Dunne y *cols.* que establece la existencia del heterodímero TLR4-MyD88, modelo definido preliminarmente a través del *software* de *docking* rígido proteína-proteína GRAMM, a través de la realización de estudios experimentales de co-expresión, co-inmunoprecipitación y ensayos de *pull-down* mediante GST [53]. A pesar de lo anterior, estas pruebas *in vitro* no consideran aspectos claves de la activación de las vías TLR4-TLR4 tales como su homodimerización [20, 22].

De manera similar, haciendo uso del programa GRAMM, Gong y *cols.* establece la formación del homodímero de MyD88 a través de sus dominios TIR y del tetrámero resultante al acoplarse con el homodímero de TLR4 [54], eventos constatados en estudios de sobreexpresión de dichos dominios [46]. El estudio valida estos modelos a través de pruebas experimentales en las que MyD88 fusionado a un dominio PIP2 permite su asociación a la membrana plasmática y su interacción directa con el homodímero de TLR4 sin requerir de la presencia de MAL. No obstante, bajo circunstancias normales el dominio PIP2 está presente solamente en esta última proteína adaptadora y, en consecuencia, omite su requerimiento en la vía de señalización TLR4-TLR4 validado a través de diversos estudios experimentales que respaldan su función [47, 60].

Conforme a lo anterior, el estudio de las interacciones que se producen entre dos moléculas asociado a un contexto biológico particular se sustenta a partir de evidencia experimental que establece la formación del complejo correspondiente. Teniendo esto en consideración, la utilización de los algoritmos de *docking* busca esclarecer qué conformaciones puede adoptar dicho complejo y cuál de ellas es la que presenta una mayor estabilidad. Esto se establece mediante la definición de múltiples parámetros asociados al algoritmo de búsqueda (zonas rígidas y flexibles, atracción y repulsión electrostática, radios de Van der Waals para evaluar impedimentos estéricos, entre otras consideraciones) y la función de *scoring* que establece una regla general de evaluación para determinar la conformación de menor energía, aspectos que difieren considerablemente entre los diferentes programas de *docking* disponibles. Sin embargo, un elemento común que afecta directamente sobre los resultados obtenidos, independiente del programa elegido, está asociado a los modelos tridimensionales que definen a las moléculas participantes cuya modificación puede repercutir en complejos con diferentes zonas de interacción. Un ejemplo lo constituye el trabajo de Rossel y *cols.* [102]

en el cual se establecen nuevos modelos de los receptores TLR4, MAL y TRAM que, comparados con los elaborados por Núñez y cols. [20], presentan mejor disposición geométrica según herramientas de validación estructural que repercuten en la formación de complejos proteína-proteína con diferentes superficies de interacción.

En lo que respecta a los resultados obtenidos, la energías calculadas corresponden a la energía de enlace equivalente a la suma de las energías intermoleculares y la energía libre torsional. La determinación de la conformación más estable para una región de búsqueda específica se realiza mediante un *ranking* interno de las configuraciones encontradas del mismo ligando relativo al resto. En este sentido, la función de *scoring* está optimizada para clasificar conformaciones asignando una puntuación relativa para el mismo ligando, lo cual genera serios errores en la estimación real de la energía libre. Según esto, las puntuaciones no son de carácter absoluto, con lo cual no es posible comparar los resultados de diferentes ligandos. Por otro lado, teniendo en consideración que las conformaciones son establecidas a través de átomos pesados distintos del hidrógeno, su disposición arbitraria establece dudas acerca de las posibles interacciones encontradas en esta etapa.

Dado que la identificación de un sitio de acoplamiento específico corresponde a un problema de optimización, es necesario realizar dicho procedimiento reiteradamente con el fin de encontrar el mínimo global correspondiente al estado de menor energía libre de enlace. Por esta razón, dicho procedimiento se realizó en tres oportunidades en una etapa inicial variando la cantidad de enlaces rotables, estableciendo como estructura rígida al homodímero de TLR4: estructura rígida del ligando, flexibilidad sobre las cadenas laterales del ligando y flexibilidad sobre la cadena central del ligando. Adicionalmente, se realizaron cinco repeticiones más sobre la interfase del homodímero que, de acuerdo a la información bibliográfica disponible, es la región clave en el posterior acoplamiento de las proteínas adaptadoras MAL y TRAM.

Efectivamente, observando los datos obtenidos del *docking* basado en el barrido discreto de la superficie del homodímero, se logra identificar la existencia de mínimos locales ya que se presentan conformaciones y valores de energía libre de unión diferentes para una misma región de búsqueda (datos no presentados). Junto con lo anterior, los resultados indican que las zonas de interacción más favorables para cada uno de los péptidos se ubican en la región definida como I2. Esta incluye esencialmente las hélices α C del homodímero, las cuales están ubicadas en la región opuesta a los *loops* BB incluidos completamente dentro de la región I1. Teniendo en consideración el margen de error asociado a la estimación de la energía libre de unión equivalente a $\pm 2,85$ [kcal/mol] [73], es importante notar que no existe dicha diferencia entre I2 y la mayoría de las zonas estudiadas. En efecto, las zonas I1, I3, I7 e I8, las cuales contienen ya sea la totalidad o una fracción de los *loops* BB del homodímero, presentan una diferencia máxima menor a dicho margen. Esto indica que Vina no es capaz de discriminar adecuadamente cuál zona es más favorable para la interacción entre los péptidos de bloqueo y el homodímero de TLR4.

Los motivos tras la incapacidad de Vina de detectar la conformación más favorable del complejo proteína-ligando se deben a múltiples factores. La flexibilidad intrínseca del homodímero y de los péptidos de bloqueo, así como los cambios conformacionales que ocurren con la formación del complejo, son aspectos que están considerados en forma limitada dentro de los algoritmos de acoplamiento. De acuerdo a los desarrolladores de Vina [73], al incrementar la cantidad de enlaces flexibles se dificulta la identificación de una conformación única. Al considerar los péptidos de bloqueo como estructuras rígidas, los resultados obtenidos del *docking* fueron idénticos para todas las repeticiones. Por su parte, la consideración de flexibilidad en estos ligandos no condujo a la obtención de resultados idénticos ya que cada repetición representa un problema de optimización con condiciones iniciales particulares. En forma complementaria, la calidad estructural de los modelos utilizados en este trabajo, evaluada a través de los estudios de Salgado y cols., resulta fundamental en la ubicación espacial de los átomos que definen las regiones rígidas.

Otros aspectos están asociados a la naturaleza de su función de *scoring* descrita en la ecuación (4.3). Se observa que los términos energéticos que definen una configuración determinada están sujetos a un criterio

geométrico asociado a las distancias entre los centros atómicos y los radios de Van der Waals particulares. Esto corresponde a una aproximación que tiene por objetivo realizar una estimación más eficiente de la afinidad del ligando que, sin embargo, trae consigo imprecisiones en la determinación de la conformación del complejo. En el caso de Vina, el modelamiento de las interacciones electrostáticas a través de interacciones hidrofóbicas y puentes de hidrógeno, la omisión del cálculo de entropía y la identificación de complejos proteína-ligando sin considerar los efectos de las moléculas de agua son aspectos que afectan directamente en las conformaciones obtenidas y su discrepancia con la evidencia experimental.

En virtud de estas razones, la elección de cada uno de los complejos proteína-ligando estudiados en este trabajo fue dirimida a través de la evidencia experimental que le asigna una gran importancia a los *loops* BB en la homodimerización de TLR4 y el acoplamiento de las proteínas adaptadoras MAL y TRAM [20,55,56]. De esta forma, se eligieron las conformaciones proteína-ligando de menor energía de unión obtenidas dentro de la región de búsqueda I1 que incluía completamente dicha zona del homodímero. Los contactos descritos para los péptidos de bloqueo pepMAL y pepTRAM son también observados en las simulaciones de *docking* rígido proteína-proteína desarrollados por Rossel y *cols.* entre el homodímero de TLR4 y las proteínas adaptadoras MAL y TRAM [102]. De acuerdo a los análisis de área superficial accesible al solvente, los contactos preliminares establecidos por pepMyD88 (tabla 5.3) y pepTRAM (tabla 5.5) suponen un mayor potencial inhibitorio que pepMAL (tabla 5.2) y pepTLR4 (tabla 5.4) ya que presentan una mayor superficie de interacción, evidenciando interacciones hidrofóbicas importantes con aminoácidos de los *loops* BB del homodímero.

Estos resultados preliminares concuerdan con los resultados experimentales reportados por Toshchakov que indican una inhibición importante de la expresión de citoquinas pro-inflamatorias e interferones tanto en las vías independiente y dependiente de MyD88 al emplear tales péptidos de bloqueo [28, 29]. En términos relativos, Toshchakov establece que el efecto inhibitorio de los *loops* BB extraídos de las proteínas adaptadoras MAL (pepMAL), MyD88 (pepMyD88), TRAM (pepTRAM) y TRIF (pepTRIF) puede ser ordenado como pepTRAM \approx pepMyD88 > pepTRIF > pepMAL [28]. A través de otro estudio realizado por el mismo autor, logra determinar que el *loop* BB de TLR4 también ejerce un efecto inhibitorio sobre dichas vías de señalización. [29]

6.2. Contactos determinados a través de la dinámica molecular

Las simulaciones de dinámica molecular entregan resultados que, en primer término, parecen ser contradictorios con los descritos por Toshchakov y *cols.* [28]. Sin embargo, guardan correspondencia con estos al ser comparados con los resultados de Rossel [102] y la evidencia detallada en la sección 3.1. Tratándose de la misma secuencia (figura 6.6b), el estudio de Toshchakov establece que pepMyD88 logra el mayor efecto inhibitorio entre los péptidos de bloqueo utilizados. Sin embargo, los contactos que establece con el homodímero según la simulación de dinámica molecular 5.8 y el análisis de RMSD de su trayectoria (figuras 6.1-6.4) sugieren que su efecto inhibitorio es menor que el logrado por pepMAL y pepTRAM.

Las interacciones observadas para los complejos pepMAL-TLR4 (tabla 5.7) y pepTRAM-TLR4 (tabla 5.10) tienen en común la existencia de un puente salino permanente entre sus residuos de arginina particulares y el aminoácido E24 perteneciente a la hélice αA , situación no observada para los complejos pepMyD88-TLR4 (tabla 5.8) y pepTLR4-TLR4 (tabla 5.9). Esto deja de manifiesto que la orientación que adoptó la región RD conservada en pepMAL, pepMyD88 y pepTLR4 sobre el homodímero fue diferente, lo cual está asociado directamente a las diferencias entre sus zonas no conservadas (figura 5.1a). Específicamente, los aminoácidos adyacentes a la región conservada RD en pepMAL (L47 y A50) participan activamente en interacciones hidrofóbicas con aminoácidos de los *loops* BB del homodímero (tabla 5.7) que, de acuerdo al análisis funcional llevado a cabo por Núñez y *cols.* [20], son claves en el acoplamiento con la proteína

adaptadora MAL. Junto con establecer dichas interacciones, estos aminoácidos contribuyen a la estabilidad de la región RD gracias a la repulsión que existe entre sí, favoreciendo los puentes salinos que forma con la hélice αA de la cadena A del homodímero.

En el caso de pepMyD88, ninguno de los aminoácidos adyacentes (D48 y V51) participa en las interacciones con el homodímero ni consigo mismo (tabla 5.8). La orientación que adoptó sobre el homodímero de TLR4 es tal que el residuo D48 queda enfrentando la región RDF del loop *BB* de TLR4, la cual representa una zona de gran polarización producto de la posibilidad que tiene de formar diversos tipos de interacciones tales como puentes de hidrógeno, puentes salinos e interacciones catión- π . En efecto, durante la trayectoria se observa un equilibrio inestable que, debido a interacciones catión- π poco favorables y los efectos de repulsión entre los residuos de arginina, deriva en la oscilación permanente del extremo N-terminal.

Por su parte, los aminoácidos adyacentes en pepTLR4 (Y48 y F51) participan en el plegamiento sobre sí mismo y en la asociación con ambas cadenas del homodímero a través de interacciones hidrofóbicas y catión- π (tabla 5.9). Dado que estas interacciones están presentes desde un 49% hasta un 71,9% de la simulación, la región conservada RD presenta un comportamiento estable en el tiempo caracterizado por una orientación permanente hacia el solvente.

Esto guarda correspondencia con las figuras 6.1 y 6.2 que muestran el valor absoluto de la variación del RMSD entre *frames* para la región RD conservada según péptido de bloqueo. En efecto, el residuo de arginina en pepMAL y pepTLR4 muestran una estabilidad similar, mientras que en pepMyD88 presenta grandes fluctuaciones.

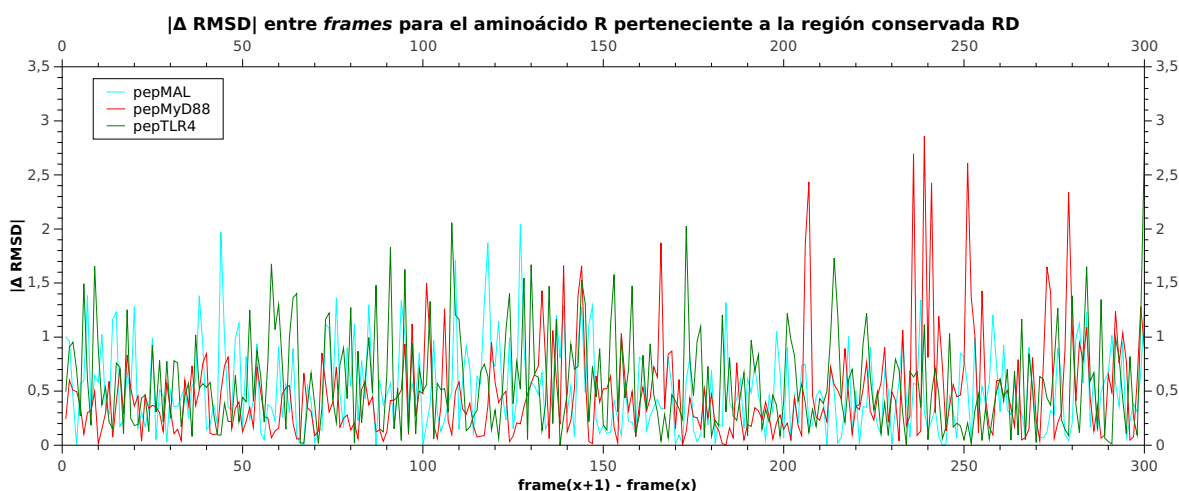


Figura 6.1: $|\Delta \text{RMSD}|$ del aminoácido de arginina conservado en la región RD según péptido de bloqueo

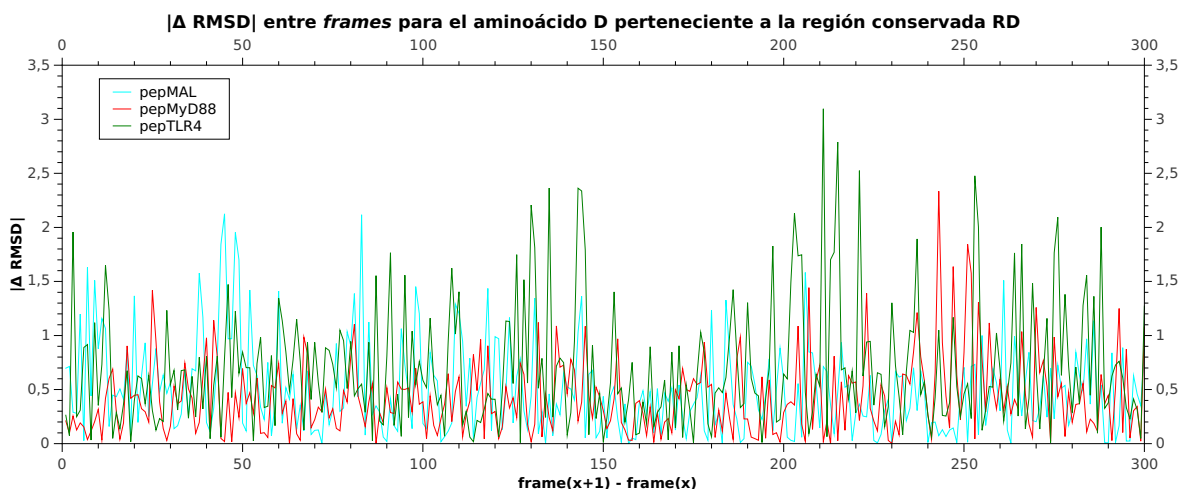


Figura 6.2: $|\Delta\text{RMSD}|$ del aminoácido de ácido aspártico conservado en la región RD según péptido de bloqueo

En el caso de la región conservada PG, el comportamiento que demuestran pepMAL, pepMyD88 y pepTLR4 es bastante similar al descrito en la región RD, lo cual es posible observar a través de las figuras 6.3 y 6.4 que muestran el valor absoluto de la variación del RMSD entre *frames* según péptido de bloqueo. Los aminoácidos adyacentes en pepMAL (T51 y G54) participan en la formación de puentes de hidrógeno durante intervalos considerables de la simulación (tabla 5.7), lo cual promueve la estabilidad de dicha región.

En el caso de pepMyD88, los aminoácidos adyacentes (L52 y T55) participan activamente en el plegamiento observado en su extremo C-terminal y en interacciones con los *loops* BB del homodímero. No obstante, el aminoácido conservado P53 establece contactos hidrofóbicos de permanencia similar con los aminoácidos I215 y V218. Específicamente, los residuos de arginina (R) y ácido aspártico (D) que posee pepMAL están presentes tanto en pepMyD88 como en pepTLR4 dado que forma parte de una región conservada, sin embargo, presentan comportamientos muy diferentes entre sí. En el caso de pepMAL, los aminoácidos adyacentes a la región conservada RD corresponden a aminoácidos de carácter hidrofóbico que logran establecer interacciones hidrofóbicas con aminoácidos que, de acuerdo al análisis funcional llevado a cabo por Núñez y cols. [20], son claves en el acoplamiento con la proteína adaptadora MAL. Dado que son aminoácidos de cargas opuestas, teniendo en consideración el efecto de repulsión con los aminoácidos adyacentes hidrofóbicos y la generación de puentes salinos con la hélice αA , el complejo pepMAL-TLR4 presenta una estabilidad notoria durante toda la simulación de dinámica molecular cotejado por los valores de RMSD asociados del *loop* BB de la cadena B (tabla 5.8). Dada la distancia entre estos y la baja tendencia a interactuar entre sí, los contactos que establece con la región conservada PG de pepMyD88 se deben principalmente al comportamiento inestable de esta última.

Por su parte, los aminoácidos adyacentes en pepTLR4 (I52 y V55) contribuyen en el plegamiento sobre sí mismo hacia el extremo C-terminal y la formación de interacciones hidrofóbicas con los *loops* BB del homodímero. Específicamente, estos aminoácidos establecen interacciones con los aminoácidos V218 y A219 del *loop* BB de la cadena B (tabla 5.9). Al contrario de lo descrito en el caso de pepMyD88, la estabilidad de la región conservada PG en pepTLR4 está apoyada por el porcentaje de permanencia de dichas interacciones y la cercanía de los aminoácidos del *loop* BB.

Finalmente, los aminoácidos adyacentes en pepTRAM (Específicamente, los residuos de arginina (R) y ácido aspártico (D) que posee pepMAL están presentes tanto en pepMyD88 como en pepTLR4 dado que forma parte de una región conservada, sin embargo, presentan comportamientos muy diferentes entre sí. En el caso de pepMAL, los aminoácidos adyacentes a la región conservada RD corresponden a aminoácidos

de carácter hidrofóbico que logran establecer interacciones hidrofóbicas con aminoácidos que, de acuerdo al análisis funcional llevado a cabo por Núñez y cols. [20], son claves en el acoplamiento con la proteína adaptadora MAL. Dado que son aminoácidos de cargas opuestas, teniendo en consideración el efecto de repulsión con los aminoácidos adyacentes hidrofóbicos y la generación de puentes salinos con la hélice αA , el complejo pepMAL-TLR4 presenta una estabilidad notoria durante toda la simulación de dinámica molecular cotejado por los valores de RMSD asociados. M51 y R55) y la contribución del aminoácido C53 contribuyen directamente sobre la estabilidad de los aminoácidos P52 y G54 conservados. Los aminoácidos M51 y C53 contribuyen en el plegamiento que existe en su extremo N-terminal cuya permanencia va desde un 29,1 % hasta 81,5 %, lo cual promueve un comportamiento estable de P52 caracterizado por sus interacciones hidrofóbicas estables con los *loops* BB del homodímero. Junto con esto, si bien G54 también presenta un comportamiento estable por los puentes de hidrógeno que establece con el *loop* BB de la cadena A, la existencia del puente salino entre R55 y la hélice αA de dicha cadena durante toda la simulación garantiza una estabilidad similar a la observada en pepMAL (tabla 5.10).

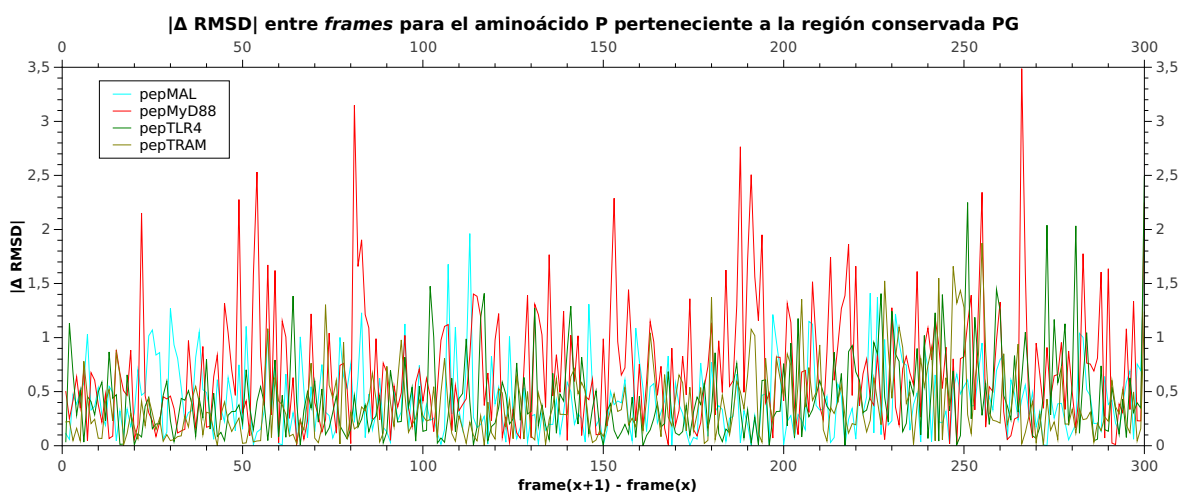


Figura 6.3: $|\Delta\text{RMSD}|$ del aminoácido de prolina conservado en la región PG según péptido de bloqueo

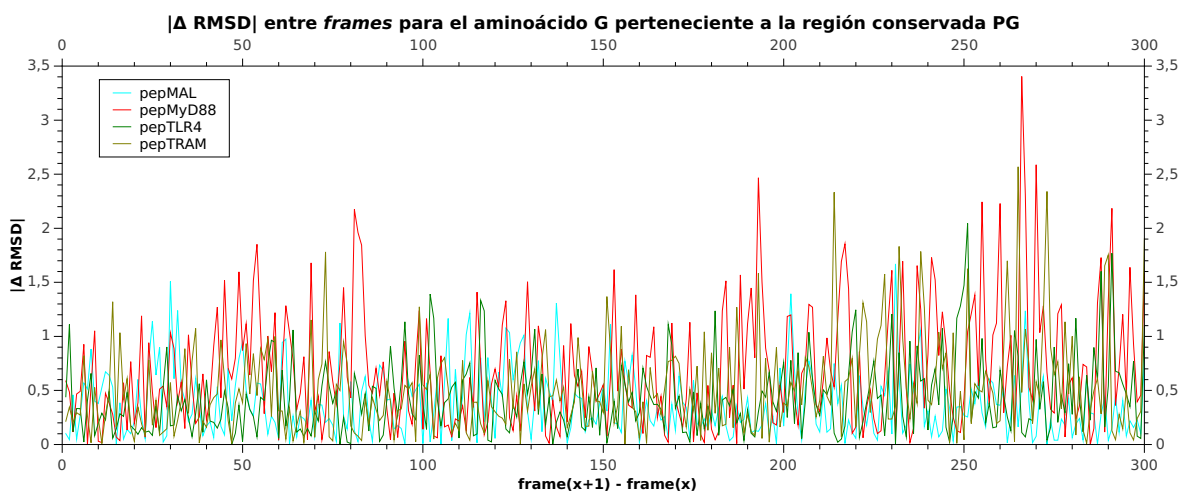


Figura 6.4: $|\Delta\text{RMSD}|$ del aminoácido de glicina conservado en la región PG según péptido de bloqueo

El análisis realizado acerca de la estabilidad de las regiones conservadas RD y PG, junto con los contactos descritos en las tablas 5.7-5.10, sugieren que todos los péptidos de bloqueo, excepto pepMyD88,

presentan un comportamiento estable. Sin embargo, la estabilidad de pepTLR4 está influida principalmente por las interacciones generadas producto de su plegamiento, mientras que pepMAL y pepTRAM muestran estabilidades similares a través de la generación de múltiples interacciones con el homodímero.

En forma complementaria, si bien todos presentan interacciones hidrofóbicas con los *loops* BB del homodímero, pepMAL y pepTRAM presentan adicionalmente puentes de hidrógeno, puentes salinos e interacciones catión- π con aminoácidos de diversas zonas del homodímero que poseen una elevada importancia biológica, siendo mayores en pepMAL tanto en cantidad como en tiempos de permanencia durante las simulaciones de dinámica molecular. A modo de ejemplo, pepMAL y pepTRAM presentan puentes salinos durante prácticamente la totalidad de la simulación, sin embargo, pepMAL presenta dos puentes salinos con la hélice αA de la cadena A (E24 y R28) (tabla 5.7) y pepTRAM sólo uno (E24) con dicha región (tabla 5.10). En el caso de los puentes de hidrógeno, pepTRAM establece sólo uno con el homodímero cuya permanencia alcanza el 32,5% (tabla 5.10), mientras que pepMAL presenta ocho distribuidos entre los *loops* BB, la hélice αA y el *loop* AA presentes en la cadena A cuyas permanencias van desde el 13,9% hasta el 76,5% (tabla 5.7). Finalmente, si bien ambos generan dos interacciones catión- π con el homodímero, su permanencia en pepMAL se observa durante la gran parte de la simulación (tabla 5.7), mientras que pepTRAM sólo las presenta en un intervalo más reducido (tabla 5.10). De esta manera, los resultados obtenidos de la etapa de dinámica molecular indican una mayor interacción de pepMAL y pepTRAM en comparación a pepMyD88 y pepTLR4, sugiriendo que su potencial efecto inhibitorio puede ser jerarquizado como pepMAL > pepTRAM > pepTLR4 > pepMyD88.

Uno de los estudios de Toshchakov *y cols.* [28] establece en forma precisa que el efecto inhibitorio de los péptidos pepMAL, pepMyD88 y pepTRAM puede ser jerarquizado como pepTRAM \approx pepMyD88 > pepMAL. Si bien el análisis previamente realizado parece contradecir *a priori* la evidencia experimental que valida dicho estudio, estas discrepancias pueden ser aclaradas de acuerdo al análisis de sus secuencias. Dado que las pruebas experimentales se realizaron en cultivos celulares de macrófagos peritoneales de ratones C3H/OuJ, no es posible descartar *a priori* diferencias con las secuencias provenientes de humano tanto en los péptidos de bloqueo utilizados como en los receptores TLR4 usadas en este trabajo. Por esta razón, se presentan a continuación los alineamientos correspondientes:

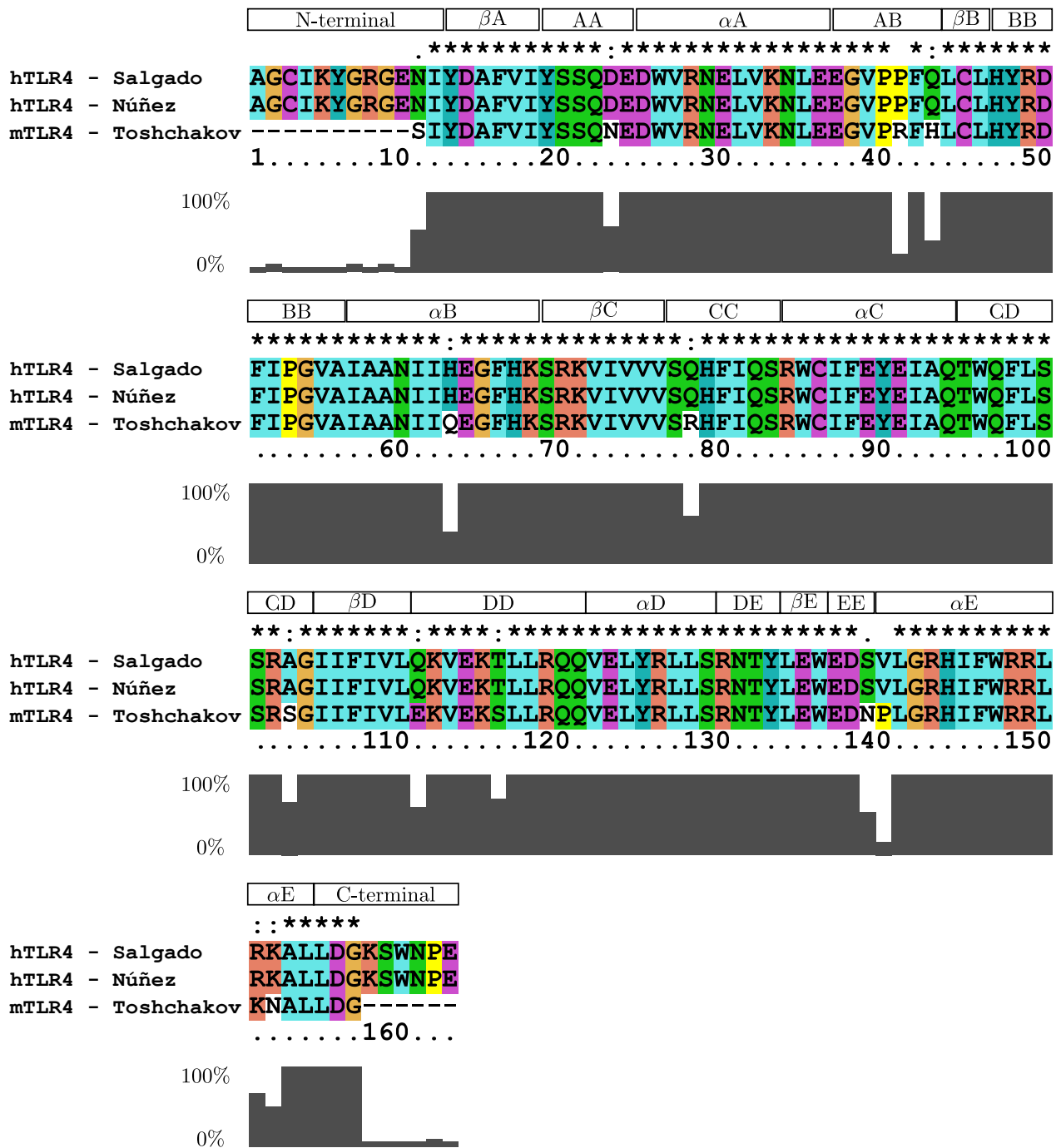


Figura 6.5: Alineamiento de secuencias entre los receptores TLR4 utilizados por Salgado y por Toshchakov llevado a cabo a través del programa Clustal X

Color definidos según programa

Símbolos adicionales indican grados de conservación: * : idénticos; : : sustitución conservada; . : sustitución semi-conservada

Barras señalan conservación del aminoácido en la ubicación correspondiente

Región: N-terminal: extremo N-terminal; XX: *loop* XX; α X: hélice α X; β X: lámina β X; C-terminal: extremo C-terminal

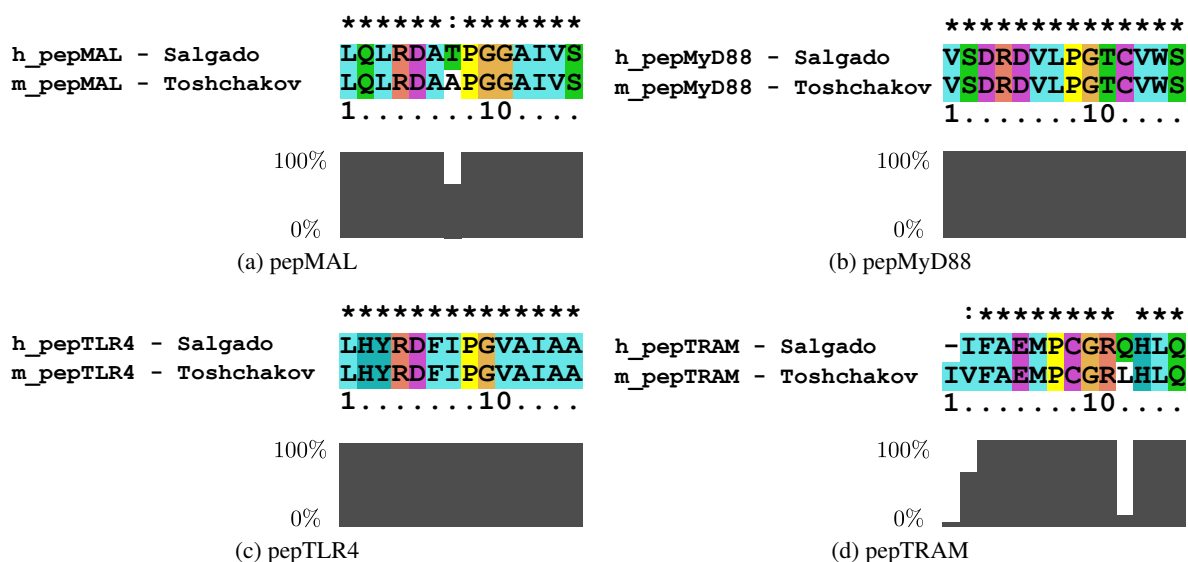


Figura 6.6: Alineamiento de secuencias entre los péptidos de bloqueo diseñados por Salgado y por Toshchakov llevado a cabo a través del programa Clustal X

Color definidos según programa

Símbolos adicionales indican grados de conservación: * : idénticos; : : sustitución conservada; . : sustitución semi-conservada

Barras señalan conservación del aminoácido en la ubicación correspondiente

Tomando como referencia las secuencias utilizadas por Núñez y *cols.* [20], los receptores de TLR4 de humano empleadas en este trabajo son idénticas, mientras que las de ratón presentan un grado de similitud equivalente al 94,2 %, presentando diferencias de carácter puntual en zonas distintas del BB loop (figura 6.5). En cuanto a los péptidos de bloqueo, las secuencias de humano y ratón para pepMyD88 (figura 6.6b) y pepTLR4 (figura 6.6c) son idénticas. No obstante, pepMAL y pepTRAM alcanzan un grado de similitud de 92,9 % y 84,6 % respectivamente. En el caso de pepMAL, la diferencia es de carácter puntual en donde el aminoácido T52 del péptido diseñado por Salgado y *cols.* corresponde a alanina en el estudio de Toshchakov (6.6a). En lo que respecta a pepTRAM, los aminoácidos I47 y Q56 del péptido de bloqueo diseñado por Salgado y *cols.* corresponden a valina y leucina respectivamente en el péptido utilizado por Toshchakov. Además, este último presenta un aminoácido de isoleucina adicional en el extremo N-terminal (figura 6.6d).

De acuerdo a los resultados expuestos, el aminoácido T52 de pepMAL no participa activamente en ningún tipo de interacción con el homodímero ni consigo mismo (tabla 5.7). En el caso de pepTRAM, el aminoácido Q56 cercano al extremo C-terminal no participa activamente en la formación de puentes de hidrógeno (tabla 5.10) ya que se encuentra ubicado cercano a una región altamente hidrofóbica del BB loop de la cadena B del homodímero (V218-A222) durante gran parte de la simulación. Dado que el estudio de Toshchakov y *cols.* [28] no hace mención a la importancia relativa de aminoácidos particulares de sus péptidos de bloqueo, no existe información suficiente para determinar si sus diferencias con respecto a los péptidos diseñado por Salgado y *cols.* son fundamentales en el efecto inhibitorio que producen. Sin embargo, dadas sus características polares y su incapacidad de generar interacciones con el homodímero, los resultados obtenidos sugieren que la presencia de aminoácidos apolares en dichas posiciones de pepMAL y pepTRAM podrían contribuir en su acoplamiento y, en consecuencia, explicar el mayor efecto inhibitorio de pepTRAM descrito por Toshchakov y *cols.* [28]

En el caso de pepMyD88 y pepTLR4, los resultados expuestos en este trabajo y los publicados por Toshchakov y *cols.* [28, 29] no reflejan capacidades inhibitorias similares a pesar de tener

secuencias idénticas. A través de la identificación de sus contactos (tablas 5.8 y 5.9, ambos interactúan predominantemente sobre los *loops* BB del homodímero, región altamente conservada en los receptores TLR4 de humano y ratón (figura 6.5). Según esto, es posible plantear tres posibles hipótesis:

1. Las simulaciones de dinámica molecular obtenidas no poseen la extensión necesaria para extraer información concluyente sobre las interacciones observadas.
2. Existen zonas de interacción distintas de los *loops* BB del homodímero fundamentales en la vía de señalización de los receptores TLR4.
3. Tanto pepMyD88 como pepTLR4 son capaces de unirse a las proteínas adaptadoras MAL y TRAM en vez de unirse directamente sobre los *loops* BB del homodímero, explicando el efecto inhibitorio observado por Toshchakov y cols.

La primera hipótesis mencionada puede ser, en cierta manera, correlacionada con los cálculos de energía libre de unión mediante la metodología MM-PBSA. En efecto, se puede cotejar que los valores alcanzados empleando trayectorias individuales y trayectorias extraídas únicamente de la simulación del complejo correspondiente difieren bastante entre sí (tabla 5.11). La primera estrategia posiciona a pepTRAM como el péptido de bloqueo con el menor grado de efectividad, contradiciendo los resultados de Toshchakov y las interacciones identificadas durante las simulaciones de dinámica molecular que hablan de un alto grado de afinidad de este péptido por los *loops* BB del homodímero. Por su parte, la segunda estrategia guarda una correspondencia clara con las simulaciones de dinámica molecular, no así con los estudios de Toshchakov. En virtud de lo anterior, dado que es el primer estudio de *docking* acoplado con dinámica molecular asociado a este tipo de sistemas biológicos, no es posible descartar *a priori* la necesidad de someter los complejos a tiempos de simulación más extensos que permitan describir en forma más completa su estabilidad, eventuales cambios conformacionales, entre otros eventos de elevada trascendencia.

Con respecto a la segunda hipótesis, suponiendo que los resultados de la dinámica molecular sean suficientes para caracterizar las interacciones entre los péptidos de bloqueo estudiados y el homodímero de TLR4, la evidencia experimental indicada por Toshchakov establecería como posibilidad que las proteínas adaptadoras se acoplan en zonas donde no necesariamente interactúan en forma directa con los *loops* BB del homodímero de TLR4, atribuyéndole importancia exclusivamente en su formación. Sin embargo, esta posibilidad puede ser descartada de acuerdo a la información bibliográfica presentada en el capítulo 3 que, tanto desde una perspectiva experimental como teórica, señalan la importancia de dichas zonas con mayor o menor grado de detalle.

Asumiendo como válida la importancia biológica de los *loops* BB del homodímero en su capacidad de generar una superficie nueva de interacción que permite asociar directamente a las proteínas adaptadoras MAL y TRAM, la tercera hipótesis establece que las discordancias entre los resultados de Toshchakov y los resultados de la dinámica molecular no necesariamente responden a un tiempo de ejecución insuficiente. Tal como ya se mencionó anteriormente, las simulaciones de dinámica molecular se sustentan sobre la base de una conformación inicial, la cual puede ser correcta o incorrecta en lo que respecta al objetivo final de evaluar su grado de interacción con los *loops* BB del homodímero. Sin embargo, si bien Toshchakov sustenta su trabajo en los *loops* BB de diferentes tipos de receptores y proteínas adaptadoras [28, 29], el objetivo final que persigue es evaluar su efectividad como agentes inhibidores de la expresión de citoquinas pro-inflamatorias e interferones. Dicho esto, sus efectos inhibitorios pueden no residir únicamente en su acoplamiento al homodímero de TLR4, sino que pueden atribuirse a la formación de complejos con algunas de las proteínas adaptadoras participantes de las vías de señalización TLR4-TLR4 (MAL, MyD88, TRAM y/o TRIF), explicando así la inhibición de la síntesis de citoquinas pro-inflamatorias de las vías dependiente e independiente de MyD88 en forma simultánea. Siguiendo esta idea, dado que no se realizaron simulaciones

partiendo de las estructuras de las proteínas adaptadoras MyD88, MAL y TRAM, no es posible descartar *a priori* la posibilidad de que dichos péptidos de bloqueo ejerzan su acción sobre dichas estructuras.

Un antecedente importante está dado por el trabajo de Rossel y *cols.* [102] que, además de realizar el acoplamiento del homodímero de TLR4 con las proteínas adaptadoras MAL y TRAM, realiza simulaciones de dinámica molecular utilizando una metodología idéntica a la utilizada en este trabajo. A la fecha, es el único trabajo que emplea esta técnica en conjunto con los *plugins* compatibles con VMD desarrollados durante el progreso de este trabajo para determinar las clases de contactos existentes. El apoyo suministrado por este estudio es trascendental para apoyar las hipótesis expuestas anteriormente.

Tal como queda expuesto en las tablas 6.1 y 6.2, MAL interactúa a través de su hélice α B, *loop* BB y *loop* CD con el *loop* BB y la hélice α B de TLR4. Por su parte, TRAM interactúa con la hélice α A y el *loop* BB de TLR4 mediante sus *loops* AB y BB.

Tabla 6.1: Interacciones descritas para el complejo TLR4-MAL

PUENTES DE HIDRÓGENO						
N° AA	Nombre AA	Cadena / Región	N° AA	Nombre AA	Cadena / Región	Permanencia
9	GLY	A / N-t	93	THR	G / CD	57,8%
68	LYS	A / α B	62	GLN	G / α B	56,5%
191	ARG	B / α A	35	GLU	G / α A	41,9%
185	GLN	B / AA	40	SER	G / AB	36,5%
63	HIS	A / α B	10	SER	G / N-t	29,6%
8	ARG	A / N-t	94	GLU	G / CD	20,9%
INTERACCIONES HIDROFÓBICAS						
N° AA	Nombre AA	Cadena / Región	N° AA	Nombre AA	Cadena / Región	Permanencia
52	ILE	A / BB	52	PRO	G / BB	90,70%
167	ILE	B / N-t	92	LEU	G / α C	80,5%
12	ILE	A / N-t	57	VAL	G / α B	69,9%

Cadena: A: cadena A homodímero TLR4; B: cadena B homodímero TLR4; G: MAL

Región: N-t: extremo N-terminal; XX: *loop* XX; α X: hélice α X; β X: lámina β X; C-t: extremo C-terminal

Tabla 6.2: Interacciones descritas para el complejo TLR4-TRAM

PUENTES DE HIDRÓGENO						
N° AA	Nombre AA	Cadena / Región	N° AA	Nombre AA	Cadena / Región	Permanencia
82	GLN	A / CC	43	LYS	H / AB	60,4%
56	ALA	A / BB	54	GLY	H / BB	58,8%
326	GLU	B / C-t	99	ARG	H / CD	50,2%
322	SER	B / C-t	95	ASN	H / CD	46,5%
21	SER	A / AA	49	ALA	H / BB	43,2%
22	GLN	A / AA	50	GLU	H / BB	37,2%
64	GLU	A / α B	59	GLN	H / α B	36,9%
78	GLN	A / CC	43	LYS	H / AB	31,6%
173	GLU	B / N-t	95	ASN	H / CD	30,9%
324	ASN	B / C-t	95	ASN	H / CD	28,6%
324	ASN	B / C-t	92	SER	H / CD	21,9%
INTERACCIONES HIDROFÓBICAS						
N° AA	Nombre AA	Cadena / Región	N° AA	Nombre AA	Cadena / Región	Permanencia
219	ALA	B / BB	52	PRO	H / BB	73,2%
INTERACCIONES CATION-PI						
N° AA	Nombre AA	Cadena	N° AA	Nombre AA	Cadena	Permanencia
79	HIS	A / CC	43	LYS	H / AB	70,2%
79	HIS	A / CC	14	PHE	H / N-t	63,2%
79	HIS	A / CC	14	PHE	H / N-t	33,4%
226	HIS	B / α B	55	ARG	H / BB	28,8%

Cadena: A: cadena A homodímero TLR4; B: cadena B homodímero TLR4; H: TRAM
 Región: N-t: extremo N-terminal; XX: *loop* XX; α X: hélice α X; β X: lámina β X; C-t: extremo C-terminal

Según las interacciones específicas detalladas en las tablas 6.1 y 6.2, la efectividad de los péptidos de bloqueo probados en este estudio está supeditado a su interacción con los aminoácidos de TLR4 involucrados en la asociación del homodímero con las proteínas adaptadoras MAL y TRAM, lo cual está descrito en las tablas 6.3 y 6.2.

Tabla 6.3: Similitud entre los contactos identificados para los complejos TLR4-MAL y TLR4-péptido

pepMAL										
Aminoácido participante según Rossel [102]			Contacto identificado con péptido de bloqueo						Comparación con contacto de Rossel [102]	
N° AA	AA	Cadena / Región	N° AA	AA	Cadena / Región	N° AA	AA	Cadena / Región	Permanencia	
52	ILE	A / BB	215	ILE	B / BB	47	LEU	T	56,3%	Análogo
191	ARG	B / α A	28	ARG	A / α A	49	ASP	T	77,5%	Análogo
pepMyD88										
Aminoácido participante según Rossel [102]			Contacto identificado con péptido de bloqueo						Comparación con contacto de Rossel [102]	
N° AA	AA	Cadena / Región	N° AA	AA	Cadena / Región	N° AA	AA	Cadena / Región	Permanencia	
52	ILE	A / BB	215	ILE	B / BB	52	LEU	T	62,6%	Análogo
52	ILE	A / BB	215	ILE	B / BB	53	PRO	T	50,7%	Análogo
52	ILE	A / BB	215	ILE	B / BB	58	TRP	T	17,9%	Análogo
52	ILE	A / BB	51	PHE	A / BB	49	ARG	T	26,8%	Cercano al original
52	ILE	A / BB	53	PRO	A / BB	46	VAL	T	16,2%	Cercano al original
185	GLN	B / AA	21	SER	A / AA	56	CYS	T	18,2%	Cercano al original
pepTLR4										
Aminoácido participante según Rossel [102]			Contacto identificado con péptido de bloqueo						Comparación con contacto de Rossel [102]	
N° AA	AA	Cadena / Región	N° AA	AA	Cadena / Región	N° AA	AA	Cadena / Región	Permanencia	
63	HIS	A / α B	226	HIS	B / α B	51	PHE	T	49,0%	Análogo
pepTRAM										
Aminoácido participante según Rossel [102]			Contacto identificado con péptido de bloqueo						Comparación con contacto de Rossel [102]	
N° AA	AA	Cadena / Región	N° AA	AA	Cadena / Región	N° AA	AA	Cadena / Región	Permanencia	
52	ILE	A / BB	215	ILE	B / BB	47	ILE	T	70,9%	Análogo
52	ILE	A / BB	215	ILE	B / BB	48	PHE	T	70,5%	Análogo
52	ILE	A / BB	216	PRO	B / BB	52	PRO	T	21,9%	Cercano al análogo
52	ILE	A / BB	216	PRO	B / BB	48	PHE	T	11,9%	Cercano al análogo

Cadena: A: cadena A homodímero TLR4; B: cadena B homodímero TLR4; T: péptido de bloqueo
 Región: N-t: extremo N-terminal; XX: *loop* XX; α X: hélice α X; β X: lámina β X; C-t: extremo C-terminal

Tabla 6.4: Similitud entre los contactos identificados para los complejos TLR4-TRAM y TLR4-péptido

pepMAL										
Aminoácido participante según Rossel [102]			Contacto identificado con péptido de bloqueo						Comparación con contacto de Rossel [102]	
N° AA	AA	Cadena / Región	N° AA	AA	Cadena / Región	N° AA	AA	Cadena / Región	Permanencia	
219	ALA	B / BB	218	VAL	B / BB	47	LEU	T	66,6%	Cercano al original
pepMyD88										
Aminoácido participante según Rossel [102]			Contacto identificado con péptido de bloqueo						Comparación con contacto de Rossel [102]	
N° AA	AA	Cadena / Región	N° AA	AA	Cadena / Región	N° AA	AA	Cadena / Región	Permanencia	
21	SER	A / AA	21	SER	A / AA	56	CYS	T	16,2%	Contacto explícito
219	ALA	B / BB	218	VAL	B / BB	58	TRP	T	99,7%	Cercano al original
219	ALA	B / BB	218	VAL	B / BB	52	LEU	T	97,0%	Cercano al original
219	ALA	B / BB	218	VAL	B / BB	53	PRO	T	35,8%	Cercano al original
22	GLN	A / AA	21	SER	A / AA	56	CYS	T	18,2%	Cercano al original
226	HIS	B / α B	227	GLU	B / α B	58	TRP	T	18,2%	Cercano al original
pepTLR4										
Aminoácido participante según Rossel [102]			Contacto identificado con péptido de bloqueo						Comparación con contacto de Rossel [102]	
N° AA	AA	Cadena / Región	N° AA	AA	Cadena / Región	N° AA	AA	Cadena / Región	Permanencia	
219	ALA	B / BB	219	ALA	B / BB	55	VAL	T	60,3%	Contacto explícito
219	ALA	B / BB	219	ALA	B / BB	53	PRO	T	12,6%	Contacto explícito
219	ALA	B / BB	219	ALA	B / BB	56	ALA	T	11,3%	Contacto explícito
226	HIS	B / α B	226	HIS	B / α B	51	PHE	T	49,0%	Contacto explícito
pepTRAM										
Aminoácido participante según Rossel [102]			Contacto identificado con péptido de bloqueo						Comparación con contacto de Rossel [102]	
N° AA	AA	Cadena / Región	N° AA	AA	Cadena / Región	N° AA	AA	Cadena / Región	Permanencia	
219	ALA	B / BB	218	VAL	B / BB	47	ILE	T	56,3%	Cercano al original

Cadena: A: cadena A homodímero TLR4; B: cadena B homodímero TLR4; T: péptido de bloqueo
 Región: N-t: extremo N-terminal; XX: *loop* XX; α X: hélice α X; β X: lámina β X; C-t: extremo C-terminal

Las tablas 6.3 y 6.4 dejan de manifiesto una situación clave ligada a la conformación del homodímero de TLR4. De acuerdo a los estudios de modelamiento, este complejo presenta una simetría axial que permitiría el acoplamiento de las proteínas adaptadoras MAL y TRAM en regiones análogas de ambas cadenas del homodímero. Los antecedentes presentados en este informe indican que MAL y TRAM presentan sitios de interacción similares [20], información cotejada exitosamente con el trabajo de Rossel y *cols.* [102]. A pesar de evidenciar contactos diferentes entre ambos estudios, la importancia de los *loops* BB del homodímero es un elemento común entre sí determinada en virtud del SASA de los aminoácidos participantes [20] y con una definición de mayor precisión basada en distancias interatómicas y criterios geométricos [102]. Según esto, los sitios de interacción de los péptidos de bloqueo y las proteínas adaptadoras [102] con el homodímero no necesariamente se dan sólo en los sitios identificados de una cadena particular a través de la dinámica molecular, sino que podrían generarse en los residuos análogos de la cadena contraria.

En el caso del complejo TLR4-MAL (tabla 6.1), el residuo I52 perteneciente al *loop* BB de TLR4 establece una interacción permanente con el residuo P52 de MAL. Teniendo en consideración que la mutación de I52 por alanina repercute en la pérdida total de la señalización [20], la acción de dicho aminoácido en la estabilidad del complejo es trascendental. El residuo análogo a I52 perteneciente a la cadena A del homodímero corresponde a I215 inserto en la cadena B. Como es posible notar en la tabla 6.3, los péptidos de bloqueo pepMAL, pepMyD88 y pepTRAM son capaces de establecer interacciones caracterizadas por un alto porcentaje de permanencia con I215, lo cual establece un precedente importante en cómo estos péptidos interactúan con el homodímero pudiendo bloquear la vía de señalización y la generación de la respuesta inflamatoria como lo plantea Toshchakov y *cols.* [28]

En el caso del complejo TLR4-TRAM (tabla 6.4), los residuos de alanina presentes en los *loops* BB del homodímero (A56 y A219) establecen interacciones de alto porcentaje de permanencia con los residuos G54 y P52 de TRAM. Al igual que en el caso de TLR4-MAL, los estudios de mutaciones de dichos residuos del *loop* BB derivan en la pérdida total de la señalización y, por lo tanto, su presencia es fundamental [20]. Tal como se indica en la tabla 6.4, pepTLR4 presenta contactos de permanencia media y leve con A219 que podrían atribuir el efecto inhibitorio demostrado por Toshchakov y *cols.* para dicho péptido. Si bien ninguno de los péptidos de bloqueo restantes presenta interacción directa con A56 o A219, sí son capaces de hacerlo con V218 en diferentes niveles de permanencia. La justificación tras la identificación de contactos en sitios adyacentes a los descritos por Rossel y *cols.* puede estar asociada a los criterios de distancia establecidos para la determinación de cada una de las clases de interacciones consideradas en este trabajo.

De esta forma, en virtud de lo presentado por el trabajo de Rossel y *cols.* [102], los contactos observados en la interacción de los péptidos de bloqueo con el homodímero de TLR4 son consistentes con los descritos para MAL y TRAM, lo cual permite respaldar su acción como agentes inhibidores potenciales de las vías de señalización celular TLR4-TLR4.

6.3. Análisis de las herramientas de dinámica molecular

La información presentada acerca del modelamiento y descripción de las interacciones mediante el uso de campos de fuerza, junto con el modelamiento de los movimientos atómicos de acuerdo a las ecuaciones clásicas de Newton, no está exento de apreciaciones. La gran mayoría de los campos de fuerza, incluidos AMBER99SB, aproximan las interacciones mecánico-cuánticas definidas por funciones probabilísticas según un modelamiento basado en interacciones de átomos enlazados y no enlazados. Los enlaces químicos y los ángulos planos son modelados como resortes simples virtuales, mientras que los ángulos dihedros son modelados usando funciones sinusoidales que aproximan las diferencias de energía entre las conformaciones eclipsadas y alternadas. Por su parte, las fuerzas de no-enlace surgen debido a las interacciones de Van der Waals modeladas como potencial de Lennard-Jones 6-12 y las interacciones electrostáticas modeladas

usando las leyes de Coulomb. Para poder reproducir el comportamiento real de las moléculas en movimiento, los términos de energía descritos son parametrizados para calzar con los cálculos mecánico-cuánticos y los datos experimentales. Entre otros, destacan la rigidez y longitud de los resortes que describen los enlaces químicos y los ángulos atómicos, las cargas atómicas parciales usadas para calcular las energías provenientes de las interacciones electrostáticas y los radios de Van der Waals apropiados. Estos, en su conjunto, definen lo que se conoce como campo de fuerza ya que describen la contribución de varias fuerzas atómicas que rigen la dinámica molecular.

A pesar de sus capacidades y amplia utilización, los campos de fuerza usados son aproximaciones de la realidad mecánico-cuántica que reina en el régimen atómico y, en consecuencia, presentan debilidades asociadas a fenómenos en donde los efectos cuánticos inciden notoriamente en los resultados. La polarización electrónica, causada por el flujo de electrones de un núcleo atómico a otro entre grupos de átomos que están unidos químicamente, es otro efecto mecánico-cuántico que, salvo algunas excepciones, es generalmente ignorado. En las simulaciones clásicas de dinámica molecular, cada átomo tiene asignado una carga parcial fijada previo a que la simulación comience. Sin embargo, la realidad muestra que las nubes de electrones que rodean los átomos están cambiando constantemente de acuerdo al medio, pudiendo estar mejor representadas las cargas parciales de los átomos como dinámicas.

Además de negar los efectos mecánico-cuánticos, los estudios de dinámica molecular están limitados por las pequeñas escalas de tiempo simuladas típicamente. Para reproducir propiedades termodinámicas y/o elucidar completamente todos los sitios de acoplamiento relevantes para el diseño de drogas, todos los estados conformacionales de la proteína deben ser explorados por la simulación. Desafortunadamente, muchos procesos bioquímicos tales como los cambios conformacionales del receptor relevantes para la unión de drogas ocurren en escalas de tiempo que son mayores a las posibles de simular. Un número de soluciones para este desafío han visto un uso limitado. Por ejemplo, en la dinámica molecular acelerada (aMD), las grandes barreras energéticas son reducidas artificialmente. A pesar de que este proceso inevitablemente introduce algunos artefactos, permite a las proteínas cambiar entre conformaciones que no serían accesibles dadas las escalas de tiempo de la dinámica molecular convencional. Estas nuevas conformaciones identificadas pueden ser estudiadas posteriormente usando la dinámica molecular clásica u otras técnicas.

Si bien hubiese sido ideal la realización de un muestreo conformacional, esto no fue considerado dentro del protocolo de dinámica molecular establecido para este trabajo debido al carácter limitado de los recursos computacionales disponibles. En efecto, las simulaciones se llevaron a cabo en el cluster ".Eo>wyn" del Laboratorio de Modelamiento de Procesos y Computación Distribuida del Departamento de Ingeniería Química y Biotecnología de la Universidad de Chile donde se desarrollan paralelamente múltiples trabajos de investigación que requieren la ejecución de cálculos de alta complejidad para su desarrollo. Si bien existe un sistema de colas gestionado a través del *software* Condor, la disponibilidad de nodos para las simulaciones requeridas en este trabajo nunca fue superior a ocho de un total de setenta y dos. De esta manera, el protocolo de dinámica molecular correspondiente a simulaciones de seis nanosegundos considerando pasos de dos femtosegundos demoraron un tiempo máximo de cinco días y quince horas correspondiente a los complejos receptor-ligando.

Adicionalmente, lo mencionado anteriormente está ligado directamente con las capacidades que posee el *software* GROMACS para efectuar un muestreo conformacional basada en la aplicación de REMD. En primer lugar, esta técnica se basa en la realización de réplicas a diferentes temperaturas determinadas según una distribución exponencial. Dentro de las especificaciones de GROMACS, la cantidad total de nodos requeridos debe ser un múltiplo del número de réplicas. Esto hubiese significado que, bajo las condiciones en que se llevó a cabo el protocolo planteado en este trabajo, se podrían haber ejecutado un máximo de ocho réplicas en el que cada una de ellas hubiese usado un solo nodo. Bajo tales circunstancias, cada réplica habría demorado un tiempo máximo de un mes y medio aproximadamente en completarse manteniendo la extensión y paso de tiempo especificados en el protocolo, lo cual habría sido incompatible con los plazos

destinados para el desarrollo de este trabajo.

6.4. Cálculo de energía libre de unión

Este trabajo presenta los resultados extraídos a partir de dos enfoques correspondientes a la utilización de trayectorias independientes y trayectorias extraídas a partir de una única simulación del complejo proteína-ligando para calcular la energía libre de unión. La aplicación de la metodología MM-PBSA está estrictamente vinculada a los resultados de la dinámica molecular. Al ser una metodología de cálculo *ex-post*, requiere en primer término una selección precisa de los *frames* extraídos de la trayectoria ya que es necesario contar con información sobre la estructura proteica simulada estabilizada, es decir, en la que haya superado las fases de equilibrio, presente una estructura estable en el tiempo y que esta última sea representativa del fenómeno biológico que se busca observar.

En directa relación con lo expuesto anteriormente, las figuras 5.11-5.13 dejan de manifiesto varios aspectos importantes que conducen a la obtención de valores sesgados de energía libre de unión. En primer lugar, la extensión de las simulaciones de dinámica molecular no fue suficiente ya que no permitió alcanzar valores de RMSD estables para los péptidos en solitario (figura 5.13) y el homodímero en ninguno de sus escenarios posibles (figuras 5.11 y 5.12). Según esto, la realización de los cálculos de energía libre con estos datos trajo consigo errores importantes que quedan en evidencia con la discrepancia que existe entre ambas estrategias en la estimación de G_{Ligando} (tablas 5.12-5.19).

De acuerdo a la figura 5.13, es posible interpretar que los péptidos de bloqueo experimentan grandes cambios conformacionales previo a su acoplamiento al homodímero, momento a partir del cual su comportamiento se hace más estable. En consecuencia, la estrategia de trayectorias independientes resulta ser más adecuada para la estimación de la variación de energía libre debido a la existencia de alteraciones importantes en la estructura del ligando. A pesar de lo anterior, los cálculos realizados según esta estrategia establecen que pepTLR4 presenta la mayor afinidad con el homodímero (tabla 5.11), lo cual contradice la jerarquización elaborada a partir del análisis de contactos (pepMAL > pepTRAM > pepTLR4 > pepMyD88). Por otro lado, si bien la estrategia de trayectoria única concuerda con dicha jerarquización en términos relativos (tabla 5.11), no es factible considerarla válida debido al comportamiento radicalmente distinto de los péptidos de bloqueo estando en solitario y acoplados al homodímero.

En consecuencia, una de las debilidades que se pudo identificar dentro del protocolo de dinámica molecular fue la elección de tiempos de simulación iguales para los complejos, péptidos de bloqueo y homodímero utilizados. En efecto, la tendencia observada en los valores de RMSD del homodímero y los ligandos señala que la estabilización de sus estructuras se dan en escalas de tiempo diferentes.

6.5. Análisis de la metodología MM-PBSA

La evidencia expuesta en este trabajo deja de manifiesto que la extensión insuficiente de las simulaciones de dinámica molecular derivó en estimaciones de variación de energía libre que, en el caso de la estrategia de múltiples trayectorias, contradecían el análisis de contactos en forma categórica. Junto con esto, los grandes cambios conformacionales que sufren los ligandos en sus trayectorias en solitario hacen incompatible su estimación siguiendo una estrategia basada únicamente en la información entregada por la trayectoria del complejo. Si bien esta última derivó en la obtención de $\Delta G_{\text{Solv, Unión}}$ consistentes con la jerarquización relativa del potencial efecto inhibitorio de los péptidos empleados en este trabajo, sus valores absolutos sugieren que su acoplamiento al homodímero no es factible desde una perspectiva termodinámica, lo cual contradice las conclusiones que presenta Toshchakov y *cols.* en sus investigaciones. [28, 29]

Los resultados presentados en la sección 5.4.2 dan cuenta de que los valores consolidados (tabla 5.11) como su detalle según complejo y estrategia de cálculo utilizados (tablas 5.12-5.19) guardan relación con los fenómenos biológicos observados en las trayectorias de dinámica molecular. No obstante, a pesar de las diferencias que existen con otros sistemas bioquímicos en los que se ha aplicado la metodología MM-PBSA, el análisis individual de los valores calculados tienen una magnitud varios órdenes superior a dichos resultados. Adicionalmente, si bien existen estudios en que esta técnica ha permitido la obtención de valores de variación de energía libre cercanos a los declarados experimentalmente, los resultados en múltiples sistemas son coincidentes con la idea de que esta técnica tiene una utilidad acotada a la jerarquización relativa de un conjunto de ligandos.

La forma en que fueron establecidas las energías de enlace (E_{Int}) y no enlace correspondientes a las energías electrostáticas (E_{Coul}) y de Van der Waals (E_{vdW}) son totalmente dependientes del campo de fuerzas elegido. Sin embargo, la forma en que se realiza su cálculo en cada *frame* de las simulaciones está asociada a los métodos establecidos en sus archivos de configuración. Específicamente, los algoritmos de estabilización de presión y temperatura funcionaron adecuadamente en el mantenimiento de dichas variables dentro de un rango normal según sus desarrolladores. En este sentido, aspectos tales como los métodos de cálculo de las interacciones de Coulomb (PME-Switch) y de Van der Waals (Shift) basados en radios de corte y búsqueda discreta de átomos vecinos cada ciertos frames resultan fundamentales en la descripción de los movimientos del sistema y la posterior estimación de estas energías. En el caso particular de los péptidos simulados en solitario, los grandes cambios conformacionales que experimentan (figuras 5.13a-5.13d) pueden estar ligados a una parametrización insuficiente de la búsqueda de átomos vecinos. En relación a las trayectorias del homodímero (figura 5.12), los cambios conformacionales se dan en forma atenuada durante escalas de tiempo mayores, haciendo innecesaria la modificación de dichos parámetros.

Los resultados obtenidos señalan que todas las tablas de energía en las que se emplea la estrategia de trayectoria única (tablas 5.13, 5.15, 5.17 y 5.19) muestran valores de ΔE_{Int} distintos de cero. Desde una perspectiva teórica, dado que la energía interna está asociada a los enlaces, ángulos planos y ángulos dihedros, la utilización de una única trayectoria como fuente de información para sus componentes implica que ΔE_{Int} debiera ser cero, lo cual no se observa en los cálculos realizados. De esta forma, existe un margen de error de 80 [kJ/mol] aproximadamente en la estimación de $\Delta G_{\text{unión,solv}}$, cantidad de energía suficiente para revertir la factibilidad termodinámica de los complejos simulados.

En el caso del cálculo de energía libre de solvatación (ΔG_{Solv}), su componente no polar ($\Delta G_{\text{Solv,NP}}$) considera una relación lineal con el área accesible al solvente (SASA) dependiente del radio de las moléculas de agua definidos para recorrer su superficie. El cálculo de su componente polar ($\Delta G_{\text{Solv,P}}$), establecida por el programa APBS, considera varios parámetros entre los que destacan la definición del radio de las moléculas de agua que definen la superficie, la concentración de iones del medio, constantes dieléctricas del solvente y de la estructura proteica simulada, discretización del espacio para la resolución de la ecuación no lineal de Poisson-Boltzmann, asignación de cargas puntuales fijas, entre otros. Al comparar los valores de energía obtenidos para cada uno de los péptidos de bloqueo por ambas estrategias (tabla 5.11), resulta evidente que la determinación de valores de variación de energía libre de unión ($\Delta G_{\text{unión,solv}}$) tan disímiles está asociado a la estimación de $\Delta G_{\text{Solv,P}}$. Dado el efecto estabilizador del homodímero sobre el comportamiento dinámico de los péptidos de bloqueo, la determinación de la superficie del sistema proteico definida de acuerdo al radio de moléculas de agua, factor clave en el resultado del potencial electrostático, es uno de los motivos principales de las diferencias observadas. Las trayectorias extraídas desde la simulación del complejo no muestran el colapso que se observa en los péptidos de bloqueo simulados en solitario, aspecto que reduce notoriamente la superficie del sistema y, en consecuencia, deriva en diferencias que van desde 20 [kcal/mol] en el caso de pepTRAM hasta 180[kcal/mol] para pepTLR4. En todos los casos, las diferencias son suficientes para revertir la condición termodinámica del complejo con lo cual su estimación correcta resulta fundamental.

Paralelamente, las incongruencias evidentes en los valores de $\Delta G_{\text{unión,solv}}$ están asociadas a una

estimación incorrecta de la entropía de cada uno de los sistemas (-TΔS). Durante el desarrollo de este trabajo, se aplicaron dos metodologías diferentes para estimar dichos valores basadas en la utilización de valores y vectores propios obtenidos de la matriz de covarianzas (quasi-armónico) o de la matriz Hessiana (modos normales).

Es importante mencionar que el cálculo de la entropía conformacional por la aproximación quasi-armónica representa una cota superior para la entropía real del sistema, es decir, corresponde a un valor sobreestimado de dicha variable. Suponiendo un factor empírico de 0,65 que pondere dicho valor de entropía, los valores de energía libre finales alcanzados son coherentes con la observación de constantes de afinidad alcanzados para otras clases de sistemas biológicos, sin embargo, tal factor es definido arbitrariamente, lo cual puede introducir un sesgo notorio en la interpretación de los resultados.

A diferencia del enfoque quasi-armónico, en este trabajo se aplicó la técnica de modos normales sólo sobre la estructura final de cada una de las trayectorias de simulación. A pesar de que se suelen reportar valores promedios de entropía vibracional utilizando una cierta cantidad de *frames* de la trayectoria de simulación, el tiempo requerido para alcanzar una minimización exhaustiva es dependiente del tamaño de los sistemas. En este sentido, los tiempos destinados para minimizar una mayor cantidad de conformaciones dentro de la trayectoria de simulación, específicamente para los complejos proteína-ligando, sería considerablemente alto dados los recursos computacionales disponibles. A pesar de lo anterior, utilizar sólo una conformación para realizar el cálculo de los modos normales y obtener, a partir de ellos, un valor de entropía vibracional representativo del fenómeno biológico observado no es posible. Dada la existencia de múltiples mínimos locales, no es posible garantizar que la utilización de una mayor cantidad de conformaciones deriven en la obtención del mismo mínimo local identificado para el último *frame*.

En consecuencia, ninguno de los métodos empleados para estimar la variación de entropía del sistema entrega resultados precisos. Desde un punto de vista teórico, estos métodos corresponden a una aproximación matemática de un proceso de cálculo de elevada complejidad que requiere de una menor cantidad de recursos computacionales para su cálculo. Sin embargo, las debilidades que presentan ha contribuido al avance de nuevos estudios que buscan solucionar estas imprecisiones.

6.6. Discusiones finales

El trabajo realizado ha involucrado la utilización de diversas herramientas computacionales que van desde el alineamiento de secuencias para la identificación de sitios conservados hasta la estimación de la variación de energía libre en base a la información contenida en diversas trayectorias de dinámica molecular.

La metodología aplicada en el desarrollo de este trabajo también fue utilizada paralelamente en los estudios realizados por Rossel y cols. [102] cuyos resultados lograron reproducir satisfactoriamente evidencia experimental acerca de los sitios de acoplamiento de las proteínas MAL y TRAM con el homodímero de TLR4 [20, 56]. En lo que concierne al trabajo realizado, las herramientas de *docking* lograron identificar en forma preliminar conformaciones que presentaron interacciones hidrofóbicas y puentes de hidrógeno eventuales entre los péptidos de bloqueo y el homodímero de TLR4, las cuales a través del análisis de contactos descritos mediante dinámica molecular pudieron ser refinados. En consecuencia, a partir de algoritmos de acoplamiento que permiten identificar rápidamente conformaciones estables de un complejo, es posible realizar un estudio acabado acerca de su comportamiento dinámico bajo condiciones similares a las que rigen en el medio intracelular.

De esta manera, a pesar de las debilidades y aproximaciones mencionadas en las secciones anteriores que consideran cada una de las herramientas utilizadas, su empleo secuencial permitió la constitución de una metodología costo-efectiva que permite, dentro de intervalos de tiempo acotados, identificar en forma

sustantiva el grado de interacción proteína-ligando a través de los contactos que se establecen entre sí y comparar la afinidad de varios ligandos sobre una molécula objetivo, lo cual permite generar información importante acerca de sus patrones de interacción para el diseño posterior de nuevas moléculas con mayor capacidad de acoplamiento, aspecto fundamental para la generación de nuevos agentes terapéuticos orientados al tratamiento de patologías inflamatorias.

Capítulo 7

Conclusiones

Los estudios realizados en el desarrollo de este trabajo estuvieron orientados al cumplimiento de los objetivos planteados (sección 2). Desde una perspectiva general, se puede establecer que se cumplió en forma satisfactoria con la comprensión de los mecanismos fisicoquímicos involucrados en el funcionamiento de los péptidos de bloqueo basados en los *loops* BB de los receptores TLR4 y las proteínas adaptadoras MAL, MyD88 y TRAM. A través de la aplicación de una metodología costo-efectiva cuyos ejes principales están ligados al uso de herramientas de *docking* y dinámica molecular acopladas a un análisis de factibilidad termodinámica basado en la estimación de la variación de energía libre, fue posible esclarecer que estos péptidos tienen la capacidad de interactuar con mayor o menor afinidad en sitios del homodímero correspondientes a zonas de interacción con las proteínas adaptadoras MAL y TRAM, elementos indispensables en las vías de señalización independiente y dependiente de MyD88.

Adicionalmente, es importante destacar que, a excepción del trabajo realizado paralelamente por Rossel y cols. [102] relacionado con la descripción de las vías de señalización TLR4-TLR4, no se han reportado a la fecha estudios que utilicen de manera integral las herramientas computacionales mencionadas en sistemas biológicos similares a los considerados en este trabajo. De esta forma, su implementación exitosa permite concluir que su aplicabilidad en otros escenarios es factible, lo cual abre nuevas perspectivas hacia un desarrollo más profundo de los estudios *in silico* de otros fenómenos bioquímicos tales como la caracterización de nuevas drogas para el tratamiento de patologías inflamatorias.

A pesar de las virtudes que presenta la metodología, es importante establecer conclusiones acerca de los alcances individuales de las herramientas involucradas. En primer lugar, la utilización del *software* ClustalX para la realización de los múltiples estudios de alineamiento considerados en este trabajo permitió identificar el grado de conservación de los péptidos considerados, lo cual permitió validar su consideración en los estudios posteriores. Adicionalmente, la comparación realizada contra los péptidos de bloqueo usados por Toshchakov y cols. [28, 29] vinculada al análisis de contactos obtenidos de las trayectorias de dinámica molecular permitió establecer nuevas hipótesis acerca del bloqueo de las vías de señalización a través de la interacción de estos ligandos con las proteínas adaptadoras.

Por su parte, la utilización del programa de *docking* Vina acopladas a la identificación de contactos basados en la superficie accesible al solvente a través de NACCESS permitió establecer contactos preliminares que dieron cuenta de una participación de los *loops* BB del homodímero en la formación de los complejos. A pesar de lograr resultados importantes en intervalos de tiempo pequeños, sus capacidades se ven limitadas debido al margen de error asociado a la estimación de su energía de unión que impide

una discriminación clara de la conformación más estable. Según esto, es posible concluir que la evidencia experimental es un elemento clave a considerar en la elección de una conformación determinada a través de algoritmos de *docking*. En relación a los contactos establecidos bajo el criterio de SASA, su clasificación posterior según tipo de interacción debe ser considerada sólo como información referencial ya que Vina establece sus estados conformacionales en base a sus átomos pesados, ubicación aleatoria de los átomos de hidrógeno y representaciones lineales de las interacciones hidrofóbicas y puentes de hidrógeno, criterios empíricos que distan de la fenomenología asociada.

Otro aspecto clave en la obtención de los resultados expuestos está íntimamente ligada a los modelos tridimensionales de las estructuras proteicas. Este trabajo consideró flexibilidad limitada sobre los péptidos de bloqueo y rigidez total del homodímero en la realización del acoplamiento. Según esto, las conformaciones proteína-ligando con que se inicia el protocolo de dinámica molecular presentan un sesgo importante por cuanto dependen de su calidad estructural individual. De igual manera, estos también afectan en los resultados de la dinámica molecular ya que, si bien los ligandos presentan mayor libertad de movimiento, la estructura del homodímero no experimenta grandes cambios conformacionales durante el transcurso de las simulaciones. En este sentido, es posible concluir que la calidad estructural del homodímero de TLR4 y los péptidos, modelos elaborados por Salgado y cols. mediante estudios de homología, permitió la obtención de información confiable de los contactos determinadas a través de la dinámica molecular.

El estudio de las trayectorias obtenidas a través de los *plugins* diseñados para clasificar los tipos de contactos resultó fundamental en la descripción de los patrones de interacción cuyo detalle está contenido en la sección 6.2. Sin embargo, es importante mencionar que el comportamiento de los péptidos de bloqueo está fuertemente influenciado por los aminoácidos adyacentes a sus regiones conservadas que, según sea el caso, limitan o favorecen su movimiento. En este sentido, de acuerdo a sus características individuales, el análisis de contactos permite concluir que el potencial efecto inhibitorio de los péptidos usados puede ser jerarquizado como pepMAL > pepTRAM > pepTLR4 > pepMyD88.

En lo que respecta a la aplicación de la metodología MM-PBSA para la estimación de la variación de energía libre, es posible constatar que ninguno de las estrategias utilizadas logra representar valores absolutos que guarden relación con los contactos identificados en la dinámica molecular. Sin embargo, es posible establecer que esta técnica permite definir en términos comparativos cuáles son los complejos que presentan una factibilidad termodinámica mayor. De acuerdo al análisis del RMSD de las trayectorias (figuras 5.12 y 5.13), se concluye los tiempos de simulación no fueron suficientes para constatar zonas claras de estabilidad. A pesar de que la principal fuente de error proviene de este último aspecto, la metodología en sí misma presenta debilidades asociadas a la variación de energía libre de solvatación, la variación de entropía del sistema y la estimación de la energía interna.

A partir del trabajo realizado, se concluye que la metodología consistente en la aplicación conjunta de *docking*, dinámica molecular y MM-PBSA ha resultado exitosa en su propósito de evaluar y jerarquizar la acción inhibitoria de péptidos de bloqueo sobre el homodímero de TLR4, definiéndolo como un procedimiento novedoso y eficiente posible de aplicar sobre una gama diversa de sistemas bioquímicos. Según esto, los resultados alcanzados permiten seguir avanzando en la búsqueda computacional de otros estados conformacionales y pruebas de carácter experimental.

7.1. Recomendaciones

En vista de los resultados obtenidos, es posible plantear diversas recomendaciones orientadas a la observación de estados conformacionales adicionales. La variación de energía libre obtenida mediante MM-PBSA fue realizada tomando en consideración trayectorias de seis nanosegundos, lo cual quedó de manifiesto que no fue un rango de tiempo suficiente para alcanzar la estabilidad de las trayectorias de los péptidos de

bloqueo en solitario. Según esto, se plantea como recomendación aumentar considerablemente los tiempos de simulación para poder lograr dicho objetivo. Esta recomendación es extensiva a la simulación del homodímero y de los complejos proteína-ligando cuyo resultado puede tener como desenlace una descripción más precisa acerca de estados conformacionales posibles que no son observados en tiempos de simulación pequeños.

En relación a sus términos individuales, la representatividad de la estimación de la entropía a través de modos normales requiere de un conjunto amplio de estados conformacionales que permitan la obtención de valores más confiables. En este sentido, se insta a la realización de dicho procedimiento considerando *frames* extraídos del comportamiento estable de la estructura simulada. Adicionalmente, se recomienda realizar pruebas en las que se someta al ligando a nuevas simulaciones de dinámica molecular considerando una actualización permanente de los átomos vecinos. Esto tiene por objetivo evaluar su impacto sobre los valores de energía de Coulomb. Por último, dada la variación de energía libre de solvatación evidenciada sobre el ligando simulado en solitario, se recomienda analizar el impacto de sus valores de constante dieléctrica y repetir el protocolo realizado en otros programas tales como Delphi con el propósito de certificar la calidad de los resultados obtenidos.

Se ha hecho énfasis en las virtudes de la metodología MM-PBSA como herramienta de jerarquización de ligandos según su afinidad a la molécula objetivo. Sin embargo, presenta debilidades asociadas a la estimación de los valores absolutos de variación de energía libre. En caso de requerir tal información, se recomienda la utilización de FEP o TI para su estimación asumiendo para tales efectos un mayor costo computacional.

Uno de los aspectos mencionados durante el desarrollo de este trabajo es que todas las simulaciones de dinámica molecular parten desde una única conformación obtenida mediante técnicas de *docking*. En este sentido, el análisis de las trayectorias parte desde información sesgada ya que depende de la conformación inicial. En este sentido, se recomienda desarrollar simulaciones de dinámica molecular no tradicionales tales como *umbrella sampling*, simulaciones de Monte Carlo, *accelerated dynamics* o *replica exchange*, que son capaces de describir una mayor cantidad de estados conformacionales.

Por último, lo realizado en este trabajo permite recomendar el inicio de pruebas experimentales basadas en la expresión de los péptidos de bloqueo mediante el uso de vectores acopladas a la inducción de la respuesta inflamatoria con LPS.

Bibliografía

- [1] NETEA, M. G. y cols. 2004. Toll-like receptors and the host defense against microbial pathogens: bringing specificity to the innate-immune system. *J Leukoc Biol*, 75(5):749-755.
- [2] AKIRA, S., UEMATSU, S. y TAKEUCHI O. 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 124(4):783-801.
- [3] BLACH-OLSZEWSKA, Z. y cols. 2005. Innate immunity: cells, receptors, and signaling pathways. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis*, 53(3):245.
- [4] BYRD-LEIFER, C. A. y cols. The role of MyD88 and TLR4 in the LPS-mimetic activity of Taxol. *Eur J Immunol*, 31(8):2448-2457.

- [5] YAMAMOTO, M., TAKEDA, K. y AKIRA, S. 2004. TIR domain-containing adaptors define the specificity of TLR signaling. *Mol Immunol*, 40(12):861-868.
- [6] ALBIGER, B. y *cols.* 2007. Role of the innate immune system in host defence against bacterial infections: focus on the Toll-like receptors. *Journal of internal medicine*, 261(6):511-528.
- [7] TRIANTAFILOU, M. y TRIANTAFILOU, K. 2004. Heat-shock protein 70 and heat-shock protein 90 associate with Toll-like receptor 4 in response to bacterial lipopolysaccharide. *Biochem Soc Trans*, 32(Pt 4):636-639.
- [8] VABULAS, R. M. y *cols.* 2001. Endocytosed HSP60s use toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 to activate the toll/interleukin-1 receptor signaling pathway in innate immune cells. *J Biol Chem*, 276(33):31332-31339.
- [9] MATZINIGER, P. 2002. The danger model: a renewed sense of self. *Science*, 296(5566):301-305.
- [10] BARTON, G. M. y MEDZHITOV, R. 2003. Toll-like receptor signaling pathways. *Science*, 300(5625):1524-1525.
- [11] WEBER, A. N. R. y *cols.* 2005. Ligand-receptor and receptor-receptor interactions act in concert to activate signaling in the Drosophila toll pathway. *J Biol Chem*, 280(24):22793-22799.
- [12] GAY, N. J., GANGLOFF, M. y WEBER, A.N.R. 2006. Toll-like receptors as molecular switches. *Nat Rev Immunol*, 6(9):693-698.
- [13] GAY, N. J. y GANGLOFF, M. 2007. Structure and function of Toll receptors and their ligands. *Annu Rev Biochem*, 76:141-165.
- [14] MEDZHITOV, R., PRESTON-BURLBURT, P. y JANEWAY, C.A. 1997. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*, 388(6640):394-397.
- [15] MCGETTRICK, A. F. y O'NEILL, L.A.J. 2004. The expanding family of MyD88-like adaptors in Toll-like receptor signal transduction. *Mol Immunol*, 41(6-7):577-582.
- [16] LU, Y-C., YEH, W-C. y OHASHI, P.S. 2008. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine*, 42(2):145-151.
- [17] KURT-JONES, E. A. y *cols.* 2000. Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nat Immunol*, 1(5):398-401.
- [18] PALSSON-MCDERMOTT, E.M. y O'NEILL, L.A.J. 2004. Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4. *Immunology*, 113(2):153-162.
- [19] NAGAI, Y. y *cols.* 2002. Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution. *Nat Immunol*, 3(7):667-672.
- [20] NUÑEZ, M. R. y *cols.* 2007. A dimer of the Toll-like receptor 4 cytoplasmic domain provides a specific scaffold for the recruitment of signalling adaptor proteins. *PLoS One*, 2(8):e788.
- [21] TAKEDA, K. y AKIRA, S. 2005. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol*, 17(1):1-14.
- [22] BASITH, S. y *cols.* 2011. In silico approach to inhibition of signaling pathways of Toll-like receptors 2 and 4 by ST2L. *PLoS One*, 6(8):e23989.
- [23] HEITZ, F., MORRIS, M.C. y DIVITA, G. 2009. Twenty years of cell-penetrating peptides: from molecular mechanisms to therapeutics. *Br J Pharmacol*, 157(2):195-206.

- [24] MAE, M. y LANGEL, U. 2006. Cell-penetrating peptide as vectors for peptide, protein and oligonucleotide delivery. *Curr Opin Pharmacol*, 6(5):509-514.
- [25] DESHAYES, S. y cols. 2005. Cell-penetrating peptides: tools for intracellular delivery of therapeutics. *Cellular and molecular life sciences*, 62(16):1839-1849.
- [26] TOSHCHAKOV, V. Y. y cols. 2001. Targeting TLR4 signaling by TLR4 Toll/IL-1 receptor domain-derived decoy peptides: identification of the TLR4 Toll/IL-1 receptor domain dimerization interface. *J Immunol*, 186(8):4819-4827.
- [27] COUTURE, L. A. y cols. 2012. Targeting Toll-like receptor (TLR) signaling by Toll/interleukin-1 receptor (TIR) domain-containing adapter protein/MyD88 adapter-like (TIRAP/Mal)-derived decoy peptides. *J Biol Chem*, 287(29):24641-24648.
- [28] TOSHCHAKOV, V. Y. y cols. 2005. Differential involvement of BB loops of toll-IL-1 resistance (TIR) domain-containing adapter proteins in TLR4- versus TLR2-mediated signal transduction. *J Immunol*, 175(1):494-500.
- [29] TOSHCHAKOV, V. Y., FENTON, M.J. y VOGEL, S.N. 2007. Cutting Edge: Differential inhibition of TLR signaling pathways by cell-permeable peptides representing BB loops of TLRs. *J Immunol*, 178(5):2655-2660.
- [30] LYSAKOVA-DEVINE, T. y cols. 2010. Viral inhibitory peptide of TLR4, a peptide derived from vaccinia protein A46, specifically inhibits TLR4 by directly targeting MyD88 adaptor-like and TRIF-related adaptor molecule. *J Immunol*, 185(7):4261-4271.
- [31] FLOWER, R. J. 1974. Drugs which inhibit prostaglandin biosynthesis. *Pharmacol Rev*, 26(1):33-67.
- [32] HATA, A.N. y BREYER, R.M. 2004. Pharmacology and signaling of prostaglandin receptors: multiple roles in inflammation and immune modulation. *Pharmacology & therapeutics*, 103(2):147-166.
- [33] SIMMONS, D.L., BOTTING, R.M. y HLA, T. 2004. Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacol Rev*, 56(3):387-437.
- [34] BUTTGEREIT, F., Burmester BURMESTER, G.R. y SIMON, L.S. 2001. Gastrointestinal toxic side effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and cyclooxygenase-2-specific inhibitors. *Am J Med*, 110 Suppl 3A:13S-19S.
- [35] SULEYMAN, H., DEMIRCAN, B. y KARAGOZ, Y. 2007. Anti-inflammatory and side effects of cyclooxygenase inhibitors. *Pharmacol Rep*, 59(3):247-258.
- [36] MAMDANI, M. y cols. 2004. Cyclo-oxygenase-2 inhibitors versus non-selective non-steroidal anti-inflammatory drugs and congestive heart failure outcomes in elderly patients: a population-based cohort study. *Lancet*, 363(9423):1751-1756.
- [37] RAY, W. A. y cols. 2002. COX-2 selective non-steroidal anti-inflammatory drugs and risk of serious coronary heart disease. *Lancet*, 360(9339):1071-1073.
- [38] FRISHMAN, W.H. 2002. Effects of nonsteroidal anti-inflammatory drug therapy on blood pressure and peripheral edema. *Am J Cardiol*, 89(6A):18D-25D.
- [39] SÁNCHEZ-BORGES, M., CAPRILES-HULET, A. y CABALLERO-FONSECA, F. 2003. Cutaneous reactions to aspirin and nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Clin Rev Allergy Immunol*, 24(2):125-136.

- [40] GOOCH, K. *y cols.* 2007. NSAID use and progression of chronic kidney disease. *Am J Med*, 120(3):280.e1-280.e7.
- [41] SAITOH, S. I. *y cols.* Lipid A antagonist, lipid IVa, is distinct from lipid A in interaction with Toll-like receptor 4 (TLR4)-MD-2 and ligand-induced TLR4 oligomerization. *Int Immunol*, 16(7):961-969.
- [42] AHN, S. I., LEE, J. K. *y* YOUN, H. S. 2009. Inhibition of homodimerization of toll-like receptor 4 by 6-shogaol. *Mol Cells*, 27(2):211-215.
- [43] KIM, Y. S. *y cols.* 2009. Alteration of Toll-like receptor 4 activation by 4-hydroxy-2-nonenal mediated by the suppression of receptor homodimerization. *Chem Biol Interact*, 182(1):59-66.
- [44] BOVIJN, C. *y cols.* 2012. Identification of interaction sites for dimerization and adapter recruitment in Toll/interleukin-1 receptor (TIR) domain of Toll-like receptor 4. *J Biol Chem*, 287(6):4088-4098.
- [45] BURNS, K. *y cols.* 1998. MyD88, an adapter protein involved in interleukin-1 signaling. *J Biol Chem*, 273(20):12203-12209.
- [46] MEDZHITOV, R. *y cols.* 1998. MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. *Mol Cell*, 2(2):253-258.
- [47] FITZGERALD, K. A. *y cols.* 2001. Mal (MyD88-adaptor-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction. *Nature*, 413(6851):78-83.
- [48] OSHIUMI, H. *y cols.* 2003. TIR-containing adapter molecule (TICAM)-2, a bridging adapter recruiting to toll-like receptor 4 TICAM-1 that induces interferon-beta. *J Biol Chem*, 278(50):49751-49762.
- [49] YAMAMOTO, M. *y cols.* 2003. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science*, 301(5633):640-643.
- [50] OHTO, U. *y cols.* 2012. Structural basis of species-specific endotoxin sensing by innate immune receptor TLR4/MD-2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(19):7421-7426.
- [51] XU, Y. *y cols.* 2000. Structural basis for signal transduction by the Toll/interleukin-1 receptor domains. *Nature*, 408(6808):111-115.
- [52] NYMAN, T. *y cols.* 2008. The crystal structure of the human toll-like receptor 10 cytoplasmic domain reveals a putative signaling dimer. *J Biol Chem*, 283(18):11861-11865.
- [53] DUNNE, A. *y cols.* 2003. Structural complementarity of Toll/interleukin-1 receptor domains in Toll-like receptors and the adaptors Mal and MyD88. *J Biol Chem*, 278(42):41443-41451.
- [54] GONG, J. *y cols.* 2010. Inhibition of Toll-like receptors TLR4 and 7 signaling pathways by SIGIRR: a computational approach. *J Struct Biol*, 169(3):323-330.
- [55] POLTORAK, A. *y cols.* 1998. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in *Tlr4* gene. *Science*, 282(5396):2085-2088.
- [56] RONNI, T. *y cols.* 2003. Common interaction surfaces of the toll-like receptor 4 cytoplasmic domain stimulate multiple nuclear targets. *Mol Cell Biol*, 23(7):2543-2555.
- [57] LOIARRO, M. *y cols.* 2005. Peptide-mediated interference of TIR domain dimerization in MyD88 inhibits interleukin-1-dependent activation of NF-kB. *J Biol Chem*, 280(16):15809-15814.

- [58] LOIARRO, M. *y cols.* 2007. Pivotal Advance: Inhibition of MyD88 dimerization and recruitment of IRAK1 and IRAK4 by a novel peptidomimetic compound. *J Leukoc Biol*, 82(4):801-810, <http://dx.doi.org/10.1189/jlb.1206746>.
- [59] LAIRD, M. *y cols.* 2009. TLR4/MyD88/PI3K interactions regulate TLR4 signaling. *J Leukoc Biol*, 85(6):966-977.
- [60] OHNISHI, H. *y cols.* 2009. Structural basis for the multiple interactions of the MyD88 TIR domain in TLR4 signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(25):10260-10265.
- [61] VALKOV, E. *y cols.* 2011. Crystal structure of Toll-like receptor adaptor MAL/TIRAP reveals the molecular basis for signal transduction and disease protection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(36):14879-14884.
- [62] YAMAMOTO, M. *y cols.* 2003. TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway. *Nat Immunol*, 4(11):1144-1150.
- [63] ZORKO, M. *y* LANGEL, U. 2005. Cell-penetrating peptides: mechanism and kinetics of cargo delivery. *Adv Drug Deliv Rev*, 57(4):529-545.
- [64] MORRIS, M.C. *y cols.* 2008. Cell-penetrating peptides: from molecular mechanisms to therapeutics. *Biol Cell*, 100(4):201-217.
- [65] RICHARD, J.P. *y cols.* 2003. Cell-penetrating peptides. A reevaluation of the mechanism of cellular uptake. *J Biol Chem*, 278(1):585-590.
- [66] HORNG, T., BARTON G.M. *y* MEDZHITOV, R. 2001. TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway. *Nat Immunol*, 2(9):835-841.
- [67] MADANI, F. *y cols.* 2011. Mechanisms of cellular uptake of cell-penetrating peptides. *J Biophys*, 2011:414729.
- [68] LUNDBERG, P. *y* LANGEL, U. 2003. A brief introduction to cell-penetrating peptides. *J Mol Recognit*, 16(5):227-233.
- [69] DIAS, R. *y* FILGUEIRA DE AZEVEDO, W. 2008. Molecular docking algorithms. *Curr Drug Targets*, 9(12):1040-1047.
- [70] MORRIS, G.M. *y cols.* 1998. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *Journal of computational chemistry*, 19(14):1639-1662.
- [71] SOUSA, S.F., FERNANDES, P. A. *y* RAMOS, M. J. 2006. Protein-ligand docking: current status and future challenges. *Proteins*, 65(1):15-26.
- [72] MORRIS, G. M. *y cols.* 2009. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J Comput Chem*, 30(16):2785-2791.
- [73] TROTT, O. *y* OLSON, A.J. 2010. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J Comput Chem*, 31(2):455-461.
- [74] VAN DER SPOEL, D. *y cols.* 2010. GROMACS User Manual version 4.5.4. <http://www.gromacs.org>.
- [75] PHILLIPS, J. C. *y cols.* 2005. Scalable molecular dynamics with NAMD. *J Comput Chem*, 26(16):1781-1802.
- [76] FOGOLARI, F., BRIGO, A. *y* MOLINARI, H. 2003. Protocol for MM/PBSA molecular dynamics simulations of proteins. *Biophys J*, 85(1):159-166.

- [77] KUHN, B. *y cols.* 2005. Validation and use of the MM-PBSA approach for drug discovery. *J Med Chem*, 48(12):4040-4048.
- [78] SWANSON, J.M.J., HENCHMAN, R.H. *y* MCCAMMON, J.A. 2004. Revisiting free energy calculations: a theoretical connection to MM/PBSA and direct calculation of the association free energy. *Biophysical journal*, 86(1):67-74.
- [79] WEIS, A. *y cols.* 2006. Ligand affinities predicted with the MM/PBSA method: dependence on the simulation method and the force field. *J Med Chem*, 49(22):6596-6606.
- [80] CHIPOT, C. *y* POHORILLE, A. 2007. *Free Energy Calculations: Theory and Applications in Chemistry and Biology*. Springer Series in Chemical Physics. Springer London, Limited. ISBN 9783540384489.
- [81] FUJIWARA, S. I. *y* AMISAKI, T. 2008. Identification of high affinity fatty acid binding sites on human serum albumin by MM-PBSA method. *Biophys J*, 94(1):95-103.
- [82] MASSOVA, I. *y* KOLLMAN, P. A. 1999. Computational Alanine Scanning To Probe Protein–Protein Interactions: A Novel Approach To Evaluate Binding Free Energies. *Journal of the American Chemical Society*, 121(36):8133-8143.
- [83] METZ, A. *y cols.* 2012. Hot spots and transient pockets: predicting the determinants of small-molecule binding to a protein-protein interface. *J Chem Inf Model*, 52(1):120-133.
- [84] HOMEYER, N. *y* GOHLKE, H. 2012. Free Energy Calculations by the Molecular Mechanics Poisson–Boltzmann Surface Area Method. *Molecular Informatics*, 31(2):114-122. ISSN 1868-1751.
- [85] GANOTH, A. *y cols.* 2006. A molecular dynamics study and free energy analysis of complexes between the Mlc1p protein and two IQ motif peptides. *Biophys J*, 91(7):2436-2450.
- [86] CORNELL, W. D. *y cols.* 1995. A Second Generation Force Field for the Simulation of Proteins, Nucleic Acids, and Organic Molecules. *J. Am. Chem. Soc.*, 117(3):5179-5197, ISSN 00419907.
- [87] VENKEN, T. *y cols.* 2011. An optimized MM/PBSA virtual screening approach applied to an HIV-1 gp41 fusion peptide inhibitor. *Proteins*, 79(11):3221-3235.
- [88] HOLST, M. *y* SAIED, F. 1993. Multigrid solution of the Poisson—Boltzmann equation. *Journal of Computational Chemistry*, 14(1):105-113, ISSN 1096-987X.
- [89] ADEKOYA, O. A., WILLASSEN, N. P. *y* SYLTE, I. 2006. Molecular insight into pseudolysin inhibition using the MM-PBSA and LIE methods. *J Struct Biol*, 153(2):129-144.
- [90] HAYWARD, S. *y* GROOT, B.L. 2008. Normal Modes and Essential Dynamics. En: KUKOL, A. *y* WALKER, J.M. (editores): *Molecular Modeling of Proteins*, volumen 443 de *Methods in Molecular Biology*, pp. 89-106. Humana Press, ISBN 978-1-59745-177-2.
- [91] ABROSHAN, H., AKBARZADEH, H. *y* PARSAFAR G.A. 2010. Molecular dynamics simulation and MM-PBSA calculations of sickle cell hemoglobin in dimer form with Val, Trp, or Phe at the lateral contact. *Journal of Physical Organic Chemistry*, 23(9):866-877.
- [92] NUMATA, J., WAN, M. *y* KNAPP, E. W. 2007. Conformational entropy of biomolecules: beyond the quasi-harmonic approximation. *Genome Inform*, 18:192-205.
- [93] ALTIS, A. *y cols.* 2007. Dihedral angle principal component analysis of molecular dynamics simulations. *J Chem Phys*, 126(24):244111.

- [94] BALSERA, M.A. *y cols.* 1996. Principal component analysis and long time protein dynamics. *The Journal of Physical Chemistry*, 100(7):2567-2572.
- [95] LOU, H. y CUKIER, R.I. 2006. Molecular dynamics of apo-adenylate kinase: a principal component analysis. *J Phys Chem B*, 110(25):12796-12808.
- [96] RAZAVIAN, N. S., KAMISSETTY H. y LANGMEAD, C. J. 2012. Learning generative models of molecular dynamics. *BMC Genomics*, 13 Suppl 1:S5.
- [97] CHANG, M. W. *y cols.* 2010. Virtual screening for HIV protease inhibitors: a comparison of AutoDock 4 and Vina. *PLoS One*, 5(8):e11955.
- [98] PETERSEN, E. F. *y cols.* 2004. UCSF Chimera-a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem*, 25(13):1605-1612.
- [99] HUMPHREY, W., DALKE, A. y SCHULTEN, K. 1996. VMD: visual molecular dynamics. *J Mol Graph*, 14(1):33-8, 27-8.
- [100] HESS, B. *y cols.* 2008. GROMACS 4: Algorithms for Highly Efficient, Load-Balanced, and Scalable Molecular Simulation. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 4(3):435-447.
- [101] ROSSEL, E. 2012. Modelamiento de sitios de acoplamiento e interacciones proteína-proteína en receptores tipo Toll. Tesis de Licenciatura, Departamento de Ingeniería Química y Biotecnología, Universidad de Chile, Beauchef 850, Santiago, Chile.

Apéndice A

Definición de parámetros de las simulaciones de dinámica molecular

Tabla A.1: Parámetros del archivo de configuración (.mdp) para cada una de las etapas de MD

	Minimización	Posición Restringida	NPT	Producción
define	-DFLEXIBLE	-DPOSRES	-DFLEXIBLE	-DFLEXIBLE
integrator	cg	md	md	md
emtol	10	—	—	—
dt	—	0,001	0,001	0,002
nsteps	-1	50000	100000	3000000
nstcgsteep	100	—	—	—
nstxout	—	1000	1000	10000
nstvout	—	1000	1000	10000
nstfout	—	0	0	0
nstlog	—	1000	1000	10000
nstxcout	—	1000	1000	10000
nstenergy	1	1	1	10000
nstealenergy	—	10	10	10
energygrps	System	Protein Non-Protein	Protein Non-Protein	Protein Non-Protein
ns_type	grid	grid	grid	grid
nstlist	—	10	10	10
rlist	1,4	1,4	1,4	1,4
coulombtype	PME-Switch	PME-Switch	PME-Switch	PME-Switch
rcoulomb	1,2	1,2	1,2	1,2
rcoulomb_switch	1,0	1,0	1,0	1,0
fourierspacing	0,12	0,12	0,12	0,12
pme_order	4	4	4	4
ewald_rtol	0,00001	0,00001	0,00001	0,00001
vdw-type	Shift	Shift	Shift	Shift
rvdw	1,2	1,2	1,2	1,2
rvdw_switch	0	0	0	0
constraints	none	all-bonds	all-bonds	all-bonds
constraints-algorithm	—	Lincs	Lincs	Lincs
lincs-order	—	4	4	4
lincs-iter	—	1	1	2
lincs-warnangle	—	30	30	30
pbc	xyz	xyz	xyz	xyz
tcoupl	—	V-rescale	V-rescale	V-rescale
Tc-grps	—	Protein Non-Protein	Protein Non-Protein	Protein Non-Protein
tau_t	—	0,1 0,1	0,1 0,1	0,1 0,1
ref_t	—	200 200	300 300	300 300
Pcoupl	—	—	Berendsen	Berendsen
Pcoupltype	—	—	Isotropic	Isotropic
tau_p	—	—	0,5	0,5
compressibility	—	—	4,50E-05	4,50E-05
ref_p	—	—	1,0	1,0
gen_vel	—	yes	no	no
gen_temp	—	200	—	—
gen_seed	—	9999	—	—
continuation	—	—	yes	yes

A continuación se describe de manera breve la función que cumple cada uno de los parámetros señalados:

- *define*: Permite controlar el uso de los archivos de topología. La opción -DFLEXIBLE indica a *grompp*

que debe usar moléculas de agua flexibles en la topología. Por su parte la opción `-DPOSRES` puede ser utilizada para generar restricciones de posición en los átomos del sistema.

- *integrator*: Permite determinar el modo de ejecución de modo de realizar minimización del sistema, dinámica molecular o análisis de modos normales, entre otras opciones. La opción *cg* se refiere al uso del algoritmo de gradiente conjugado para la minimización de energía. Por su parte *md* se refiere a ejecución de dinámica molecular utilizando un algoritmo *leap-frog* para integrar las ecuaciones de movimiento de Newton.
- *emtol* [$\text{kJ mol}^{-1} \text{ nm}^{-1}$]: Corresponde a la tolerancia utilizada para definir la precisión deseada durante la etapa de minimización. El valor limita de la convergencia si la máxima fuerza del sistema es menor que este valor.
- *dt* [ps]: Paso de integración para el tiempo. Se utiliza solo cuando se utilizada la opción *md* en el parámetro *integrator*.
- *nsteps*: Número máximo de pasos utilizados para la integración o minimización.
- *nstcgsteep* [pasos]: Frecuencia para la cual se desarrolla una iteración del método del gradiente al utilizar el método de gradiente conjugado al minimizar la energía de un sistema.
- *nstxout* [pasos]: Frecuencia con que se escribe trayectorias de salida, las últimas coordenadas del sistema siempre se escriben como salida.
- *nstvout* [pasos]: Frecuencia con que se escriben las velocidades en el archivo de salida.
- *nstfout* [pasos]: Frecuencia con que se escriben las fuerzas en el archivo de salida del sistema.
- *nstlog* [pasos]: Frecuencia con que se escriben las energías del sistema en el archivo *log*.
- *nstxcout*: Frecuencia con que se escriben las trayectorias del sistema en el archivo de salida *.xtc*
- *nstenergy*: Frecuencia con que se escriben las energías del sistema en el archivo de energía *.edr*
- *nstcalcenergy*: Frecuencia con que se calculan las energía del sistema. Esta opción es relevante al desarrollar simulaciones de dinámica molecular, ya que afecta el desempeño al realizar cálculos en paralelo. Esto se debe a que el cálculo de energía requiere de la comunicación global de todos los procesos lo que se puede convertir en el cuello de botella en las simulaciones con alta paralelización.
- *energygrps*: Grupos del sistema para los cuales se almacena los archivos de energía de salida.
- *ns_type*: Parte de los cálculos que realiza Gromacs se llevan a cabo utilizando una lista de átomos vecinos o próximos a cada átomo del sistema. Este parámetro define la manera en la que se actualiza esa lista. Para el caso de la opción *grid* se genera una grilla en la caja definida para la simulación y se chequean aquellos átomos que se encuentra en las grillas cercanas, en cambio para la opción *simple* se chequean todos los átomos del sistema.
- *nstlist* [pasos]: Frecuencia con que se actualiza la lista de átomos vecinos.
- *rlist* [nm]: Distancia de corte para la lista de átomos vecinos de corto alcance.
- *coulombtype*: Tratamiento utilizado para el cálculo de energía electrostáticas. La opción *PME-Switch* implica una combinación de *PME* y una función *switch* para el cálculo de las energías electrostáticas. La dimensión de la grilla de cálculo es controlada con *fourierspacing* y el orden de la interpolación utilizada con *pme_order*.
- *rcoulomb* [nm]: Distancia de corte para el cálculo de energía electrostáticas

- *rcoulomb_switch* [nm]: Distancia para la cual se comienza a implementar la función Switch sobre el cálculo de energía electrostática.
- *fourierspacing* [nm]: Corresponde al mayor espaciado que puede ser utilizado en la grilla para FFT al usar PME para el cálculo de la energía electrostática.
- *pme_order*: Orden de la interpolación para PME
- *ewald_rtol*: Tolerancia relativa usada en PME. Disminuir este valor da una suma más precisa, pero requiere de memoria adicional.
- *vdw-type*: Tratamiento para el cálculo de interacciones de no enlace. La opción Shift utiliza un potencial de tipo Lennard-Jones. Las fuerzas decaen suavemente a cero para distancias entre *rvdw_switch* y *rvdw*.
- *rvdw*: Distancia de corte para la función de Lennard-Jones
- *rvdw_switch*: Distancia para la cual comienza el decaimiento de la función de Lennard-Jones
- *constraints*: Tipo de restricciones impuestas sobre los enlaces del sistema. En el caso de la opción *none*, no se usan restricciones con excepción de aquellas definidas explícitamente en la topología. Esto implica que los enlaces y ángulos son representados por un potencial armónico (u otro tipo). La opción *all-bonds* implica que todos los enlaces se transforman en restricciones del sistema
- *constraints-algorithm*: Corresponde al tipo de algoritmo utilizado para mantener las restricciones sobre el sistema. En este caso se usa el algoritmo LINCS (*LINear Constraint Solver*)
- *lincs-order*: Define la precisión del algoritmo por medio de la definición del número de matrices usados en la expansión durante la inversión de matriz. Para una dinámica molecular normal se usa un orden 4.
- *lincs-iter*: Número máximo de iteraciones implementadas para la corrección de los largos rotacionales en LINCS.
- *lincs-warnangle* [°]: Máximo ángulo que puede rotar un enlace sin que LINCS lo note.
- *pbcs*: Parámetro que define el uso de condiciones de borde periódicas. *xyz* implica el uso de condiciones de borde periódicas en todas las direcciones.
- *tcoupl*: Define el algoritmo utilizado para acoplar la temperatura del sistema. En este caso se acopla la temperatura mediante V-rescale, un algoritmo de acoplamiento similar al de un termostato de Berendsen pero que incluye el rescalamiento de la velocidades del sistema, por medio de un término estocástico.
- *Tc-grps*: Grupos para los cuales se desea acoplar de manera separada la temperatura
- *tau_t* [ps]: Constante de tiempo para el acoplamiento de temperatura
- *ref_t* [K]: Temperatura de referencia para el acoplamiento de temperatura, una por cada grupo definido.
- *Pcoupl*: Define el algoritmo utilizado para acoplar la presión del sistema. La opción *Berendsen* implica la relajación exponencial del acoplamiento de la presión con una constante de tiempo *tau_p*.
- *Pcoupltype*: Define el tipo de acoplamiento de la presión. En este caso la opción *isotropic* implica un acoplamiento a una presión isotrópica. La compresibilidad y la presión de referencia del sistema se definen respectivamente con *compressibility* [bar⁻¹] y *ref_p* [bar⁻¹].
- *tau_p*: Constante de tiempo para el acoplamiento de la presión.

- *compressibility*[bar⁻¹]: Compresibilidad del sistema.
- *ref_p* [bar⁻¹]: Presion de referencia para el sistema.
- *gen_vel*: Parámetro determina la generación de las velocidades para los átomos del sistema al inicio de la dinámica molecular. En este caso, la opción *yes* implica la determinación de las velocidades iniciales del sistema de acuerdo a una distribución de Maxwell a una temperatura *gen_temp*, con una semilla aleatoria *gen_seed*
- *gen_temp* [K]: Temperatura para genera la distribución Maxwell.
- *gen_seed*: Parámetro usado para la determinación aleatoria de las velocidades.
- *continuation*: Parámetro seteado en *yes* en los casos que sea continuar con una simulación por etapas. Las condiciones de salida de la última etapa son considerados como parámetros de entrada para la nueva etapa.